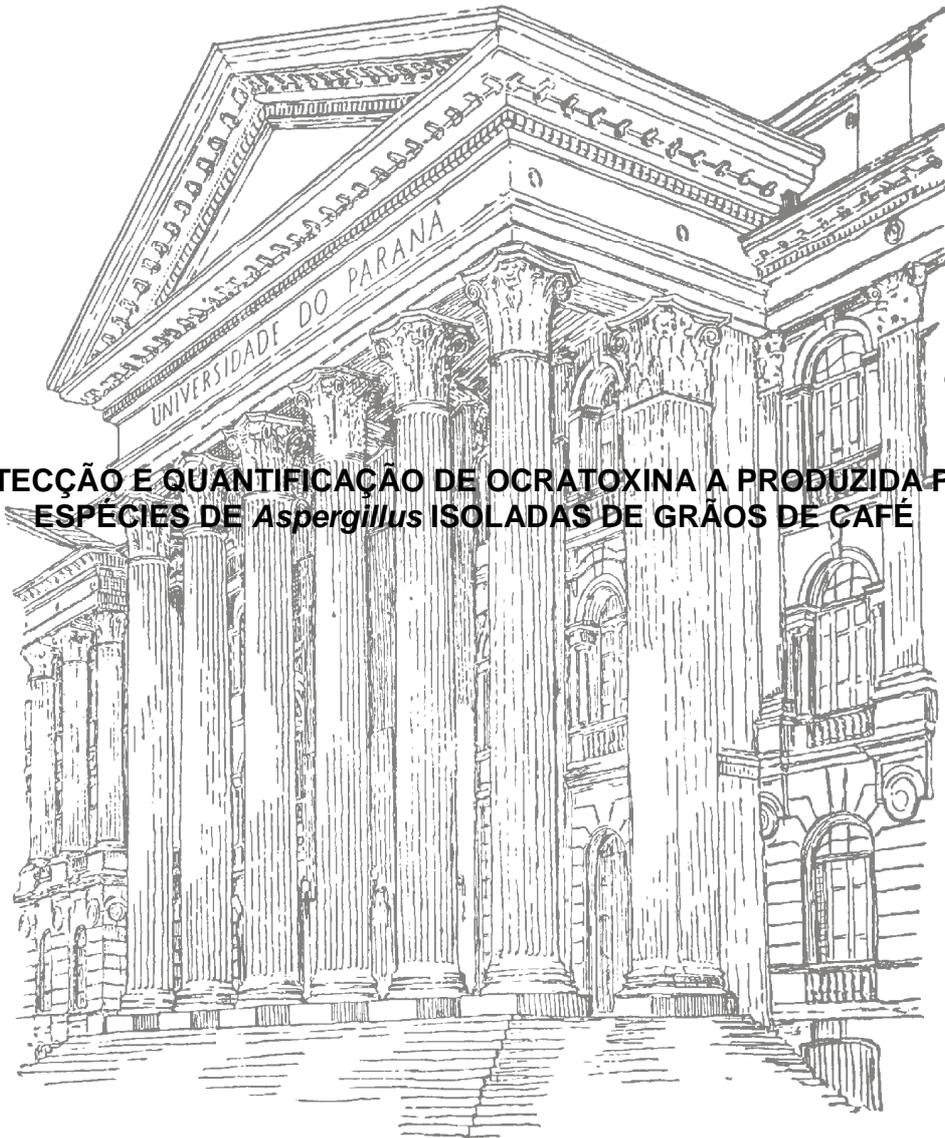


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANGELA BOZZA

**DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE OCRATOXINA A PRODUZIDA POR
ESPÉCIES DE *Aspergillus* ISOLADAS DE GRÃOS DE CAFÉ**



CURITIBA
2010

ANGELA BOZZA

**DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE OCRATOXINA A PRODUZIDA POR
ESPÉCIES DE *Aspergillus* ISOLADAS DE GRÃOS DE CAFÉ**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, área de concentração em Microbiologia, Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ida Chapaval Pimentel

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Patrícia do Rocio Dalzoto

CURITIBA
2010



Ministério da Educação e Desporto
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETORES DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS e da SAÚDE
Departamentos de Patologia Básica e Patologia Médica
Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia

TERMO DE APROVAÇÃO

“Detecção e quantificação de ocratoxina A produzida por espécies de
Aspergillus isoladas de grãos de café”

por

ANGELA BOZZA

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

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

Danyelle Stringari
Prof^a Dr^a Danyelle Stringari

Dalton Tadeu Reynaud dos Santos
Prof. Dr. Dalton Tadeu Reynaud dos Santos

Patricia Dalzoto
Prof^a Dr^a Patrícia do Rocio Dalzoto (suplente)

DEDICO

Aos amores da minha vida:
Meus pais Maria e Eroni,
meu irmão Jean
e minha paixão Thiago.

AGRADECIMENTOS

Às professoras Dr^a. Ida Chapaval Pimentel e Dr^a. Patrícia do Rocio Dalzoto pela orientação e amizade. Muito obrigada por acreditarem em mim e no meu trabalho quando ninguém mais acreditava.

Ao Dr. Jaime Iván Rodriguez Fernandez pela confiança e todo o apoio durante este trabalho.

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

Ao CEPPA, em especial ao Eriel Andrade por toda a ajuda durante as análises da CLAE.

À professora Dr^a. Iara Messerschmidt, do departamento de Química da UFPR, pelo empréstimo dos materiais e o espectrofotômetro para a realização das análises da NIRS.

À professora Dr^a. Vanessa Kava-Cordeiro por todas as sugestões valiosas e empréstimos de materiais.

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

À professora Dr^a. Danyelle Stringari por todos os conselhos e sugestões.

Aos integrantes do Laboratório de Genética de Micro-organismos (LabGeM) por toda a ajuda durante este trabalho, em especial ao Douglas Montenegro por toda sua prestatividade.

Aos integrantes do grupo de pesquisa do Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (LabMicro) e aos colegas da Pós-Graduação que fizeram os meus dias mais felizes. Muito obrigada pelo companherismo e amizade.

À Sabina Moser Tralamazza e Mariana Vieira Porsani, minhas amigas queridas, obrigada por toda a ajuda e amizade quando eu mais precisava.

À Capes, pelo apoio financeiro.

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

Aos meus pais e meu irmão, que eu tanto amo, obrigada por todo o amor, paciência, dedicação, compreensão e por estarem sempre ao meu lado.

RESUMO

A ocratoxina A (OTA) é uma micotoxina com efeitos nefrotóxicos, carcinogênicos, teratogênico a imunotóxico, naturalmente encontrada em produtos agrícolas incluindo grãos de café. A ocratoxina A em café é produzida principalmente por espécies de *Aspergillus* da seção *Circumdati* e *Nigri*. A espectroscopia de infravermelho próximo (NIRS) é um método prático para a detecção de compostos orgânicos na matéria. Sendo particularmente útil por ser um método não destrutivo, preciso, de resposta rápida e de fácil operação. O principal objetivo deste trabalho foi verificar a produção de ocratoxina A por fungos do gênero *Aspergillus*, isolados de grãos de café, por meio das técnicas do ágar coco, da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e da espectroscopia de infravermelho próximo. A PCR foi utilizada para a identificação das principais espécies de fungos produtoras de ocratoxina A, sendo elas: *A. niger*, *A. carbonarius*, *A. ochraceus* e *A. westerdjikiae*. O par de oligonucleotídeos específicos utilizado para identificação de *A. niger* foi satisfatório, sendo capaz de amplificar um fragmento de 372 pb. Sete isolados, dos 13 testados, representantes da seção *Nigri*, foram identificados como *A. niger*. Os demais pares de oligonucleotídeos iniciadores não foram eficientes na identificação das outras espécies de *Aspergillus*. A técnica do ágar coco foi utilizada como um *screening* para a identificação de isolados fúngicos potencialmente produtores de ocratoxina. Dos 47 isolados testados, 24 (51%) mostraram ser potenciais produtores de ocratoxina A através da formação de um halo fluorescente azulado. Dez isolados previamente testados pelo ágar coco foram analisados por CLAE, mostrando 2 falsos positivos e 2 falsos negativos, indicando que o ágar coco é um método que pode ser utilizado como *screening*, necessitando de análises confirmatórias. Na análise da NIRS, verificou-se que, para a detecção de ocratoxina A nas amostras de fungos, o modelo que utilizou dados obtidos por transmitância foi o melhor. Já para a quantificação da ocratoxina A, ambos os modelos, criados a partir dos dados de transmitância e reflectância apresentaram bons resultados. Entretanto, quando utilizados 3 números de variáveis latentes e seus respectivos valores da somatória dos erros das predições foi possível a confecção de um gráfico comparando esses dados com os modelos, verificando que o modelo que utilizou dados obtidos por transmitância obteve os melhores resultados. Concluiu-se que a utilização da NIRS para a detecção e quantificação de OTA em isolados fúngicos é uma metodologia viável e próspera, contudo, mais testes são necessários.

Palavras chaves: *Aspergillus*, café, ocratoxina A, ágar coco, CLAE e NIRS.

ABSTRACT

Ochratoxin A (OTA) is a mycotoxin with nephrotoxic, carcinogenic, teratogenic and immunotoxic effects, naturally found in agricultural products including coffee grains. Ochratoxin A in coffee is mainly produced by *Aspergillus* species from section *Circumdati* and *Nigri*. Near infraed (NIR) spectroscopy is a practical spectroscopic procedure for the detection of organic compounds in matter. Being particularly useful because of its accuracy, rapid response, easy operation and a non-destructive method. The aim of this work was to verify the ochratoxin A production from fungi of *Aspergillus* genera, isolated from coffee beans, through coconut agar, high performance liquid chromatography (HPLC) and near infrared spectroscopy (NIRS) techniques. PCR was used to identify the ochratoxin A main producers species of fungi: *A. niger*, *A. carbonarius*, *A. ochraceus* and *A. westerdjikiae*. The pair of primers used to the identification of *A. niger* was satisfactory, being able to amplify a fragment of 372 pb. Seven isolates of 13 tested, representatives of the section *Nigri* were identified as *A. niger*. The other pairs of primers were not effective to identify the other species of *Aspergillus*. The technique of coconut agar was used as a screening for the identification of potential ochratoxin A producers fungal isolates. Of the 47 isolates tested, 24 (51%) proved to be potential producers of ochratoxin A through the formation of a halo. Ten isolates previously tested on coconut agar were analyzed on HPLC, showing two false positives and two false negatives, indicating that the coconut agar could be use only as a screening method, requiring confirmatory tests. The NIRS analysis showed that the model design from the transmittance data had a better result when detecting ochratoxin A. As for quantification of ochratoxin A, both models, design from transmittance and reflectance data showed good results. However, when using 3 numbers of latent variables and the values of their predictions errors sum, it was possible to elaborate a chart comparing them with the models, verifying that the model from transmittance data obtained the best results. Thus, the use of NIRS for the detection and quantification of ochratoxim A in fungal isolates is a viable and prosper methodology, however further tests are needed.

Key words: *Aspergillus*, coffee, ochratoxin A, coconut agar, HPLC and NIRS.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| FIGURA 1 – ESTRUTURA QUÍMICA DA OCRATOXINA A..... | 26 |
| FIGURA 2 – ESPECTRO ELETROMAGNÉTICO | 47 |
| FIGURA 3 – MODELO QUÂNTICO DE VIBRAÇÃO MOLECULAR..... | 48 |
| FIGURA 4 – ISOLADOS FÚNGICOS DO GÊNERO <i>Aspergillus</i> sp. CRESCIDOS EM MEIO BDA LÍQUIDO POR 14 DIAS A 25°C NO ESCURO EM TRIPLICATA | 63 |
| FIGURA 5 – SISTEMA CLAE UTILIZADO | 64 |
| FIGURA 6 – ESPECTROFOTÔMETRO POR INFRAVERMELHO PRÓXIMO | 65 |
| FIGURA 7 – JANELA DE TRANSMITÂNCIA | 66 |
| FIGURA 8 – SISTEMA DE TRANSMITÂNCIA | 67 |
| FIGURA 9 – SISTEMA DE REFLECTÂNCIA (ATR) | 68 |
| FIGURA 10 – COMPARTIMENTO ONDE A AMOSTRA É INJETADA NO SISTEMA DE ATR | 68 |
| FIGURA 11 – TRANSFORMAÇÃO DE TRANSMITÂNCIA (A) PARA ABSORBÂNCIA (B)..... | 70 |
| FIGURA 12 – ESPECTRO ANTES DA UTILIZAÇÃO DO MSC (A). APARÊNCIA DO ESPECTRO APÓS A UTILIZAÇÃO DO MSC (B)..... | 71 |
| FIGURA 13 – NÚMERO ABSOLUTO DE <i>Aspergillus</i> sp. DAS SEÇÕES <i>NIGRI</i> E <i>CIRCUMDATI</i> ISOLADOS DE GRÃOS DE CAFÉ CV. IAPAR 59 | 73 |
| FIGURA 14 – MACROMORFOLOGIA E MICROMORFOLOGIA DE <i>Aspergillus</i> sp. SEÇÕES <i>NIGRI</i> E <i>CIRCUMDATI</i> | 75 |
| FIGURA 15 – AMPLIFICAÇÃO DE LINHAGENS DE <i>Aspergillus</i> sp. COM OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES ESPECÍFICOS PARA <i>Aspergillus niger</i> | 78 |

| | |
|---|----|
| FIGURA 16 – CRESCIMENTO COLONIAL E FORMAÇÃO DE HALO DE <i>Aspergillus</i> sp. DA SEÇÃO <i>CIRCUMDATI</i> POTENCIAL PRODUTOR DE OCRATOXINA A, EM ÁGAR COCO, APÓS 3 DIAS (72 HORAS) DE CRESCIMENTO A 28°C, OBSERVADO SOB LUZ U.V. (365 nm)..... | 82 |
| FIGURA 17 – CURVA DE CALIBRAÇÃO, COM DILUIÇÕES DE OCRATOXINA A, OBTIDAS POR CLAE | 85 |
| FIGURA 18 – PICOS DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DAS DILUIÇÕES DA OCRATOXINA A | 85 |
| FIGURA 19 – CORRIDA DA AMOSTRA 16 B | 86 |
| FIGURA 20 – PCA REALIZADO PARA A ESCOLHA DAS AMOSTRAS A SEREM UTILIZADAS NA PREDIÇÃO..... | 97 |
| FIGURA 21 – COMPARAÇÃO ENTRE PRÉ-TRATAMENTOS, SOMATÓRIA DOS ERROS DAS PREDIÇÕES E VARIÁVEIS LATENTES | 99 |

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1 – PRODUÇÃO DE OCRATOXINA A VISUALIZADA PELA FORMAÇÃO DE HALO EM MEIO ÁGAR COCO COM 3 DIAS DE CRESCIMENTO (72 HORAS) A 28°C..... 82
- TABELA 2 – PRODUÇÃO DE OCRATOXINA A POR FUNGOS DO GÊNERO *Aspergillus* sp. QUANTIFICADA ATRAVÉS DA CLAE 87
- TABELA 3 – COMPARAÇÃO DA DETECÇÃO DE OCRATOXINA A PELOS MÉTODOS DE ÁGAR COCÓ E CLAE..... 91
- TABELA 4 – PRÉ-TRATAMENTOS (P.T.) UTILIZADOS PARA DETECÇÃO DE OCRATOXINA A, EM AMOSTRAS DE FUNGOS DO GÊNERO *Aspergillus* sp., COM SUAS VARIÁVEIS LATENTES E RESPECTIVOS VALORES DE CALIBRAÇÃO, VALIDAÇÃO, ERROS E PREDIÇÃO 94
- TABELA 5 – PRÉ-TRATAMENTOS (P.T.) UTILIZADOS PARA QUANTIFICAÇÃO DE OCRATOXINA A, EM AMOSTRAS DE FUNGOS DO GÊNERO *Aspergillus* sp., COM SUAS VARIÁVEIS LATENTES E RESPECTIVOS VALORES DE CALIBRAÇÃO, VALIDAÇÃO, ERROS E PREDIÇÃO 96
- TABELA 6 – PRÉ-TRATAMENTOS (P.T.) UTILIZADOS PARA QUANTIFICAÇÃO DE OCRATOXINA A, EM AMOSTRAS DE FUNGOS DO GÊNERO *Aspergillus* sp., COM SUAS VARIÁVEIS LATENTES, PREDIÇÕES E SOMATÓRIA DOS ERROS DAS PREDIÇÕES..... 98

LISTA DE QUADROS

| | |
|---|----|
| QUADRO 1 –MICOTOXINAS MAIS RELEVANTES PARA A SEGURANÇA ALIMENTAR PRODUZIDAS POR DIFERENTES GÊNEROS DE FUNGOS FILAMENTOSOS..... | 24 |
| QUADRO 2 – PRINCIPAIS MICOTOXINAS ENCONTRADAS EM ALGUNS PRODUTOS AGRO-ALIMENTARES | 25 |
| QUADRO 3 – OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES E CONDIÇÕES UTILIZADAS NAS REAÇÕES DE PCR DE ISOLADOS DE <i>Aspergillus</i> sp. | 60 |
| QUADRO 4 – CONCENTRAÇÕES DOS REAGENTES UTILIZADOS NAS REAÇÕES DE PCR PARA AS DIFERENTES ESPÉCIES DE <i>Aspergillus</i> AVALIADAS NO PRESENTE TRABALHO | 61 |

LISTA DE APÊNDICES

| | |
|---|-----|
| APÊNDICE 1 – CURVA DE CALIBRAÇÃO OBTIDA POR CLAE | 120 |
| APÊNDICE 2 – DETECÇÃO DE OCRATOXINA A NA AMOSTRA 13 A POR CLAE | 121 |
| APÊNDICE 3 – DETECÇÃO DE OCRATOXINA A NA AMOSTRA 13 B POR CLAE | 122 |
| APÊNDICE 4 – DETECÇÃO DE OCRATOXINA A NA AMOSTRA 13 C POR CLAE | 123 |
| APÊNDICE 5 – DETECÇÃO DE OCRATOXINA A NA AMOSTRA 18 B POR CLAE | 124 |
| APÊNDICE 6 – DETECÇÃO DE OCRATOXINA A NA AMOSTRA 10 A POR CLAE | 125 |
| APÊNDICE 7 – DETECÇÃO DE OCRATOXINA A NA AMOSTRA 10 B POR CLAE | 126 |
| APÊNDICE 8 – DETECÇÃO DE OCRATOXINA A NA AMOSTRA 10 C POR CLAE | 127 |
| APÊNDICE 9 – DETECÇÃO DE OCRATOXINA A NA AMOSTRA 11 A POR CLAE | 128 |
| APÊNDICE 10 – DETECÇÃO DE OCRATOXINA A NA AMOSTRA 11 C POR CLAE | 129 |
| APÊNDICE 11 – DETECÇÃO DE OCRATOXINA A NA AMOSTRA 31 A POR CLAE | 130 |
| APÊNDICE 12 – DETECÇÃO DE OCRATOXINA A NA AMOSTRA 31 B POR CLAE | 131 |
| APÊNDICE 13 – DETECÇÃO DE OCRATOXINA A NA AMOSTRA 16 A POR CLAE | 132 |
| APÊNDICE 14 – DETECÇÃO DE OCRATOXINA A NA AMOSTRA 16 B POR | |

| | |
|--|-----|
| CLAE | 133 |
| APÊNDICE 15 – DETECÇÃO DE OCRATOXINA A NA AMOSTRA 16 C POR CLAE | 134 |
| APÊNDICE 16 – DETECÇÃO DE OCRATOXINA A NA AMOSTRA 20 A POR CLAE | 135 |
| APÊNDICE 17 – DETECÇÃO DE OCRATOXINA A NA AMOSTRA 20 C POR CLAE | 136 |
| APÊNDICE 18 – ESPECTROS OBTIDOS POR REFLECTÂNCIA DE TODAS AS AMOSTRAS ANALISADAS..... | 137 |
| APÊNDICE 19 – ESPECTROS OBTIDOS POR TRANSMITÂNCIA DE TODAS AS AMOSTRAS ANALISADAS..... | 137 |
| APÊNDICE 20 – ESPECTRO DO MODELO FUNÇÃO MSC SEM 18 C A PARTIR DE DADOS OBTIDOS POR REFLECTÂNCIA (TABELA 4) | 138 |
| APÊNDICE 21 – ESPECTRO DO MODELO FUNÇÃO MSC SEM 18 C A 20 C A PARTIR DE DAOS OBTIDOS POR REFLECTÂNCIA (TABELA 4)..... | 138 |
| APÊNDICE 22 – ESPECTRO DO MODELO FUNÇÃO MSC A PARTIR DE DADOS OBTIDOS POR TRANSMITÂNCIA (TABELA 4) | 139 |
| APÊNDICE 23 – ESPECTRO DO MODELO FUNÇÃO MSC SEM 10 A A PARTIR DE DADOS OBTIDOS POR TRANSMITÂNCIA (TABELA 4) | 139 |
| APÊNDICE 24 – ESPECTRO DO MODELO FUNÇÃO MSC SEM 10 A E 31 A A PARTIR DE DADOS OBTIDOS POR TRANSMITÂNCIA (TABELA 4) | 140 |
| APÊNDICE 25 – ESPECTRO DO MODELO SEM PRÉ-TRATAMENTO A PARTIR DE DADOS OBTIDOS POR REFLECTÂNCIA (TABELA 4) | 140 |
| APÊNDICE 26 – ESPECTRO DO MODELO SEM PRÉ-TRATAMENTO SEM 16 B A PARTIR DE DADOS OBTIDOS POR REFLECTÂNCIA (TABELA 5) | 141 |
| APÊNDICE 27 – ESPECTRO DO MODELO SEM PRÉ-TRATAMENTO SEM 16 B | |

| | |
|--|-----|
| A PARTIR DE DADOS OBTIDOS POR TRANSMITÂNCIA (TABELA 5) | 141 |
| APÊNDICE 28 – ESPECTRO DO MODELO FUNÇÃO MSC SEM 31 A E 16 B A PARTIR DE DADOS OBTIDOS POR TRANSMITÂNCIA (TABELA 5) | 142 |
| APÊNDICE 29 – ESPECTRO DO MODELO SEM PRÉ-TRATAMENTO A PARTIR DE DADOS OBTIDOS POR REFLECTÂNCIA (TABELA 6) | 142 |
| APÊNDICE 30 – ESPECTRO DO MODELO SEM PRÉ-TRATAMENTO SEM 9 B A PARTIR DE DADOS OBTIDOS POR REFLECTÂNCIA (TABELA 6) | 143 |
| APÊNDICE 31 – ESPECTRO DO MODELO SEM PRÉ-TRATAMENTO A PARTIR DE DADOS OBTIDOS POR TRANSMITÂNCIA (TABELA 6) | 143 |
| APÊNDICE 32 – ESPECTRO DO MODELO FUNÇÃO MSC SEM 31 A E 16 B A PARTIR DE DADOS OBTIDOS POR TRANSMITÂNCIA (TABELA 6) | 144 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFLP – *Amplified Fragment Length Polymorphism* (Análise de polimorfismo de fragmentos amplificados)

AOAC – *Association of Official Analytical Chemists* (Associação oficial dos químicos analíticos)

AP-PCR – *Arbitrary Primed-Polymerase Chain Reaction* (Reação em cadeia da polimerase com oligonucleotídeos arbitrários)

ATR – Reflectância Total Atenuada

A_w – Atividade Água

BDA – Batata Dextrose Ágar

BEN – Nefropatia Endêmica dos Balcãs

CCD – Cromatografia de Camada Delgada

CIA – Clorofórmio Álcool Isoamílico

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CTAB – Brometo de Cetiltrimetilamônio

Da – Dalton

DNA – Ácido Desoxirribonucléico

DON – Deoxinivalenol

EDTA – Ácido Etilenodiaminotetracético

ELISA – *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (Ensaio imunoenzimático)

FIR – Infravermelho distante

FT-IR – *Fourier transform Infrared*

HPLC – *High Performance Liquid Chromatography* (Cromatografia líquida de alta eficiência)

IAPAR – Instituto Agronômico do Paraná

IARC – *International Agency for Research on Cancer* (Agência internacional de pesquisa do câncer)

IR – Infravermelho

ITS – Regiões Espaçadoras Internas do DNA Ribossomal

LabMicro – Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular

MIR – Infravermelho médio

MSC – *Multiplicative Scatter Correction* (Correção do espalhamento multiplicativo)

NaCl – Cloreto de Sódio

NIR – Infravermelho próximo

NIRS – Near Infrared Spectroscopy

OTA – Ocratoxina A

pb – Pares de bases

PCA – *Principal Components Analysis* (Análises de componentes principais)

PCR – *Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)

PCR-m – PCR Multiplex

PKS – Policetídeo Sintetase

PLS – *Partial Least Squares* (Regressão por Mínimos Quadrados Parciais)

P.T. – Pré-tratamento

PVP – Polivinilpirrolidona

RAPD – *Random Amplified of Polymorphic DNA* (Amplificação ao acaso de DNA polimórfico)

rDNA – DNA ribossomal

RNA – Ácido Ribonucléico

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio

TBE – Tris- Borato- EDTA

TLC – *Thin Layer Chromatography* (Cromatografía de camada delgada)

tRNA – RNA transportador

U.V. – Ultra-violeta

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 20 |
| 2 OBJETIVOS | 22 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL | 22 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 22 |
| 3 REVISÃO DE LITERATURA | 23 |
| 3.1 MICOTOXINAS | 23 |
| 3.2 OCRATOXINA A | 25 |
| 3.3 O CAFÉ | 31 |
| 3.3.1 IAPAR 59..... | 34 |
| 3.4 FUNGOS PRODUTORES DE OCRATOXINA A..... | 34 |
| 3.5 O CAFÉ E A OCRATOXINA A | 36 |
| 3.6 MÉTODOS MOLECULARES PARA IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS POTENCIALMENTE PRODUTORES DE OTA..... | 40 |
| 3.7 MÉTODOS PARA DETECÇÃO DE OCRATOXINA A..... | 44 |
| 3.7.1 Espectroscopia por infravermelho próximo (NIRS) | 46 |
| 3.7.1.1 Utilização da espectroscopia por infravermelho na Microbiologia | 50 |
| 4 MATERIAIS E MÉTODOS | 53 |
| 4.1 MEIOS DE CULTURA..... | 53 |
| 4.1.1 Meio batata dextrose ágar (BDA) | 53 |
| 4.1.2 Meio saboraud..... | 53 |
| 4.1.3 Meio ágar coco..... | 54 |
| 4.2 SOLUÇÕES | 54 |
| 4.2.1 Lactofenol de Amann..... | 54 |
| 4.2.2 Tampão CTAB..... | 55 |
| 4.2.3 Clorofil/CIA – clorofórmio álcool isoamílico | 55 |
| 4.2.4 Tampão de extração..... | 55 |
| 4.2.5 Clorofane..... | 56 |
| 4.2.6 TBE 5X | 56 |
| 4.2.7 TBE 1X | 56 |
| 4.3 MATERIAL BIOLÓGICO | 56 |
| 4.4 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS ISOLADOS..... | 57 |
| 4.4.1 Microcultivo | 57 |
| 4.5 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS | 58 |
| 4.5.1 Extração de DNA..... | 58 |
| 4.5.1.1 Método CIA | 58 |
| 4.5.1.2 Método fenol-clorofórmio..... | 59 |
| 4.5.2 PCR..... | 59 |
| 4.6 DETECÇÃO DA PRODUÇÃO DE OCRATOXINA A..... | 61 |
| 4.6.1 <i>Screening</i> em ágar coco..... | 61 |
| 4.6.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)..... | 62 |
| 4.6.2.1 Produção de ocratoxina A | 62 |
| 4.6.2.2 Análise CLAE | 63 |
| 4.6.3 NIRS..... | 64 |
| 4.6.3.1 Produção de ocratoxina A | 64 |

| | | |
|-----------|--|------------|
| 4.6.3.2 | Análise NIRS..... | 65 |
| 4.6.3.2.1 | Transmitância..... | 66 |
| 4.6.3.2.2 | Reflectância total atenuada (ATR)..... | 67 |
| 4.6.3.3 | Análise dos dados da NIRS obtidos por transmitância e reflectância | 69 |
| 5 | RESULTADOS E DISCUSSÕES | 73 |
| 5.1 | CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS ISOLADOS..... | 73 |
| 5.2 | EXTRAÇÃO DE DNA | 76 |
| 5.3 | CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS | 77 |
| 5.4 | PRODUÇÃO DE OCRATOXINA A..... | 80 |
| 5.4.1 | Ágar coco | 80 |
| 5.4.2 | Cromatografia líquida de alta eficiência..... | 84 |
| 5.4.3 | Ágar coco X CLAE..... | 90 |
| 5.5 | NIRS..... | 93 |
| 6 | CONCLUSÕES | 102 |
| 7 | PERSPECTIVAS FUTURAS | 103 |
| | REFERÊNCIAS..... | 104 |
| | APÊNDICES..... | 120 |

1 INTRODUÇÃO

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

A presença da ocratoxina A em alimentos é considerada um problema de saúde pública mundial. Em países com clima tropical, espécies de *Aspergillus* têm sido as principais responsáveis pela produção de Ocratoxina A em café (TANIWAKI *et al.*, 2003). Desta forma, vários estudos têm como objetivo a identificação de espécies de *Aspergillus* que contaminam o café e que são potenciais produtores de Ocratoxina A (MAGNANI, *et al.*, 2005).

A Ocratoxina A deriva do nome de *Aspergillus ochraceus*, do qual foi primeiramente isolada (VAN DER MERWE *et al.*, 1965). Entretanto ela pode ser produzida por vários outros fungos, tais como *A. carbonarius*, *A. niger*, *A. westerdijkiae* e *Penicillium verrucosum* (TÉREN; PALÁGYI; VARGA, 1997; SAMSON *et al.*, 2004; FRISVAD *et al.*, 2004; ABRUNHOSA; SANTOS; VENÂNCIO, 2006). No Brasil, estudos têm demonstrado que *A. ochraceus* (seção *Circumdati*), *A. carbonarius* (seção *Nigri*) e *A. niger* (seção *Nigri*) são as principais espécies responsáveis pela presença de ocratoxina A em grãos de café (MAGNANI *et al.*, 2005).

As técnicas tradicionais para identificação dos fungos produtores de micotoxinas são demoradas e, normalmente, as características morfológicas são insuficientes para distinguir espécies próximas. Para tal, a utilização de marcadores moleculares tem se tornado uma alternativa para uma rápida e específica identificação dos fungos ocratoxigênicos, destacando-se, entre as técnicas, a reação em cadeia da polimerase (PCR) (MORELLO *et al.*, 2007).

Vários efeitos tóxicos da ocratoxina A têm sido descritos, como inibição da síntese de proteínas, estresse oxidativo e danos no DNA (ALMELA *et al.*, 2007; MECA; RITIENI, 2009). Além disso, esta micotoxina é considerada nefrotóxica, citotóxica, carcinogênica, teratogênica e imunossupressora (RINALDI *et al.*, 2007).

Atualmente a detecção e quantificação da ocratoxina A em alimentos são realizadas por meio de cromatografia, entretanto, novas técnicas têm se mostrado mais rápidas e econômicas. Entre essas técnicas, a espectroscopia por infravermelho próximo (NIRS – *Near Infrared Spectroscopy*) tem se tornado, segundo Hernández-Hierro, García-Villanova e González-Martín (2008), uma alternativa à cromatografia na análise de micotoxinas.

O conhecimento da diversidade microbiana presente nos grãos de café e o desenvolvimento de metodologias mais econômicas para detecção de ocratoxina A, são de extrema importância para a elaboração de uma bebida de boa qualidade, mantendo o país como um dos principais produtores e exportadores deste grão.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo geral verificar a produção de Ocratoxina A por fungos do gênero *Aspergillus* isolados de grãos de café, por meio de diferentes metodologias.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar os diferentes isolados fúngicos por meio de macro e micromorfologia;
- Identificar, por meio de oligonucleotídeos iniciadores específicos descritos na literatura, espécies de *Aspergillus* potencialmente produtoras de Ocratoxina A;
- Realizar *screening* em Ágar Coco para verificar quais isolados são potenciais produtores de ocratoxina A;
- Confirmar a produção de Ocratoxina A por HPLC/ CLAE (High *Performance Liquid Chromatography* – cromatografia líquida de alta eficiência);
- Comparar as metodologias de transmitância e reflectância total atenuada (ATR) da NIRS (*Near Infrared Spectroscopy* – espectroscopia por infravermelho próximo) na detecção e quantificação de ocratoxina A.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 MICOTOXINAS

As micotoxinas são produtos do metabolismo secundário (metabólitos que não são essenciais para o seu normal crescimento, desenvolvimento e reprodução) de algumas espécies de fungos, que quando ingeridas por animais, incluindo o homem, causam alterações biológicas prejudiciais à saúde (ABRUNHOSA, 2008).

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

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

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

| Gênero | Micotoxinas |
|--------------------|--|
| <i>Alternaria</i> | Ácido tinuazônico, alternariol, alternariol metil-éter |
| <i>Aspergillus</i> | Aflatoxina B ₁ , G ₁ , M ₁ , ocratoxina A, esterigmatocistina, ácido clicopiazônico |
| <i>Claviceps</i> | Ergo-alcalóides |
| <i>Fusarium</i> | Desoxinivalenol, nivalenol, zearalenona, toxina T-2, diacetoxiscirpenol, fermonisinas, moniliformina |
| <i>Penicillium</i> | Patulina, ocratoxina A, citrina, penitrinina A, ácido clicopiaz |

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

FONTE: STEYN, HOLZAPFEL e FERREIRA (1970) *apud* ABRUNHOSA (2008)

As micotoxinas podem ser encontradas em vários produtos agrícolas, como cereais, milho, frutas secas, frutas, sementes oleaginosas e especiarias. Entretanto, as micotoxinas são capazes de se acumular ao longo da cadeia alimentar, podendo ser encontradas em produtos pecuários, como o leite, ovos e carne de animais (QUADRO 2) (ABRUNHOSA, 2008).

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

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

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

FONTE: ABRUNHOSA (2008)

3.2 OCRATOXINA A

O grupo das micotoxinas designadas como ocratoxinas (ocratoxina A, B e C), caracterizam-se por possuírem uma estrutura molecular que consiste basicamente de uma β -fenilalanina ligada a uma isocumarina, mediante uma ligação amida (FIGURA 1). A ocratoxina A (OTA) caracteriza-se por apresentar fluorescência verde quando exposta luz ultravioleta e possui uma molécula de cloro em sua estrutura, responsável pelo caráter tóxico (EDWARDS; O'CALLAGHAN; DOBSON, 2002). A ocratoxina B apresenta fluorescência azulada, não apresentando toxicidade devido à ausência da molécula de cloro. A ocratoxina C, com fluorescência verde, constitui um etil éter da ocratoxina A, sendo muito menos tóxica que essa. A fluorescência da OTA é usada para a revelação em cromatografia de camada delgada (CCD) e para sua detecção por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (ABRUNHOSA, 2008).

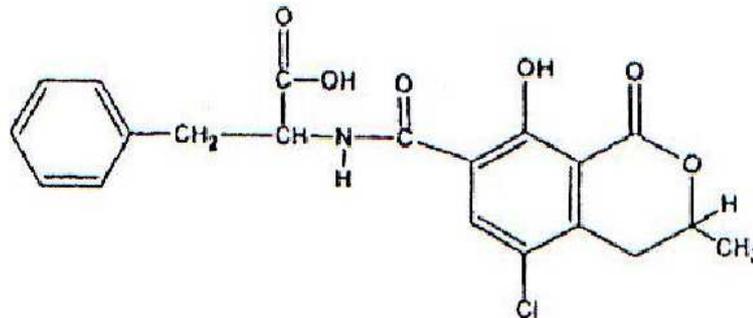


FIGURA 1 – ESTRUTURA QUÍMICA DA OCRATOXINA A
 FONTE: VAN DER MERWE *et al.* (1965)

A OTA possui a fórmula empírica $C_{20}H_{18}O_6NCl$ com um peso molecular de 403.822 Da. É altamente solúvel em solventes orgânicos polares, solúvel em solução aquosa de hidrogenocarbonato de sódio, fracamente solúvel em água e termoestável (COLE; JARVIS; SCHWEIKERT 2003 *apud* ABRUNHOSA, 2008).

Sabe-se que a ocratoxina C pode ser convertida em ocratoxina A, Fuchs *et al.* (1984) analisaram esta conversão administrando as toxinas de forma oral e intravenosa em ratos. Foi observado que a ocratoxina C é realmente convertida em ocratoxina A.

Segundo Gallo *et al.* (2009), a biossíntese da OTA ainda não foi totalmente elucidada, embora várias vias já tenham sido propostas. Sabe-se, atualmente, que a parte isocumárica é um pentacédeo sintetizado através de uma via metabólica dos policetídeos e que a L-β-fenilalanina deriva da via metabólica do ácido xiquímico (STEYN; HOLZAPFEL; FERREIRA, 1970 *apud* ABRUNHOSA, 2008).

Não existe muita informação sobre os genes responsáveis pelos passos da biossíntese da ocratoxina A. Entretanto, seriam, no mínimo, necessários genes que codifiquem para uma policetídeo sintetase (PKS), responsável pela síntese da isocumarina; para uma metilase, responsável pela formação do grupo carboxílico; para uma OTA sintetase, responsável por ligar a L-β-fenilalanina à isocumarina e para uma cloroperoxidase ou uma halogenase responsável pela introdução do cloro (ABRUNHOSA, 2008; GALLO *et al.*, 2009).

A contaminação por OTA pode ocorrer principalmente na pré-colheita e em condições de pós-colheita em cereais como trigo, milho, centeio, cevada e aveia.

Também ocorre em amendoim, café, pão, arroz e frutos secos. A presença de OTA nos produtos alimentares tais como café, vinho, cerveja e carnes, é devido à sua relativa estabilidade química durante o processamento industrial (AL-ANATI; PETZINGER, 2006). Outros itens alimentares, como leite, tecidos animais, músculos, órgãos e ovos também podem ser contaminados (DINIS; LINO; PENA, 2007).

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

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

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

Vários efeitos tóxicos da OTA têm sido descritos, como inibição da síntese protéica, indução da peroxidação de lipídios, estresse oxidativo e danos no DNA, em

espécies e tecidos específicos diferentes (ALMELA *et al.*, 2007; AL-ANATI; PETZINGER, 2006). Entretanto, esta micotoxina é ainda considerada nefrotóxica, citotóxica, carcinogênica, teratogênia e imunossupressora (SUÁREZ-QUIROZ *et al.*, 2004, ABRUNHOSA; SANTOS; VENÂNCIO, 2006, GHALI *et al.*, 2008, LINO *et al.*, 2008, DACHOUPAKAN, *et al.*, 2009, ZHANG *et al.*, 2009). Ela ainda pode induzir mutações gênicas através de mecanismos genotóxicos ainda não muito claros (RINALDI *et al.*, 2007).

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

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

Os efeitos citotóxicos da OTA estão baseados na inibição e/ou ativação de enzimas, várias das quais utilizam a fenilalanina como um substrato, pois a OTA é um análogo deste aminoácido (AL-ANATI; PETZINGER, 2006). Acredita-se que a fração fenilalanina da molécula de OTA interage como um substrato substituto. A principal enzima alvo é a fenilalanina-tRNA sintetase, a qual é inibida pela OTA em procariontes, micro-organismos eucarióticos, células de mamíferos e em experimentos com animais *in vivo*. Esta inibição causa a redução da síntese protéica, além disso, a síntese de RNA e a síntese de DNA são alvos da toxicidade da OTA (STORMER; LEA, 1995 *apud* AL-ANATI; PETZINGER, 2006).

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

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

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

A teoria da micotoxina sobre a origem da nefropatia endêmica é baseada na analogia entre lesões de rins de porcos causadas pelo OTA em países escandinavos e lesões em rins humanos em pacientes com a nefropatia endêmica (KROGH, 1974 *apud* PERAICA *et al.*, 2008). Vários estudos que envolvem as micotoxinas na etiologia da nefropatia endêmica tentaram provar que pessoas que residiam em áreas endêmicas eram mais expostas a OTA que pessoas que residiam em outras regiões. Porém, baixas concentrações de OTA têm sido frequentemente encontradas em alimentos e sangue de pessoas residentes em áreas endêmicas e em sangue de pessoas com doenças renais crônicas em todo o mundo. Mas, este fato não descarta a teoria que as micotoxinas estão envolvidas no desenvolvimento da nefropatia endêmica, pois pessoas em áreas endêmicas estão expostas a quantidades variáveis de OTA que frequentemente excedem a exposição de áreas não endêmicas. Ainda, os alimentos nunca são contaminados com uma única linhagem de fúngica, e outras micotoxinas nefrotóxicas podem ser produzidas por fungos que produzem a OTA (PERAICA, 2008).

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

Estudos têm demonstrado que a OTA está relacionada com o estresse oxidativo, medido por um aumento da peroxidação em lipídios e danos no DNA de cérebros de camundongos, características que estão associadas com um número de desordens neurodegenerativas incluindo as doenças de Parkinson e Alzheimer (SAVA; REUNOVA; VALASQUEZ, 2006). Segundo, Zhang *et al.* (2009) a OTA pode contribuir

para o surgimento de doenças neurodegenerativas, como as doenças de Parkinson e Alzheimer, nas quais o processo de apoptose está envolvido.

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

Atualmente várias pesquisas estão sendo realizadas para encontrar processos pelos quais os alimentos venham a ser descontaminados da ocratoxina A. Segundo Abrunhosa, Santos e Venâncio (2006) as estratégias mais aplicadas usam adsorventes como os aluminossilicatos ou a atividade do carvão vegetal para removê-la. Outros utilizam métodos químicos como a amônia ou o peróxido de hidrogênio para inativar a OTA, ou diclorometano para extraí-la. Entretanto, essas estratégias acabam levando a uma perda significativa do valor nutricional, bem como alterando o sabor do alimento. A biodegradação é considerada a melhor solução para a descontaminação. Vários trabalhos foram realizados utilizando micro-organismos ou culturas celulares, como, fungos filamentosos, protozoários, bactérias, leveduras ou culturas celulares de plantas (ABRUNHOSA; SERRA; VENÂNCIO, 2002; ÖZPINAR *et al.*, 2002; PIOTROWSKA; ZAKOWSKA, 2000; SCHATZMAYR *et al.*, 2003; RUHLAND; ENGELHARDT; WALLNOFER, 1996 *apud* ABRUNHOSA; SANTOS; VENÂNCIO, 2006).

Em trabalho publicado por Abrunhosa, Serra e Venâncio (2002), fungos filamentosos isolados de uvas portuguesas foram avaliadas quanto à capacidade de degradação da ocratoxina A. Observou-se que 51 das 76 linhagens testadas, predominantemente espécies de *Aspergillus*, foram capazes de degradar mais que 80% da ocratoxina adicionada à cultura. As espécies com maior potencial de degradação (mais de 95%) foram os *Aspergillus* negros, *A. clavatus*, *A. ochraceus*, *A. versicolor* e *A. wentii*. Outros fungos frequentemente isolados de uvas, tais como, *Alternaria*, *Botrytis*, *Cladosporium* e *Penicillium*, também mostraram significativa capacidade de

degradação. Observou-se também que os compostos obtidos da degradação da ocratoxina A por linhagens de *Aspergillus* negros, de *A. ochraceus* e *A. wentii* foram diferentes.

Abrunhosa, Santos e Venâncio (2006) avaliaram a habilidade de várias proteases comerciais de hidrolizar a ocratoxina A. Foi observado que a protease A e pancreatina exibiram uma atividade hidrolítica sobre a ocratoxina A e somente uma enzima comercial foi ativa contra a ocratoxina A em pH ácido (Prolyve PAC).

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

3.3 O CAFÉ

O gênero *Coffea* L., 1753, apresenta aproximadamente 100 espécies de cafeeiros, destes, o *Coffea arabica* L., 1753, e *C. canephora* Pierre ex. A. Froehner, 1879, são os mais comercializados (CARVALHO *et al.*, 2001). As evidências botânicas sugerem que a planta do café originou-se na Etiópia Central e os holandeses foram os primeiros a iniciar o seu cultivo comercial em 1658. No Brasil, as primeiras sementes e mudas foram plantadas em Belém do Pará em 1769 e somente em 1820, o Brasil foi considerado um exportador de café (IBC/GERCA, 1981).

A primeira estimativa da produção de café (arábica e conilon) da safra 2010 indica que o Brasil poderá colher entre 45,89 e 48,66 milhões de sacas de 60 quilos do produto beneficiado. Se confirmado o intervalo superior, esta será a maior colheita da história, superando em 0,37% a do ciclo 2002/03, que foi de 48,48 milhões de sacas. A

nova projeção, em relação às 39,47 milhões de sacas produzidas no ano passado, mostra um crescimento entre 16,3% e 23,3%. O principal motivo do incremento é a bienalidade positiva da cultura, com ocorrência de colheita cheia. O ciclo bienal registra um ano com grande florada dos cafezais, seguido de outro com pequena florada. Este fenômeno se deve ao esgotamento da planta, que precisa de 12 meses para se recuperar e produzir. Outro fator a favor na temporada atual é o regime de chuvas regulares na primavera, coincidindo com a fase de floração nas regiões produtoras (CONAB, 2010).

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

O café é um produto agrícola de extrema importância econômica e social para o Brasil. Embora nos últimos anos, a cultura do café tenha se estendido por muitas outras regiões do mundo, o Brasil ainda é o maior produtor mundial de café, à frente do Vietnã (16,5 milhões de sacas), da Indonésia (9,35 milhões de sacas) e da Colômbia (8,1 milhões de sacas) (CONAB, 2010). A concorrência de mercado tem exigido constante preocupação com a qualidade do produto, pois é um dos poucos produtos agrícolas que tem seus preços baseados em parâmetros qualitativos.

A bebida do café é fator importante na comercialização do produto e a sua caracterização é feita por degustadores (prova de xícara). O café brasileiro é classificado em tipo e bebida. O tipo se refere aos defeitos existentes no café, como grãos deteriorados, pretos, ardidos, verdes, quebrados, conchas, chochos, cocos marinheiros, cascas, torrões, pedras, etc (PIMENTA; VILELA, 2003).

A “prova da xícara” é uma prova subjetiva em que provadores treinados distinguem diferentes padrões de bebida. Esta é realizada com o café preparado para ser degustado, sendo avaliado quanto ao seu sabor e aroma. Tecnicamente, a classificação oficial do café pela bebida, denominados padrões de bebida, recebem as seguintes denominações: Estritamente Mole, bebida de sabor suavíssimo e adocicado; Mole, bebida de sabor suave, acentuado e adocicado; Apenas Mole, bebida de sabor

suave com leve adstringência; Dura, bebida com sabor adstringente e gosto áspero; Riada, bebida com leve sabor de iodofórmio ou ácido fênico; Rio, bebida com sabor forte e desagradável lembrando iodofórmio ou ácido fênico; Rio Zona, bebida de sabor e odor intoleráveis ao paladar e ao olfato. São denominações técnicas que mostram a variedade de sabor e qualidade e que interferem também na cotação do seu preço no mercado (CARVALHO; CHALFOUN, 1999).

A influência de fatores como a composição química dos grãos, determinada por fatores genéticos, ambientais e culturais, os métodos de colheita, processamento e armazenamento, são importantes por afetarem diretamente a qualidade da bebida do café. A torração e o preparo da bebida modificam a constituição química dos grãos, no entanto, essas alterações são dependentes da composição original dos mesmos (LOPES, 2000).

Os fatores que afetam o crescimento de fungos nos grãos são, principalmente, teor de umidade dos grãos, temperatura, tempo, condição física (grãos quebrados) e sanitária do grão, nível de inóculo do fungo, conteúdo de oxigênio, tempo armazenamento dos grãos, insetos, ácaros, brocas e outros. A invasão de um lote de grãos por insetos pode iniciar ou agravar o desenvolvimento de fungos, pois através de sua atividade metabólica há um aumento de teor de umidade e temperatura da massa dos grãos (PEZZINI; VALDUGA; CANSIANI, 2005).

Quando o grão de café encontra-se no estágio cereja, sua polpa apresenta elevada concentração de açúcares, o que a torna atrativa não apenas para microrganismos como também para insetos. Assim, os insetos perfuram a epiderme dos frutos para se alimentarem e para procriarem. Após a perfuração da epiderme pelos insetos, a entrada de micro-organismos fica facilitada, permitindo o início da fermentação dos grãos antes da colheita dos frutos, deteriorando a qualidade da bebida (CAMARGO, 1947; BAPTISTA, HORII, BAPTISTA, 2004).

A microbiota associada aos grãos de café é bastante diversificada e está diretamente relacionada a alguns sabores e aromas característicos da bebida. Nas bebidas tipo rio e riada, a infecção por *Aspergillus* é elevada, o que pode estar relacionado com a taxa de umidade superior a 10% encontrada nestes grãos

beneficiados. Nos cafés de bebida mole a infecção pelo gênero *Aspergillus* é menor (PIMENTA; CHALFOUN, 2001).

3.3.1 IAPAR 59

O cultivar IAPAR 59, utilizado no presente estudo, originou-se do cruzamento entre *Coffea arabica*, Villa Sarchi 971/10 e o Híbrido de Timor 832/2, realizado no Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro em Portugal, onde recebeu a denominação de H361. Após bom desempenho nas regiões de Londrina, Loanda e Carlópolis, no estado do Paraná, foi lançada como variedade, passando a receber a denominação de IAPAR 59. A média da produção anual por planta demonstrou que a variedade é altamente competitiva, no mesmo espaçamento, em comparação com as variedades comerciais em uso, com a vantagem de não necessitar tratamentos químicos para o controle da ferrugem. É preferencialmente indicada para regiões mais frias e chuvosas, por amadurecer mais precoce e uniformemente que Catuaí, antecipando a colheita e escapando do dano das geadas precoces sobre frutos verdes. Deve ser plantada preferencialmente em partes altas da propriedade, onde o calor e a geada são menos intensos (IAPAR, 2007).

3.4 FUNGOS PRODUTORES DE OCRATOXINA A

Diversos exemplares de grãos de café, tanto Arábica quanto Robusta, indicam estarem contaminados com OTA. Tais contaminações são mais frequentes em algumas áreas, incluindo principalmente países africanos, entretanto, nenhuma área produtora de café está livre de tal contaminação (TANIWAKI, 2006).

Relatos da literatura apontam que a potencialidade em produzir ocratoxina A está associada a dois gêneros fúngicos: *Aspergillus* e *Penicillium*. Dentre os representantes

do gênero *Aspergillus* seção *Circumdati* destacam-se: *A. flocculosus*, *A. Neopetromyces*, *A. muricatus*, *A. ochraceus*, *A. roseoglobulosus*, *A. sclerotiorum*, *A. westerdijkiae*, *A. sulphureus*, *A. steynii*, *A. cretensis*, *A. elegans*, *A. pseudoelegans*, *A. melleus*, *A. ostianus*, *A. persii* e *A. petrakii*. Outras duas seções também apresentam espécies produtoras de OTA *A. glaucus* como representante da seção *Aspergillus*, e como representantes da secção *Nigri*: *A. niger* var. *niger*, *A. carbonarius*, *A. lacticoffeatus* e *A. sclerotioniger*. Em *Penicillium*, a ocratoxina A foi primeiramente detectada em *P. viridicatum*. Entretanto, Pitt (1987) associou a produção de OTA apenas a isolados de *P. verrucosum*. Posteriormente, *P. chrysogenum* e *P. nordicum* também foram relatados como produtores de ocratoxina A (MORELLO *et al.*, 2007).

As seções *Nigri* e *Circumdati* compõem, juntamente com as seções *Flavi*, *Wentii*, *Candidi*, *Cremeri* e *Sparsi* o subgênero *Circumdati* (KLICH, 2006). As espécies de *Aspergillus* representantes da seção *Circumdati* apresentam conídios variando do amarelo ao ocre (SAMSON; HONG; FRISVAD, 2006), já as espécies representantes da seção *Nigri* apresentam conídios negros ou próximos de negros (PERRONE *et al.*, 2007).

Embora haja grande discrepância entre o número de espécies produtoras de ocratoxina A e entre representantes pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, pesquisas apontam que em países de clima tropical, as espécies pertencentes ao gênero *Aspergillus* são as principais responsáveis pela produção de OTA em alimentos e as espécies de *Penicillium* são mais comuns em climas temperados (WHO, 2002).

No Brasil, estudos têm demonstrado que *Aspergillus ochraceus* (seção *Circumdati*), *A. carbonarius* (seção *Nigri*) e *A. niger* (seção *Nigri*) são as principais espécies responsáveis pela presença de ocratoxina A em grãos de café (MAGNANI *et al.*, 2005). Pesquisas sugerem que *A. ochraceus* é a principal fonte de contaminação de OTA em café (STACK *et al.*, 1983).

Frisvad *et al.* (2004) e Fungaro *et al.* (2004) observaram características específicas de *A. ochraceus* e propuseram a subdivisão da espécie *A. ochraceus* em duas: *A. ochraceus* e *A. westerdijkiae*. Através de análises dos dados genotípicos obtidos por Fungaro *et al.* (2004) e a reorganização taxonômica proposta por Frisvad *et*

al. (2004), foi possível concluir que a espécie *A. westerdijkiae* é uma das principais responsáveis pela presença de ocratoxina A no café produzido no Brasil.

A taxonomia da seção *Nigri* não está completamente resolvida. Estudos moleculares suportam a divisão da espécie *A. niger* em duas espécies indistinguíveis morfológicamente: *A. niger* (produtor de OTA) e *A. tubingensis* (não produtor de OTA) (PERRONE, et al. 2006).

Diferentes espécies de *Aspergillus* da seção *Nigri* foram relatadas em grãos de café em diferentes países, sendo *A. niger* e *A. carbonarius* mais frequentes. Em um estudo de grãos de café Arábica por Taniwaki et al. (2003), observou-se que *A. niger* foi a espécie mais encontrada (63%), entretanto somente 3% foram capazes de produzir OTA. Também foi relatada a presença de *A. ochraceus* (31% dos isolados), e 75% deles foram capazes de produzir OTA. *A. carbonarius* (6%) foi encontrado somente em amostras de regiões mais quentes e em grãos armazenados, porém 77% dos isolados de *A. carbonarius* foram capazes de produzir OTA.

Martins, Martins e Gimeno (2003), usaram métodos convencionais de identificação de isolados de grãos de café e o gênero *Aspergillus* se mostrou predominante, com *A. niger* (83,3%), *A. ochraceus* (53,3%) e *A. flavus* (25%). Magnani et al. (2005), identificaram isolados de grãos de café através do sequenciamento da região ITS e encontraram uma alta incidência (82%) de fungos potencialmente produtores de OTA, sendo *A. niger* o mais frequente, seguido por *A. ochraceus* e *A. carbonarius*. É importante observar, entretanto, que a microbiota nos grãos de café é significativamente diferente em outros países e em diferentes tipos de café.

3.5 O CAFÉ E A OCRATOXINA A

Vários países estabeleceram limites máximos de ocratoxina para diversos cereais e outros produtos. Em 1999, nos Estados Unidos, recomendavam uma ingestão máxima de 100ng/kg por semana, já o Canadá apresentou uma maior restrição, de 1,5 – 5,7 ng/kg por dia. Em 2007 ocorreu uma reavaliação desses valores, sendo que a

Europa abaixou o limite para 1,14 – 2,24 ng/kg ao dia. Entretanto, nos Estados Unidos foram mantidos os mesmo valores (JECFA, 2007). O Brasil não possui qualquer regulamentação para os níveis de ocratoxina nos alimentos (PRADO *et al.*, 2000).

A União Européia também introduziu limites de OTA para o café, como 5 µg/kg de café torrado e 10 µg/kg de café solúvel. Certos países impuseram limites também para café verde de 8-20 µg/kg (LEONG *et al.*, 2007).

Segundo Joosten *et al.* (2001), um estudo mostrou que mais de 80% da OTA originalmente presente nos grãos de café verde é destruída durante o processo para obtenção de café solúvel sob condições industriais. Estima-se que uma xícara de café solúvel contém por volta de 2,5 ng de OTA.

Países como Espanha, Itália e Holanda vêm avaliando a qualidade de lotes de café brasileiro e no ano de 2002, dois alertas máximos (em março e abril), foram expedidos pela União Européia ao Itamarati - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, sobre a devolução de lotes de café brasileiro exportado com níveis indesejáveis de OTA (BEUX, 2004).

A produção de OTA pode ocorrer no café em processos de pós colheita, estocagem e transporte. O conhecimento de fatores que promovem a produção de OTA pode ajudar no controle de processos envolvidos e na redução da incidência da contaminação pela toxina (SUÁREZ-QUIROZ *et al.*, 2004).

Umidade, temperatura, o tipo de substrato e alguns outros fatores desempenham um importante papel no desenvolvimento de linhagens produtoras de OTA. Os fatores que afetam o desenvolvimento dos fungos durante a estocagem são atividade água (A_w) e temperatura. As condições para o crescimento de fungos e a produção de OTA nos grãos de café, tais como a atividade água, têm sido descritos (TANIWAKI *et al.*, 2001 *apud* SUÁREZ-QUIROZ *et al.*, 2004).

Suárez-Quiroz *et al.* (2004), estudaram o efeito da atividade água (A_w) na produção de OTA, sendo ela, uma das principais responsáveis pelo crescimento dos fungos e produção de toxina. A atividade água ótima para o crescimento do fungo e produção de toxina foi de 0,95. O estágio crítico no processamento do café foi a secagem, pois nesta fase, as condições são propícias para *A. ochraceus* por até 2 dias. Os autores obtiveram resultados semelhantes aos publicados por Taniwaki *et al.*,

(2001). Nas A_w de 0,8, 0,87 e 0,95 observou-se produção de OTA de 0,15, 2500 e 7200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ respectivamente.

A presença de OTA em grãos de café verde tem sido reportada por vários autores em concentrações variando entre 0,2 a 360 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (NOONIM *et al.*, 2008).

Micco *et al.* (1989), avaliaram 627 amostras de grãos de café verde provenientes do Brasil, Costa Rica, México e África. Afirmaram que 56 (9%) estavam contaminadas com OTA em níveis que variavam entre 0,5 e 360 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Furlani, Oliveira e Soares (1998), analisaram 50 amostras de café verde dos estados do Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Espírito Santo, Roraima e Bahia. Os autores encontraram OTA em 15 (30%) amostras, em níveis que variaram entre 0,8 a 117,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Burdaspal e Legarda (1998), analisaram 37 amostras de café torrado comercializados na Espanha concluindo que todas apresentaram contaminação, com níveis de OTA entre 0,19 a 5,65 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Romani *et al.* (2000), analisaram um total de 162 amostras de grãos de café verde de vários países (84 da África, 60 da América e 18 da Ásia) quanto a concentração de OTA. Os resultados mostraram que 106 amostras foram positivas para OTA, com concentrações variando entre 0 e 48 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Verificou-se ainda que as amostras provenientes da África foram as mais contaminadas, sendo que as maiores concentrações (18 e 48 $\mu\text{g}/\text{kg}$) foram encontradas em 2 amostras do Congo.

Em um estudo realizado por Taniwaki *et al.* (2003), o maior responsável pela produção de OTA no café brasileiro foi o *A. ochraceus*. Dos 269 isolados desta espécie, 75% foram capazes de produzir a micotoxina. *A. carbonarius* também foi encontrado, e, apesar de ser muito menos comum, esta espécie também se mostrou potencialmente produtora de OTA em café. Poucos grãos cerejas das árvores foram infectados por estas espécies, indicando que a infecção ocorre, na maioria das vezes, após a colheita, e as prováveis origens dos fungos são o solo, equipamentos e superfícies dos pátios de secagem. *A. niger* foi mais comum que *A. ochraceus* ou *A. carbonarius*, mas somente uma baixa porcentagem (3%) desses isolados foi capaz de produzir OTA, portanto, esta espécie não é provavelmente uma origem de grande importância de OTA em café. A ocratoxina A foi encontrada em alguns exemplares, mas a ocorrência foi esporádica. Só

7% das 135 amostras apresentaram níveis superiores a 5 µg/kg, e em alguns casos, estes valores foram encontrados em locais que apresentavam práticas pobres de colheita, secagem e estocagem.

Taniwaki (2006), verificou a presença de OTA em grãos cereja da árvore, amadurecidos da árvore, amadurecidos do solo, secagem e armazenamento encontrando os seguintes valores 0,1, 0,2, 1,6, 2,1 e 3,3 µg/kg respectivamente. Somente 9 das 135 amostras analisadas excederam 5 µg/kg de OTA, e 1 amostra excedeu 100 µg/kg de OTA.

Batista e Chalfoun (2007), verificaram a incidência de OTA em café mistura, bóia e varrição em três tipos de terreiros: terra, cimento e asfalto. Das 238 amostras analisadas em 40% não foi detectada a presença de OTA, entretanto, em 31% das amostras foram detectadas a presença de OTA com níveis que variaram de 0,1 a 5,0 µg/Kg de café.

Noonim *et al.* (2008), verificaram os níveis de ocratoxina em grãos de café tailandeses, analisados por CLAE e ELISA, e observaram diferentes níveis de ocratoxina A em grãos de café arábica (0,6 a 5,5 µg/kg) e grãos de café robusta (1 a 27 µg/kg). Os isolados que produziram maior quantidade de OTA foram: *A. westerdijkiae*, *A. steynii* e *A. carbonarius*.

Batista *et al.* (2009), estudaram a incidência de OTA em diferentes amostras de café. Uma alta incidência de fungos filamentosos foi observada nessas amostras, sendo os principais responsáveis pela produção de OTA: *A. ochraceus*, *A. sulphureus* e *A. sclerotiorum*. Em 128 amostras (44%) não foram detectados níveis de OTA, porém, em 89 amostras (31%) foram encontrados níveis entre 0,1 e 5,0 µg/Kg. Em outros 25% das amostras a contaminação por OTA foi acima de 5,0 µg/Kg.

Almeida *et al.* (2007), analisaram a contaminação por OTA em amostras de café instantâneo coletados nos mercados de São Paulo. Foi observado que das 82 amostras analisadas, 81 (98,8%) estavam contaminadas por OTA com níveis que variavam de 0,17 e 6,29 ng/g.

3.6 MÉTODOS MOLECULARES PARA IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS POTENCIALMENTE PRODUTORES DE OCRATOXINA A

As técnicas tradicionais para a identificação de fungos em alimentos exigem o cultivo do micro-organismo por 5 a 7 dias, não fornecem indicação da biomassa fúngica, são pouco sensíveis e detectam apenas a presença de células viáveis (SARTORI *et al.*, 2006).

Por tais motivos, vários métodos moleculares têm sido usados para estudos genotípicos e fenotípicos de *Aspergillus* spp. (DACHOUPAKAN *et al.*, 2009) e para a detecção dessas linhagens em exemplares agrícolas (SARTORI *et al.*, 2006). Os principais alvos para a detecção, ao nível de gênero, incluem o gene que codifica para RNA ribossomal 18S, DNA mitocondrial, região do espaço intergênico e regiões espaçadoras internas do DNA ribossomal (ITS). As regiões ITS, localizadas entre os genes 18S e 28S do rDNA, são áreas de particular importância na discriminação entre espécies relacionadas ou ao nível intraespecífico, pois essas regiões possuem áreas de alta variabilidade. As regiões ITS tem sido usadas para a identificação de espécies de *Aspergillus* e para discriminar possíveis *Aspergillus niger* produtores de OTA, além de outras espécies de *Aspergillus* da seção *Nigri* por ensaios de PCR (DACHOUPAKAN *et al.*, 2009).

Quanto à ocratoxina A, é conhecido, até o momento, apenas parte de um gene envolvido em sua biossíntese. O gene de *A. ochraceus* denominado *pks* codifica uma poliketídeo sintetase envolvida na biossíntese de OTA (O'CALLAGHAN; CADDICK; DOBSON, 2003). Enquanto não se conhecem os genes envolvidos na via biossintética da OTA, a fim de se obter sequências alvo para a detecção destes fungos em amostras de alimentos, metodologias alternativas surgem, como o desenvolvimento de oligonucleotídeos iniciadores para análises de *fingerprints* (RAPD ou AFLP), capazes de detectar sequências específicas e empíricas.

As sequências alvo ditas empíricas são aquelas que não pertencem aos genes da biossíntese de micotoxinas, mas que sua presença está associada somente a

linhagens ou espécies com capacidade de produzir a micotoxina (SARTORI *et al.*, 2006).

Uma das formas que vem sendo utilizada para se chegar a este tipo de sequência é por meio da análise comparativa de perfis de RAPD (Polimorfismos de DNA Amplificados ao Acaso) de linhagens ou espécies afins toxigênicas e não toxigênicas. Esta técnica foi desenvolvida independentemente por dois grupos nos Estados Unidos. Williams *et al.* (1990) denominaram a tecnologia como RAPD, ou seja, *Random Amplified of Polymorphic DNA*, enquanto Welsh e McLelland (1990), propuseram a denominação AP-PCR (*Arbitrary Primed-Polymerase Chain Reaction*), isto é, Reação em Cadeia da Polimerase com Oligonucleotídeos Arbitrários, já que os oligonucleotídeos possuem sequência arbitrária, mas a amplificação não ocorre ao acaso e sim em lugares específicos do genoma.

Na técnica RAPD, a PCR utiliza apenas um iniciador arbitrário por reação e a amplificação ocorre quando esta mesma sequência reconhecer um sítio de homologia em uma das fitas e também o mesmo sítio, com orientação invertida, na outra fita da molécula de DNA (WILLIAMS *et al.*, 1990). Uma das grandes vantagens do RAPD é que não se escolhe *a priori* a região a ser amplificada (FUNGARO; VIEIRA, 2001 *apud* SERAFINI; BARROS; AZEVEDO, 2001). Os polimorfismos gerados após amplificação com iniciadores arbitrários são reconhecidos pela ausência ou presença de fragmentos amplificados num genótipo em relação a outro (FUNGARO *et al.*, 2004).

Segundo Sartori *et al.* (2006), o desenvolvimento da metodologia de AFLP (*Amplified Fragment Length polymorphism* - Análise de Polimorfismo de Fragmentos Amplificados), descrita por Vos *et al.* (1995), também passou a contribuir na identificação de sequências empíricas passíveis de distinguir espécies ou até mesmo, linhagens toxigênicas e não toxigênicas. A técnica baseia-se na amplificação de um subconjunto de fragmentos gerados a partir da clivagem do DNA genômico com combinações de enzimas de restrição, que clivam o DNA em sítios específicos de corte raro e de corte frequente. A técnica utiliza a propriedade que certas enzimas de restrição tem, de deixar após a clivagem do DNA, extremidades coesivas de sequências reconhecidas. Assim, é possível construir sequências de nucleotídeos de fita dupla que se ligam às extremidades dos fragmentos de restrição, denominados “adaptadores”.

Uma vez que a seqüência dos adaptadores e a do sítio de restrição são conhecidas, pode-se construir oligonucleotídeos iniciadores específicos a essas seqüências.

Um fragmento de RAPD ou AFLP que estiver presente em uma dada espécie toxigênica, porém ausente em qualquer outra deve ser clonado e sequenciado para que posteriormente oligonucleotídeos iniciadores específicos sejam sintetizados. Estes oligonucleotídeos iniciadores poderão ser utilizados em reações de PCR específica para uma dada espécie ou linhagem (SARTORI *et al.*, 2006).

Embora seja um método indireto de detecção de fungos toxigênicos, a PCR tem como grande vantagem, sobre outros métodos, o tempo de detecção reduzido de dias para apenas algumas horas. Uma outra vantagem que se aplica a fungos toxigênicos é que esta técnica permite diagnosticar micro-organismos, mesmo que estes não sejam mais viáveis. Assim, uma amostra que foi contaminada em um dado momento, fornecerá resultado positivo, indicando a possibilidade de conter micotoxinas uma vez que estas são altamente estáveis. A reação de PCR também tem permitido a quantificação da biomassa fúngica através do procedimento chamado PCR em Tempo Real (JORDAN, 2000).

Chamberlain *et al.* (1988), descreveram uma outra variante da PCR, a PCR Multiplex (PCR-m), que consiste na amplificação de várias seqüências alvo simultaneamente, devido ao uso de vários pares de oligonucleotídeos iniciadores em uma mesma reação. A PCR-m permite a amplificação simultânea de determinados locos em diferentes organismos, ou então de diferentes locos de um mesmo organismo.

Schmidt *et al.* (2003), utilizaram a técnica de AFLP para avaliar o parentesco genético de 70 amostras de *Aspergillus ochraceus* isoladas de café brasileiro. Três linhagens de *A. ochraceus* foram selecionadas para que suas seqüências de nucleotídeos fossem utilizadas para a construção de marcadores específicos. Fragmentos únicos de AFLP para *A. ochraceus*, foram selecionados e cortados do gel, em seguida foram clonados e seqüenciados. As seqüências obtidas foram analisadas em banco de dados e nenhuma similaridade foi encontrada, sendo então, utilizadas para o desenho de oligonucleotídeos iniciadores. Estes foram, então, sintetizados e avaliados quanto à sensibilidade e especificidade para detecção de *A. ochraceus*, amplificando um fragmento de 260 pb.

Utilizando a técnica do RAPD, para se chegar a uma sequência empírica, Fungaro *et al.* (2004), desenvolveram um par de oligonucleotídeos iniciadores específico para detecção de *Aspergillus carbonarius* em grãos de café. Linhagens representantes de espécies altamente relacionadas da seção *Nigri* (*A. carbonarius*, *A. tubingensis* e *A. niger*) foram analisadas quanto ao perfil de RAPD com o objetivo de identificar sequências específicas de *A. carbonarius*. A clonagem e sequenciamento de uma das bandas de RAPD permitiu o desenho de um par de oligonucleotídeos iniciadores espécie-específico. O fragmento amplificado pelo par de oligonucleotídeos iniciadores desenvolvido apresenta 809 pb.

Em 2006, Sartori *et al.*, desenvolveram o par de oligonucleotídeos iniciadores específico para *Aspergillus niger*. Para tal, a estratégia desenvolvida foi baseada também em RAPD. Uma análise prévia foi realizada para a identificação de isolados *A. niger*, pois a identificação dos representantes da seção *Nigri* é muito complicada. Foram encontrados 2 *clusters* principais através da análise da sequência de nucleotídeos da região ITS1-5.8S-ITS2. O grupo 1 foi identificado como *A. niger* e o grupo 2 como *A. tubingensis*. Somente 3 nucleotídeos separaram a sequência de *A. niger* e *A. tubingensis* na região ITS1-5.8S-ITS2. Algumas linhagens de *A. niger* têm sido descritas como potenciais produtoras de ocratoxina A, entretanto nenhuma linhagem de *A. tubingensis* é capaz de produzir ocratoxina A. Comparando o perfil destas duas espécies vários produtos amplificados foram característicos de *A. niger*. Um desses produtos foi clonado e sequenciado dando origem ao par de oligonucleotídeos iniciadores específicos para *A. niger*, amplificando um fragmento de 372 pb.

Morello *et al.* (2007), utilizaram sequências da β - tubulina para analisar vários isolados obtidos de grãos de café no Brasil e identificados como *A. ochraceus*, comparando-os com *A. westerdijkiae*. Cerca de 84% desses isolados foram reconhecidos como *A. westerdijkiae* e 71% deles foram capazes de produzir OTA. Várias sequências da β - tubulina e região ITS1–5.8S-ITS2 depositadas no NCBI, como sendo de *A. ochraceus*, são atualmente identificadas como sendo de *A. westerdijkiae*. A variação genética encontrada entre a sequência dos genes da β - tubulina obtida de *A. ochraceus* e *A. westerdijkiae* levou à construção do par de oligonucleotídeos iniciadores

específicos para *A. westerdijkiae*. Este par de oligonucleotídeos iniciadores produz um amplicon de 347 pb.

3.7 MÉTODOS PARA DETECÇÃO DE OCRATOXINA A

Para a detecção e quantificação de OTA são, sobretudo, utilizadas técnicas cromatográficas como o TLC/ CCD (*Thin Layer Chromatography* – cromatografia em camada delgada) e o HPLC/ CLAE (*High Performance Liquid Chromatography* – cromatografia líquida de alta eficiência). A CCD foi, durante muitos anos, a técnica mais utilizada para este fim, tendo vindo gradualmente a ser substituída pelo CLAE, devido, essencialmente, à maior sensibilidade, precisão e reprodutibilidade desta última técnica, mas, também, devido à possibilidade de automação. No entanto, a CCD continua a ser muito útil em determinadas situações, desenvolvendo um papel importante nos países em desenvolvimento, continuando a existir, por isso, para certas micotoxinas e programas de validação de métodos que utilizam esta técnica (GILBERT; ANKLAN, 2002). Para a determinação da OTA por CCD utilizam-se placas de sílica gel ou placas de sílica gel pré-tratadas com ácido oxálico, e como fase móvel, composições de solventes de várias naturezas. Depois de efetuada a separação, a sua visualização é feita expondo as placas à luz ultravioleta (366 nm), uma vez que a OTA emite fluorescência azul esverdeada e a sua identificação é feita comparando os fatores de retenção (R_f) obtidos com valores de referência ou com o fator de retenção de um padrão aplicado na própria placa (ABRUNHOSA, 2008).

Atualmente, os procedimentos de detecção de OTA que utilizam a CLAE são os mais frequentes. Alguns desses procedimentos utilizam detectores de ultravioletas, contudo, hoje a utilização de detectores de fluorescência são mais empregados, uma vez que são mais sensíveis e mais específicos. Mais recentemente, detectores de espectro de massa passaram a ser utilizados. Colunas de fase reversa têm sido quase exclusivamente adotadas para a separação cromatográfica da ocratoxina A (ABRUNHOSA, 2008).

As técnicas analíticas convencionais de química, baseadas em cromatografia, são oficialmente aceitas e validadas pela AOAC (*Association of Official Analytical Chemists*). No entanto, a exigência de extrema limpeza dos extratos alimentares para análise, demanda de reagentes de alto grau de pureza destinados à análise cromatográfica, instabilidade de derivados fluorescentes e alto custo de instrumentação/manutenção sob supervisão de técnicos especializados restringem o uso na rotina laboratorial (SYDENHAM; SHEPHARD, 1996 *apud* GILBERT, 1996; ABRUNHOSA, 2008).

Em vista destas dificuldades, o ensaio imunoquímico constitui-se uma técnica analítica alternativa promissora na análise de micotoxinas em alimentos, com ênfase ao ensaio imunoenzimático (*enzyme linked immunosorbent assay*) (ELISA). As vantagens consistem na alta sensibilidade das reações imunológicas, capazes de detectar concentrações traço de um composto (ng e pg), pouca ou nenhuma necessidade de limpeza e/ou concentração de analito, baixo custo após padronização, facilidade de operação, além do potencial de utilização no campo. Os ensaios imunoquímicos oferecem ampla variabilidade às modalidades técnicas aplicáveis na pesquisa microbiológica, em que, juntamente com a detecção e enumeração de microorganismos, a confirmação da presença de toxinas microbianas seria fundamental ao controle de qualidade de produtos alimentícios (VALENTA, 1998).

Conseqüentemente, os imunoenaios constituem técnicas bioanalíticas aplicáveis em diversas áreas da ciência de alimentos, incluindo análise, microbiologia, nutrição, controle de qualidade e de processo. A potencialidade de técnicas imunoquímicas já é reconhecida, podendo ser empregadas no controle de alterações, na detecção de proteínas (albumina, glúten, gliadina e amilases), hormônios, inseticidas, herbicidas, antibióticos, sulfas, histamina, hipoxantina, ácidos nucleicos, glicocalcólides, vitaminas, adoçantes, quinina, entre outros (STANCZYK, 2003).

Recentemente, as técnicas imunológicas constituem ferramenta básica para o controle de importação de grãos geneticamente modificados em países desenvolvidos importadores de matéria-prima agropecuária. Embora o custo inicial do desenvolvimento de um ensaio imunoquímico seja alto, uma vez padronizado a desvantagem é compensada pela praticidade de um microensaio capaz de reduzir o

custo por teste. Técnicas imunanalíticas tornaram-se alternativas atraentes na análise de alimentos, oferecendo testes de triagem rápida e resultados quantitativos confiáveis com alto grau de sensibilidade (SIBANDA *et al.*, 2001).

Outras técnicas mais recentes têm sido também desenvolvidas e implementadas. São elas, por exemplo, os aparelhos de fluxo lateral (constituídos por anticorpos imobilizados em membranas), as matrizes de biossensores, os imunoenaios de fluorescência polarizada e os imunoenaios de eletrodos impressos (VISCANTI; GIROLAMO, 2005 *apud* Abrunhosa, 2008).

Hara e Hesseltine (1974), desenvolveram um método para a detecção da produção de aflatoxina com produção de fluorescência em ágar sob luz ultravioleta (UV), facilitando um *screening* de um número elevado de isolados com habilidade para produção de aflatoxina. A partir desse método, Lin e Dianese (1976) ampliaram o *screening* para detecção de ocratoxina A, desenvolvendo o método do Ágar Coco. O ágar coco apresenta como vantagens a facilidade no seu preparo, a rapidez e especificidade da detecção da produção de micotoxinas por fluorescência.

A OTA caracteriza-se por apresentar fluorescência verde em meio ágar coco e por possuir uma molécula de cloro em sua estrutura, responsável pelo caráter tóxico. A incorporação de um átomo de cloro característico de ocratoxina A, muito provavelmente é devida à ação de enzimas como as cloropeptidases (EDWARDS; O'CALLAGHAN; DOBSON, 2002). A ocratoxina B apresenta fluorescência azulada em meio ágar coco, não apresentando toxicidade devido à ausência da molécula de cloro. A ocratoxina C também tem fluorescência verde em meio ágar coco e constitui-se em um etil éter da ocratoxina A, sendo muito menos tóxica que essa.

3.7.1 Espectroscopia por infravermelho próximo – *Near infrared spectroscopy* (NIRS)

Espectroscopia é o estudo das características físicas de átomos ou moléculas pela radiação da molécula na forma de emissão, absorção ou espalhamento. A radiação eletromagnética possui características de onda e partícula. Quando a luz

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

A espectroscopia por infravermelho mede o comprimento de onda e a absorção da luz do infravermelho (IR) que incide na matéria de interesse (OSBORNE; FEARN; HINDLE, 1993). A região do infravermelho se estende de região visível à de micro-ondas. Por convenção, a região de infravermelho é dividida em infravermelho próximo, médio e longo (NAUMANN, 2000) (FIGURA 2).

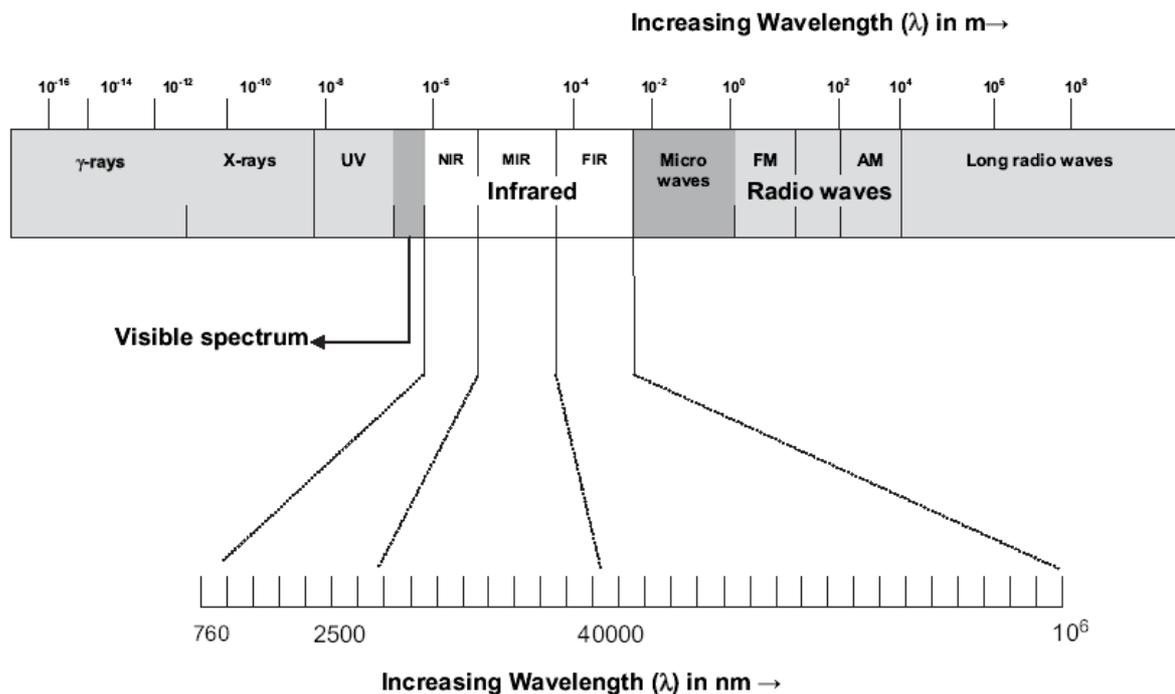


FIGURA 2 – ESPECTRO ELETROMAGNÉTICO

FONTE: SANTOS *et al.* (2010)

Os nomes estão relacionados com suas posições em respeito ao espectro visível. O infravermelho distante (FIR), aproximadamente $10 - 400 \text{ cm}^{-1}$ ($1000 - 30 \text{ }\mu\text{m}$) encontrando-se junto à região das micro-ondas, possui baixa energia e pode ser utilizado na espectroscopia rotatória (relacionada com a rotação das moléculas). O infravermelho médio (MIR), aproximadamente $400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ ($30 - 1,4 \text{ }\mu\text{m}$) e o infravermelho próximo (NIR) aproximadamente $4000 - 14000 \text{ cm}^{-1}$ ($1,4 - 0,8 \text{ }\mu\text{m}$) podem ser utilizados para estudar as vibrações moleculares e a estrutura rotatória-vibratória associada (RODRIGUEZ-FERNANDEZ, 2008).

O espectro do infravermelho de células intactas reflete nos movimentos rotacionais e vibratórios de grupos funcionais específicos ou ligações em componentes bioquímicos como proteínas, lipídios e carboidratos nas membranas celulares (NAUMANN; SCHULTZ; HELM, 1996). Assim, cada molécula é capaz de produzir um tipo de impressão digital única com o espectro de infravermelho (FIGURA 3). Essas impressões digitais permitem informações multidimensionais na composição celular e estrutural da matéria (NAUMANN; HELM; LABISCHINSKI, 1991).

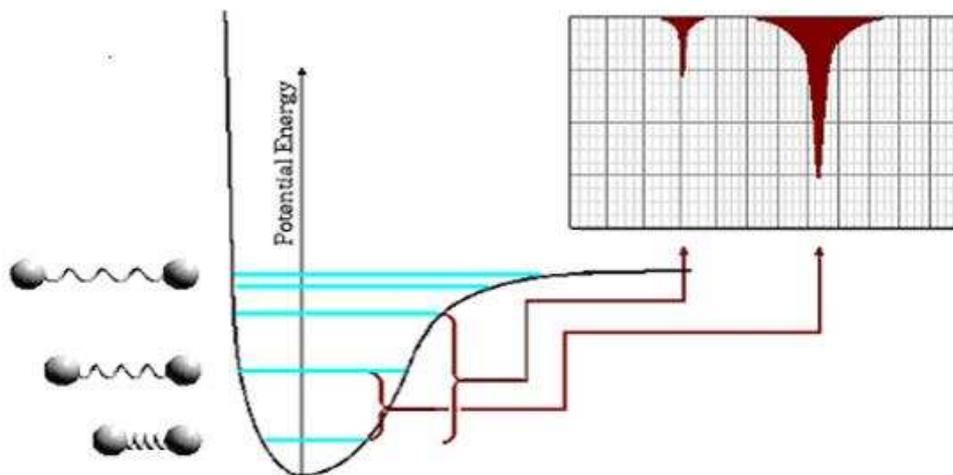


FIGURA 3 – MODELO QUÂNTICO DE VIBRAÇÃO MOLECULAR

FONTE: RODRIGUEZ-FERNANDEZ (2008)

NOTA: As esferas representam modelos de moléculas de dois átomos com níveis distintos de intensidade vibratória, sendo que quanto maior a distância entre os átomos, mais intensa é a vibração. A curva representa o comportamento da molécula. Do lado esquerdo é mostrado que a molécula tem um limite de

compressão, enquanto que do lado direito mostra que pode chegar num ponto que absorve tanta energia que a ligação é quebrada formando assim uma assíntota. As linhas azuis representam os distintos níveis discretos de energia que a molécula pode absorver ou emitir. Cada um desses níveis está relacionado com uma quantidade de energia que pode ser detectada pela NIRS, quantificada e analisada, como podemos observar no diagrama da direita.

A espectroscopia por infravermelho próximo (NIRS) tem sido utilizada como um método discriminatório rápido e não destrutivo, podendo levar somente 2 segundos para analisar uma amostra. A NIRS é baseada na absorção de infravermelho diretamente na amostras. A quantidade de luz absorvida depende das moléculas dentro da amostra. A NIRS mede vibrações dominantes de grupos funcionais e ligações polares fortes. Dessa forma, fornece grande quantidade de informação sobre a composição bioquímica das amostras não importando as interações, estrutura e composição da molécula (RODRIGUEZ-FERNANDEZ, 2008).

Diferentes técnicas da NIRS podem ser utilizadas para várias análises, tais como produção de micotoxinas (ocratoxinas, aflatoxinas, fumonisinas, deoxinivalenol), ergosteróis, identificação e detecção de micro-organismos. Dentre as principais técnicas se destacam a transmitância e reflectância (BÖRJESSON, STENBERG, SCHNÜRER, 2007).

Segundo Naumann (2000), o espectro por transmitância pode ser obtido a partir de soluções líquidas, suspensões, filmes viscosos ou sólidos colocados nas placas transparentes adequadas de infravermelho. A água está presente em todos os materiais biológicos, portanto materiais ópticos transparentes devem ser insolúveis em água. São usados como materiais CaF_2 , BaF_2 , ZnSe , ZnS , KRS-5^{TM} , ou germânio, os quais diferem em índice de refração, grau de transmissão e solubilidade em água.

A reflectância pode ser usada para as mesmas amostras que a transmitância. As amostras são colocadas em aparatos que refletem a luz ao invés de transmití-la (prata, ouro ou aço inoxidável polido), o que leva a uma passagem dupla, ou para dispositivos especiais de reflectância, uma multipassagem do infravermelho através da amostra. Com tal incidência da luz, monocamadas moleculares, como lipídeos, apresentam uma boa medição (NAUMANN, 2000).

Para a reflectância total atenuada (ATR) as amostras não são mais colocadas no caminho da propagação do feixe de luz como na transmitância e reflectância, mas as

amostras são colocadas numa superfície de uma placa de reflexão ou prisma, o qual encaminha o feixe de luz até a placa de ATR e conseqüentemente a amostra (NAUMANN, 2000).

A reflectância difusa é usada para amostras liofilizadas, amostras com a superfície rica em materiais como catalíticos ou carregadores cromatográficos, e finamente triturados ou materiais em pó (NAUMANN, 2000).

A transmitância deve ser mais sensível que a reflectância, pois a luz é passada através da amostra, enquanto que no último caso, a luz é encontra a amostra e é reflectada. A transmitância é potencialmente mais adequada para a detecção de ergosterol, sendo encontrado em níveis muito baixos, e também usado comumente em grãos. Em relação as micotoxinas, para a deoxinivalenol pode ser possível o uso de um modelo de transmitância (PETTERSSON; ABERG, 2003), sendo mais possível ainda para a ocratoxina A, pois os níveis aceitos são muito baixos (BÖRJESSON; STENBERG; SCHNÜRER, 2007).

3.7.1.1 Utilização da Espectroscopia por infravermelho na Microbiologia.

Em 1911, W.W Coblentz foi, provavelmente, o primeiro cientista a sugerir que seria lucrativa a análise de material biológico através de espectroscopia de infravermelho. Estudos de identificação de bactérias foram extensivamente reportados no início dos anos 50 e 60 (NAUMANN, 2000).

A partir de estudos feitos por Naumann, Fijala e Labischinski (1988) com bactérias patogênicas, diversas pesquisas relacionadas a micro-organismos começaram a utilizar a NIRS, combinados com análises estatísticas (NAUMANN; HELM; LABISCHINSKI, 1991).

A espectroscopia por infravermelho é uma técnica não destrutiva, precisa, com rápida resposta e de fácil operação (BERARDO *et al.* 2005). Além disso, esta técnica não necessita de reagentes com alto grau de pureza e vários passos de extração para obtenção do composto, como é o caso da cromatografia (GARON, *et al.* 2010).

A NIRS já é amplamente utilizada na indústria de alimentos, principalmente de grãos, para determinar a qualidade dos produtos (SINGH *et al.*, 2006). As diferenças de coloração do grão e sua aparência afetam diretamente sua qualidade e seu valor no mercado. Por exemplo, grãos de trigo brancos e vermelhos possuem propriedades, sabor e formas de processamento diferentes, entretanto sua coloração pode alternar do amarelo claro ao marrom avermelhado (DOWELL, 1997). Utilizando a NIRS em 2004, Wang *et al.* foram capazes de classificar os grãos brancos e vermelhos. Outro potencial da técnica é a avaliação de grãos danificados por calor, contaminações fúngicas e insetos. Wang *et al.* (2004), classificaram sementes de soja saudáveis e danificadas por fungos, como também os tipos de fungos, através da NIRS.

Na Microbiologia, a NIRS é utilizada em diversas áreas e com diferentes objetivos. Szeghalmi, Kaminsky e Gough (2007), utilizaram a técnica de infravermelho para analisar diferenças na composição de hifas de fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Rhizopus* e *Neurospora* sob condições de *stress*. Estudos de Essendoubi *et al.* (2007), obtiveram sucesso em discriminar diferentes cepas de *Candida glabrata*, um fungo infeccioso oportunista. Em 2005, Erukhimovitch *et al.*, analisaram o potencial para identificar e discriminar gêneros de fungos como *Fusarium* e *Pythium*, através da espectroscopia de infravermelho próximo.

Em um trabalho publicado por Pettersson e Aberg (2003), o infravermelho foi utilizado para detectar a micotoxina deoxinivalenol (DON) em cereais. Os autores concluíram que é totalmente possível desenvolver uma calibração modelo, o qual pode ser usado para detectar a DON em trigo em concentrações abaixo do que as propostas pelos limites europeus em farinha de trigo.

Berardo *et al.* (2005), utilizaram a técnica da NIRS para identificar fungos micotoxigênicos e seus metabólitos tóxicos. Duzentos e oitenta amostras de milho foram coletadas em 16 áreas da Itália, as quais foram inoculadas artificialmente com *Fusarium verticillioides*. Todas as amostras foram analisadas para a infecção fúngica, ergosterol e fumosina B₁. Os resultados obtidos indicam que a NIRS pode prever corretamente qual a incidência de grãos infectados por fungos, em particular o *Fusarium verticillioides*, bem como quantificar o ergosterol e fumosina B₁ em alimentos.

A metodologia da NIR pode ser aplicada como um monitoramento de milho contaminado após a colheita.

Hernández-Hierro, García-Villanova e González- Martín (2008), utilizaram a NIRS para análise de aflatoxina B₁, ocratoxina A e aflatoxinas totais em páprica coletada nos mercados espanhóis, como referência foi empregada a técnica do CLAE. Diferentes espectros foram visualizados quando o feixe de luz incidiu nas amostras de páprica, sendo eles classificados como: (a) não contaminado, (b) contaminado com todas as 5 micotoxinas (aflatoxina B₁, B₂, G₁, G₂ e ocratoxina A), (c) alta contaminação com aflatoxina B₁ e ocratoxina A. Os autores concluíram que a técnica da NIRS pode se tornar uma alternativa para a determinação da aflatoxina B₁, ocratoxina A e aflatoxinas totais em páprica.

Galvis-Sánchez, Barros e Delgadillo (2007), utilizaram a espectroscopia de infravermelho médio (MID) e o ATR para avaliar vinhos de diferentes regiões, sendo observado que foram originados espectros característicos para cada diferente região, a espectroscopia foi capaz de separar os vinhos de acordo com seu local de origem. Ainda neste estudo foi construída uma curva de calibração de OTA de 10 a 40 µg/kg. Amostras contaminadas por OTA em uma concentração superior a 20 µg/kg foram separadas como contaminadas e amostras com valores de contaminação abaixo de 10 µg/kg foram separadas como não contaminadas. Segundo os autores, a espectroscopia é uma técnica simples para uma avaliação prévia de contaminação por OTA em vinhos.

Garon *et al.* (2010), utilizaram o FT-IR (*Fourier Transform Infrared*) para uma rápida detecção e caracterização de 99 isolados fúngicos, sendo eles: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus parasiticus*. Como resultados foi obtido um primeiro *cluster* correspondente a linhagens de *A. fumigatus* e um segundo *cluster* dividido em 2 grupos *A. flavus* e *A. parasiticus*, seguindo a taxonomia deste grupo. A capacidade toxigênica dos isolados foi avaliada por CLAE e conseqüentemente testada por FT-IR. Os autores concluíram como resultado que a espectroscopia foi capaz diferenciar linhagens toxigênicas e não toxigênicas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MEIOS DE CULTURA

4.1.1 Meio Batata Dextrose Ágar (BDA)

| | |
|----------------|---------|
| Batata | 200 g |
| Dextrose | 20 g |
| Ágar | 15 g |
| Água destilada | 1000 mL |
| pH: 5,6 | |

Ferveu-se a batata com 800 mL de água destilada por 15 minutos. O líquido foi coado em um filtro de papel e o volume foi completado para 1000 mL, misturou-se a dextrose e o ágar e ferveu-se por 5 minutos. Autoclavou-se por 20 minutos a 120°C.

4.1.2 Meio Saboraud

| | |
|----------------|---------|
| Glicose | 40 g |
| Peptona | 10 g |
| Ágar | 15 g |
| Água destilada | 1000 mL |
| pH: 5,6 | |

Dissolveu-se a glicose em 500 mL de água destilada, ferveu-se até dissolvê-la por completo. Adicionou-se a peptona e o ágar e mais 500 mL de água, ferveu-se por 5 minutos. Autoclavou-se por 20 minutos a 120° C.

4.1.3 Meio Ágar Coco (LIN e DIANESE, 1976).

| | |
|----------------|--------|
| Leite de coco | 200 mL |
| Ágar | 16 g |
| Água destilada | 600 mL |
| pH: 6,9 | |

Ferveu-se a água e o ágar por 1 minuto, após misturou-se o leite de coco. Autoclavou-se por 20 minutos a 120°C.

4.2 SOLUÇÕES

4.2.1 Lactofenol de Amann

| | |
|----------------|-------|
| Ácido láctico | 10 g |
| Ácido fênico | 10 g |
| Glicerina | 20 g |
| Água destilada | 10 mL |

4.2.2 Tampão CTAB

| | |
|-------------|---------------|
| CTAB | 2 g |
| NaCl | 8,12 g |
| EDTA | 4 mL |
| Tris | 10 mL |
| PVP | 10g |
| Água milliQ | q.s.p. 100 mL |

4.2.3 Clorofil/ CIA – Clorofórmio Álcool isoamílico

| | |
|-------------------|-------|
| Clorofórmio | 96 mL |
| Álcool isoamílico | 4 mL |

4.2.4 Tampão de extração

| | |
|-----------------|--------|
| Tris-HCl pH 8,0 | 200 mM |
| NaCl | 250 mM |
| EDTA | 25 mM |
| SDS (p/v) | 1% |

A solução foi preparada e aquecida a 60°C no momento do uso.

4.2.5 Clorofane

Fenol equilibrado e clorofórmio p.a. na proporção de 1:1.

4.2.6 TBE 5X

| | |
|--------------|-------|
| Tris – base | 54g |
| Ácido bórico | 27,5g |
| EDTA 0,5M | 20 mL |

Os sais foram dissolvidos em 800 mL de água milliQ. Completou-se o volume para 1000 mL.

4.2.7 TBE 1X

| | |
|-------------|--------|
| TBE 5X | 100 mL |
| Água milliQ | 400 mL |

4.3 MATERIAL BIOLÓGICO

Foram selecionados 47 isolados fúngicos, descritos por Bozza et al. (2009) e identificados como *Aspergillus* spp., através de técnicas convencionais de cultivo. Os isolados foram depositados na coleção do LabMicro (Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular) na Universidade Federal do Paraná.

Os fungos foram isolados de grãos de café coletados na Estação Experimental do Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR), localizada na cidade de Londrina, no estado do Paraná. Os grãos de café da variedade IAPAR 59 analisados pertencem a safra de 2004/2005 e apresentam resistência à ferrugem.

4.4 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS ISOLADOS

Após a seleção dos isolados realizou-se um microcultivo objetivando a caracterização morfológica.

4.4.1 Microcultivo (KERN; BLEWINS, 1999)

Foram utilizadas placas de Petri esterilizadas, contendo em seu interior uma lâmina e um pedaço de algodão. Um cubo de aproximadamente 1 cm³ de meio de cultura BDA (item 4.1.1) foi cortado e colocado sobre um lâmina contida no interior da placa. Inoculou-se o isolado em todos os lados do cubo, o qual posteriormente foi coberto por uma lamínula esterilizada. O algodão no interior foi umidecido com água destilada esterilizada e a placa incubada em estufa por 7 a 14 dias, a aproximadamente 28°C. Após o tempo determinado, a lamínula foi retirada e colocada sobre outra lâmina limpa contendo uma gota de Lactofenol de Amann (item 4.2.2), sendo as bordas vedadas com esmalte incolor. As lâminas preparadas foram observadas ao microscópio óptico.

4.5 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS

A partir da caracterização morfológica, foram selecionados isolados das seções *Nigri* e *Circumdati* para estudos moleculares e quanto à produção de Ocratoxina A.

4.5.1 Extração de DNA

4.5.1.1 Método CIA (modificado por VICENTE, 2000)

Os isolados foram cultivados em meio BDA sólido, à 28°C por 5 dias. Em tubos tipo *ependorf* de 1,5 mL com sílica e celite (2:1) foi colocado cerca de 1 cm² de micélio das culturas, evitando trazer o ágar. Verteram-se 300 µL de tampão CTAB (item 4.2.3.) no *ependorf* e macerou-se o micélio com maceradores. Adicionou-se mais 200 µL de tampão CTAB e misturou-se bem em um agitador de tubos. Foi incubado em banho-maria por 10 minutos à 65°C. Adicionou-se 500 µL de CIA (item 4.2.4.) e centrifugou-se por 7 minutos a 12000 rpm. O sobrenadante foi transferido para outro *ependorf*. Repetiu-se a adição de 500 µL de CIA e centrifugação por 7 minutos a 12000 rpm. Transferiu-se o sobrenadante para outro *ependorf*. Foram adicionados 2 volumes de etanol 96% gelado. Agitou-se delicadamente. O DNA foi precipitado, colocando o *ependorf* no *freezer* (-20°C) *overnight*. Centrifugou-se por 7 minutos a 12000 rpm e descartou-se o sobrenadante cuidadosamente (etanol). O *pellet* de DNA foi lavado em 500 µL de etanol 70% gelado e misturou-se levemente. Centrifugou-se mais 7 minutos a 12000 rpm, o sobrenadante (etanol) foi retirado com auxílio de uma micropipeta e deixou-se o DNA desidratar por uns 15 minutos. O *pellet* foi ressuspendido em 100 µL de água milliQ. O *pellet* permaneceu *overnight* em temperatura ambiente. Reservou-se em *freezer* -20°C.

4.5.1.2 Método fenol-clorofórmio (RAEDER; BRODA, 1985) modificado por Blanco (1999), modificado no presente trabalho.

Os isolados foram cultivados por 2 dias a 28°C (± 1 °C), com 9 pontos nas placas. As colônias foram retiradas e passadas para *ependorfs* para serem liofilizados. Após a liofilização os micélios foram macerados com nitrogênio líquido no gral até obter um pó bem fino. Com a espátula, colocou-se o pó em 4 *ependorfs* e levando-os direto para o gelo. Adicionaram-se 1000 μ L de tampão (item 4.2.5.), aquecido a 70°C, agitou-se no vórtex para obtenção de uma suspensão homogênea. Os *ependorfs* foram incubados em banho maria a 70° C por 30 minutos. Colocaram-se 1000 μ L de fenol, homogeneizando-os no vórtex. Foi centrifugado a 5000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi coletado e passados para outros *ependorfs*, adicionando 500 μ L clorofane (item 4.2.6.) e centrifugando-os a 5000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi novamente coletado e passados para outros *ependorfs*, adicionou-se clorofil 500 μ L (item 4.2.4.) e centrifugou-se a 5000 rpm por 15 minutos. Coletou-se o sobrenadante, passando-o para outro *ependorf*, adicionou-se 60% do volume do *ependorf* de isopropanol. Incubou-se no *freezer* por 1 hora. A suspensão foi centrifugada a 11000 rpm por 20 minutos e desprezou-se o sobrenadante. O precipitado foi lavado com 150 μ L de etanol 70% e centrifugou-se a 12000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e os *ependorfs* permaneceram por 1 hora em estufa a 37°C para secagem. O DNA foi ressuscitado em água milliQ. O *pellet* permaneceu *overnight* em temperatura ambiente. Reservou-se em *freezer* -20°C.

4.5.2 PCR

Para a reação de PCR foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores, descritos na literatura, que amplificam regiões específicas de espécies de *Aspergillus* (QUADRO 3) . A PCR específica é de extrema importância para a identificação das 4 principais

espécies de *Aspergillus* sp., produtoras de Ocratoxina A no café no Brasil, sendo elas: *A. carbonarius*, *A. westerdijkiae*, *A. niger* e *A. ochraceus*.

| Espécie | Oligonucleotídeos iniciadores (5'→3') | Condições para PCR | Referência | Tamanho do Fragmento |
|-------------------------|---|--|-----------------------------------|----------------------|
| <i>A. carbonarius</i> | OPX ₈₀₉ F - AGGCTAATGTTGATAACGGATGAT OPX ₈₀₉ R - GCTGTCAGTATTGGACCTTAGAG | 35X { 95°C – 2 min. 95°C – 1 min. 62°C – 1 min. 72°C – 1 min. 72°C – 5 min. | FUNGARO, <i>et al.</i> (2004). | 260 pb |
| <i>A. westerdijkiae</i> | Bt2Aw F - TGATACCTTGGCGCTTGTGACG Bt2Aw R - CGGAAGCCTAAAAAATGAAGAG | 35X { 94°C – 5 min. 94°C – 1 min. 64°C – 30s. 72°C – 1 min. 72°C – 5 min. | MORELLO, <i>et al.</i> (2007). | 809 pb |
| <i>A. niger</i> | OPX ₃₇₂ F - CAGTCGTCCAGTACCCTAAC OPX ₃₇₂ R - GAGCGAGGCTGATCTAAGTG | 35X { 95°C – 2 min. 95°C – 1 min. 62°C – 1 min. 72°C – 1 min. 72°C – 5 min. | SARTORI, <i>et al.</i> (2006). | 372 pb |
| <i>A. ochraceus</i> | Ochra pA-F - TTAACAGGGAACAATCCATATAG Ochra pA-R - GAATTCACCCAGAACTTGCCG | 35X { 94°C – 4 min. 94°C – 30s. 55°C – 30s. 72°C - 30s. 72°C – 5 min. | SCHMIDT, <i>et al.</i> (2003). | 347 pb |

QUADRO 3 – OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES E CONDIÇÕES UTILIZADAS NAS REAÇÕES DE PCR DE ISOLADOS DE *Aspergillus* sp.

FONTE: O autor (2010)

As condições de cada reação de PCR (QUADRO 4) seguiram os protocolos descritos na literatura.

| Reagentes | <i>A. carbonarius</i> Fungaro, <i>et al.</i> (2004). | <i>A. westerdijkiae</i> Morello, <i>et al.</i> (2007). | <i>A. niger</i> Sartori, <i>et al.</i> (2006). | <i>A. ochraceus</i> Schmidt, <i>et al.</i> (2003). |
|--------------------|--|--|--|--|
| Taq tampão | 1X | 1X | 1X | 1X |
| dNTP | 0,2 mM | 0,2 mM | 0,2 mM | 0,2 mM |
| Mgcl ₂ | 1 mM | 2 mM | 1 mM | 5 mM |
| Primer I | 0,77 µM | 0,4 µM | 0,77 µM | 0,4 µM |
| Primer II | 0,77 µM | 0,4 µM | 0,77 µM | 0,4 µM |
| Taq DNA polimerase | 0,04 U/µL | 0,04 U/µL | 0,04 U/µL | 0,04 U/µL |
| DNA | 20 ng | 20 ng | 20 ng | 20 ng |
| Volume final | 13 µL | 13 µL | 13 µL | 13 µL |

QUADRO 4 – CONCENTRAÇÕES DOS REAGENTES UTILIZADOS NAS REAÇÕES DE PCR PARA AS DIFERENTES ESPÉCIES DE *Aspergillus* AVALIADAS NO PRESENTE TRABALHO

FONTE: O autor (2010)

A amplificação foi realizada no termociclador *Eppendorf Mastercycler* programado segundo as especificações de cada oligonucleotídeo iniciador (QUADRO 3) e os fragmentos visualizados em gel de agarose 1,4%, corados com brometo de etídeo sob transiluminador U.V. e fotodocumentados.

Os padrões de *A. ochraceus*, *A. niger*, *A. carbonarius* e *A. westerdijkiae* foram gentilmente cedidos pela Prof^a Dr^a Maria Helena Fungaro da Universidade Estadual de Londrina, Paraná.

4.6 DETECÇÃO DA PRODUÇÃO DE OCRATOXINA A

4.6.1 *Screening* em Ágar Coco

Os isolados identificados como *Aspergillus* (seção *Circumdati* e *Nigri*) foram repicados primeiramente em Ágar Sabourad (item 4.1.2.) crescendo por 4 dias a 28°C.

Posteriormente, discos de micélio de 6 mm de diâmetro foram transferidos individualmente para o centro da placa contendo meio Ágar Coco (item 4.1.3). As placas foram incubadas por 6 dias a 28°C. O verso e reverso da colônia foram observados e fotografados a cada 24h, por 6 dias (24h, 48h, 72h, 96h, 120h e 144h), sob luz ultravioleta (365 nm), para verificar a presença de um halo fluorescente azulado (MILANEZ; SCHOENLEIN- CRUSIUS; OKINO, 2002), o qual, indica a presença de ocratoxina A.

4.6.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

4.6.2.1 Produção de Ocratoxina A (PERRONE *et al.*, 2006 com modificações)

Dez isolados foram selecionadas aleatoriamente após o *screening* realizado com o Ágar Coco (item 4.1.3). As linhagens foram crescidas em triplicata em Erlenmeyers de 500 mL contendo 150 mL de meio de cultura BDA (item 4.1.1), por 14 dias à 25°C no escuro (FIGURA 4). As culturas foram homogeneizadas por 30 minutos e filtradas através de um filtro de papel comum. O filtrado foi passado através de seringa com filtro de nylon (0,45 µm) para a análise de CLAE.



FIGURA 4 – ISOLADOS FÚNGICOS DO GÊNERO *Aspergillus* sp. CRESCIDOS EM MEIO BDA LÍQUIDO POR 14 DIAS A 25°C NO ESCURO EM TRIPLICATA
FONTE: O autor (2010)

4.6.2.2 Análise CLAE (PERRONE *et al.*, 2006)

O sistema da CLAE consistia de um cromatógrafo *Agilent* 1100, provido de bomba quartenária *degasser*, forno de coluna e com um sistema de injeção manual *Rheodyne* com *loop* de 100 μL , conectado ao detector de fluorescência (*Agilent* 1100), ajustado para a detecção excitação de 333 nm emissão de 470 nm. Utilizou-se a coluna *zorbax C18* 150mm, 4,6mm e 5 μm partículas (FIGURA 5).

Utilizou-se um padrão de Ocratoxina A (St. Louis, MO) de concentração de 50 $\mu\text{g/L}$. A partir desse padrão preparou-se uma solução estoque em benzeno e ácido acético (99:1) a uma concentração de 1000 $\mu\text{g/L}$. Realizou-se diluições para a constituição da curva de calibração, sendo elas: 0,1 $\mu\text{g/L}$, 0,5 $\mu\text{g/L}$, 1,25 $\mu\text{g/L}$, 5 $\mu\text{g/L}$ e 10 $\mu\text{g/L}$. As soluções foram preparadas por evaporação em capela, com o volume exato da diluição, sendo o resíduo redissolvido em fase móvel.

Na execução dos ensaios foram utilizadas as seguintes condições cromatográficas: fase móvel constituída de acetonitrila e ácido acético a 2% (41:59), vazão de 1mL/min, volume da injeção de 100µL e coluna à temperatura de 25 °C. As amostras foram quantificadas através do método de padronização externa, utilizando o software Agilent ChemStation, o qual acompanha o equipamento, obtendo-se um limite de quantificação de 0,5 µg/L.



FIGURA 5 – SISTEMA DA CLAE UTILIZADO

FONTE: o autor (2010)

NOTA: **A** - Bomba da amostra e fase móvel; **B** - Bomba de retirada de gás; **C** - Coluna; **D** - Detector de fluorescência.

4.6.3 NIRS

4.6.3.1 Produção de Ocratoxina A

Os mesmos dez isolados de *Aspergillus* pertencentes às seções *Nigri* ou *Circumdati* utilizados na CLAE foram crescidos em triplicata em Erlenmeyer de 500 mL contendo 150 mL de meio de cultura BDA (item 4.1.1), por 14 dias à 25°C no escuro (FIGURA 4). As culturas foram homogeneizadas e filtradas através de um filtro de papel dobrado.

4.6.3.2 Análise NIRS

Os espectros foram capturados com o equipamento *Biorad Excalibur (Germany)* (FIGURA 6) com o auxílio do programa *Varian*. Foram realizados 32 scans, para cada espectro, com uma faixa de comprimento de onda de 7500 a 400 cm^{-1} , e resolução de 2 cm^{-1} . Para a análise dos dados o programa utilizado foi *The Unscrambler 9.1*. As amostras foram analisadas em triplicata.



FIGURA 6 – ESPECTROFOTÔMETRO POR INFRAVERMELHO PRÓXIMO
FONTE: O autor (2010)

4.6.3.2.1 Transmitância

A amostra foi montada entre 2 cristais de fluoreto de cálcio, entre eles colocou-se um espaçador de teflon de 0,05mm (FIGURA 7). Foram injetados aproximadamente 30 μ L da amostra, com o auxílio de uma seringa. Os cristais foram montados em um aparato o qual foi colocado no aparelho de infravermelho (FIGURA 8).



FIGURA 7 – JANELA DE TRANSMITÂNCIA

FONTE: O autor (2010)

NOTA: **A** - Ordem da montagem da janela. Da esquerda para a direita: Aparato I; Membrana I, para evitar o contato direto dos cristais no aparato; Cristal I; Membrana de teflon, Cristal II, Membrana II; Aparato II; Aparato III, responsável pelo fechamento do sistema. **B** – Aspecto do sistema fechado.

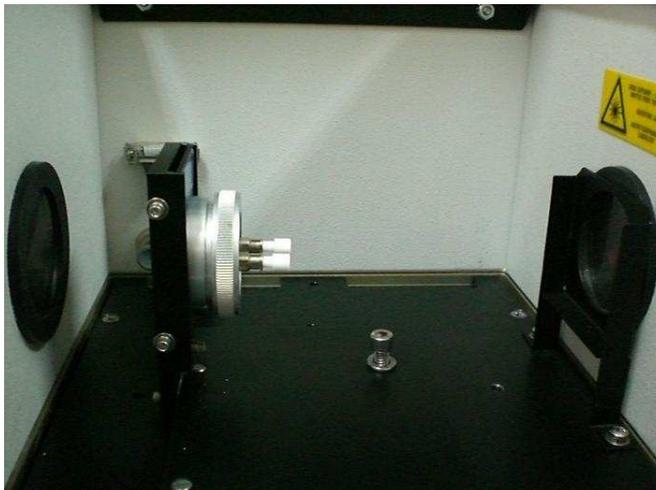


FIGURA 8 – SISTEMA DE TRANSMITÂNCIA

FONTE: O autor (2010)

NOTA: O feixe de luz atravessa a amostra da direita para esquerda (feixe transmitido). O espectro é o resultado do cálculo da entrada e saída de luz na amostra.

4.6.3.2.2 Reflectância total atenuada (ATR)

Utilizou-se um aparato com um cristal de selenito de zinco. Sobre o cristal existia um espaço no qual foi injetado cerca de 100 μL de amostra, até cobri-lo totalmente (FIGURAS 9 e 10).



FIGURA 9 – SISTEMA DE REFLECTÂNCIA (ATR)

FONTE: O autor (2010)

NOTA: O feixe de luz é transmitido da direita para a esquerda. Quando o feixe passa no sistema de ATR um jogo de espelhos o direciona até o cristal de selenito de zinco localizado na parte superior do sistema. O que difere o ATR da transmitância é que o feixe não atravessa a amostra, ele é refletido pelo cristal. O espectro é o resultado do cálculo da entrada e saída de luz na amostra.



FIGURA 10 – COMPARTIMENTO ONDE A AMOSTRA É INJETADA NO SISTEMA DE ATR

FONTE: O autor (2010)

4.6.3.3 Análise dos dados da NIRS obtidos por transmitância e reflectância

Normalmente o conjunto de dados do espectro da NIRS passa por algum tipo de pré-tratamento antes de ser utilizado para fins qualitativos ou quantitativos. Estes pré-tratamentos são feitos para minimizar eventuais problemas que ocorram durante a montagem da amostra (PASQUINI, 2003).

Utilizou-se um pré-tratamento, o qual transforma os dados de transmitância/reflectância em absorbância ($x = \log(1/x)$ onde $x=R$ (reflectância) ou $x=T$ (transmitância) (FIGURA 11).

Outro pré-tratamento utilizado foi o MSC (*Multiplicative Scatter Correction*), o qual, compensa efeitos de espalhamento de luz nos espectros (FIGURA 12).

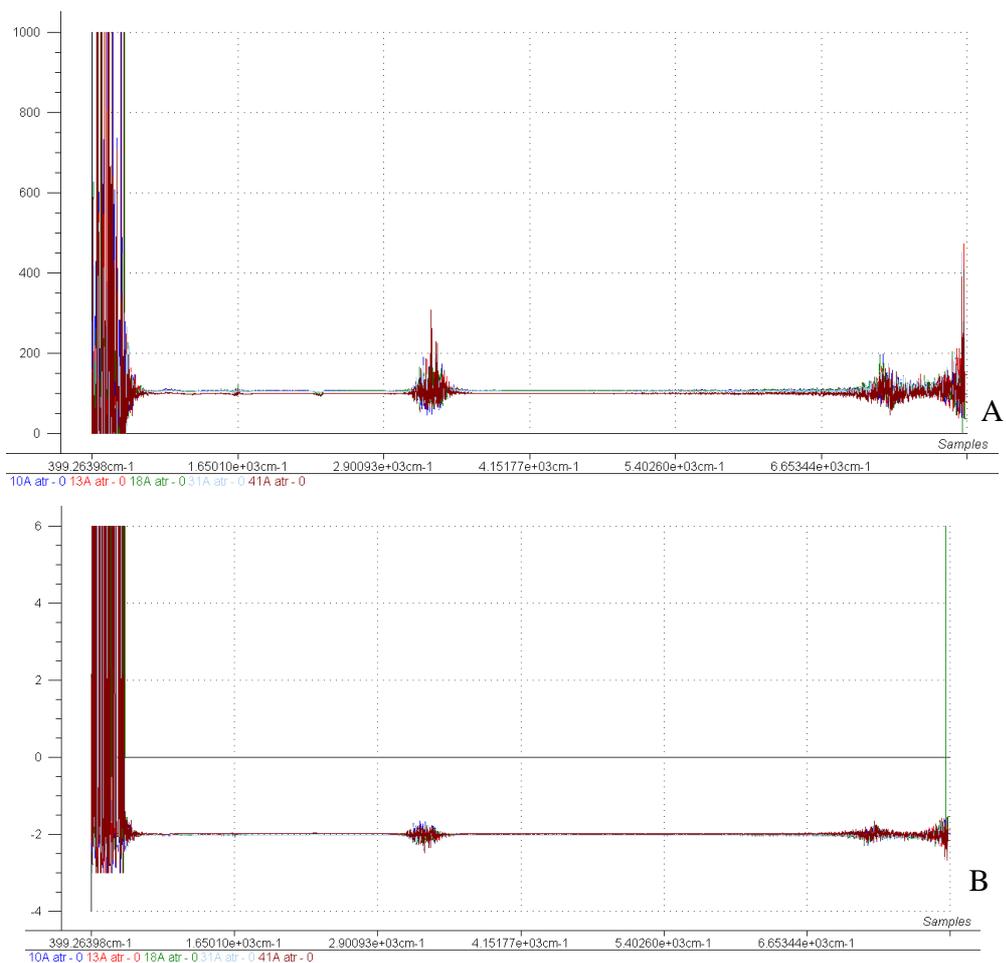


FIGURA 11 – TRANSFORMAÇÃO DE TRANSMITÂNCIA (A) PARA ABSORBÂNCIA (B)
FONTE: O autor (2010)

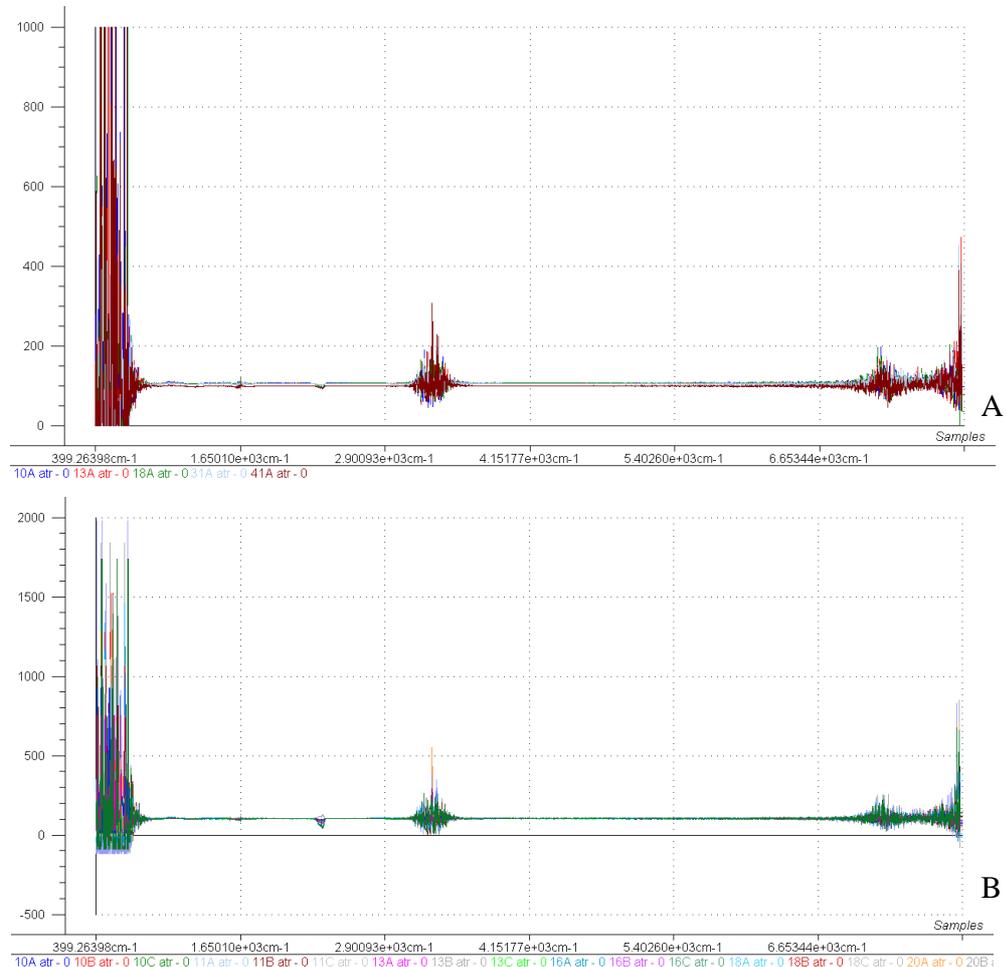


FIGURA 12 – ESPECTRO ANTES DA UTILIZAÇÃO DO MSC (A). APARÊNCIA DO ESPECTRO APÓS A UTILIZAÇÃO DO MSC (B)

FONTE: O autor (2010)

No modelo PLS (Regressão por mínimos quadrados parciais) as informações espectrais (matriz X) e as informações das concentrações (matriz Y) são usadas ao mesmo tempo correlacionando-as a fim de se obter uma relação linear na fase de calibração. Através de combinações lineares dos dados espectroscópicos (da matriz X) e dos dados de referências (matriz Y), se obtém o número de variáveis latentes necessários para fazer correlação entre os espectros e a concentrações. É usado para construção do modelo de calibração um número de variáveis latentes que proporcione o

menor erro possível de previsão, ou seja, que as diferenças entre os valores de referência e valores de previstos sejam as menores (FERRARINI, 2004).

No presente trabalho foi utilizado como pré-tratamento a transformação de transmitância ou reflectância em absorbância seguido por MSC, além disso, optou-se por não se utilizar nenhum pré-tratamento.

As 2 metodologias (transmitância e reflectância) foram avaliadas (1) quanto à sua capacidade de detectar a OTA, ou seja, predizer se as amostras apresentavam concentrações de OTA; e (2) quanto à sua capacidade de quantificá-la.

Utilizou-se o PLS com o maior número de componentes, atribuindo tais valores de referência:

- Para a detecção de OTA valores de 0 (não produtor) e 1 (produtor)
- Para a quantificação de OTA os valores atribuídos foram os mesmos obtidos por CLAE.

Para a obtenção de melhores valores para a calibração e validação os comprimentos de onda foram selecionados sucessivamente. Em seguida, para a realização da predição, regiões de maior importância do espectro foram utilizados em um novo PLS1, sendo excluídos 2 ou 5 dados.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS ISOLADOS

A caracterização morfológica dos 47 isolados, previamente identificados como *Aspergillus* spp., separou os isolados em 2 grupos, sendo 13 isolados da seção *Nigri* e 34 isolados da seção *Circumdati* (FIGURA 13).

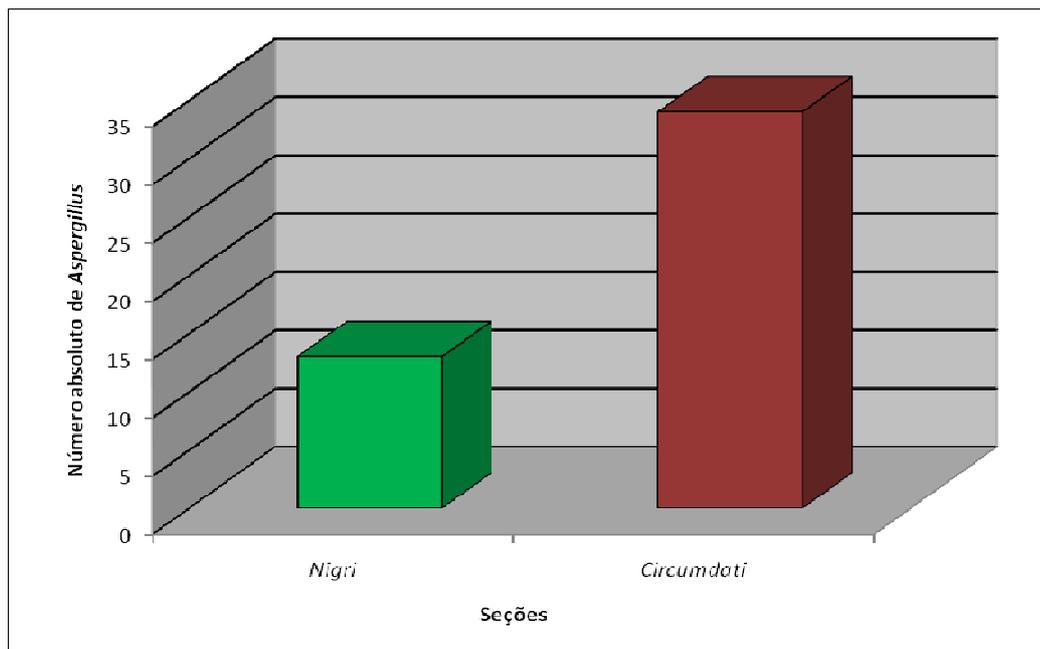


FIGURA 13 – NÚMERO ABSOLUTO DE *Aspergillus* sp. DAS SEÇÕES *NIGRI* E *CIRCUMDATI* ISOLADOS DE GRÃOS DE CAFÉ CV. IAPAR 59

FONTE: O autor (2010)

No Brasil, estudos têm demonstrado que *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus carbonarius* e *Aspergillus niger* são as principais espécies responsáveis pela presença de ocratoxina A em grãos de café (MAGNANI *et al.*, 2005). *A. niger* e *A. carbonarius* pertencem à seção *Nigri* e *A. ochraceus* pertence à seção *Circumdati*.

As seções *Nigri* e *Circumdati* compõem, juntamente com as seções *Flavi*, *Wentii*, *Candidi*, *Cremeri* e *Sparsi* o subgênero *Circumdati*. Tal subgênero possui como principais características: vesícula globosa e fértil em toda a superfície, disposta de forma radiada, com métula frequentemente presente (XAVIER *et al.*, 2008; KLICH, 2006).

As espécies de *Aspergillus* representantes da seção *Circumdati* apresentam conídios variando do amarelo ao ocre (SAMSON; HONG; FRISVAD, 2006). Observa-se na Figura 14 a coloração ocre da colônia e estruturas reprodutivas.

Já as espécies representantes da seção *Nigri* são aquelas que apresentam maior dificuldade de classificação e identificação. A principal característica desta seção é a presença de conídios negros ou próximos de negros (PERRONE *et al.*, 2007). Na Figura 14 pode-se observar a coloração negra da colônia e estruturas reprodutivas.

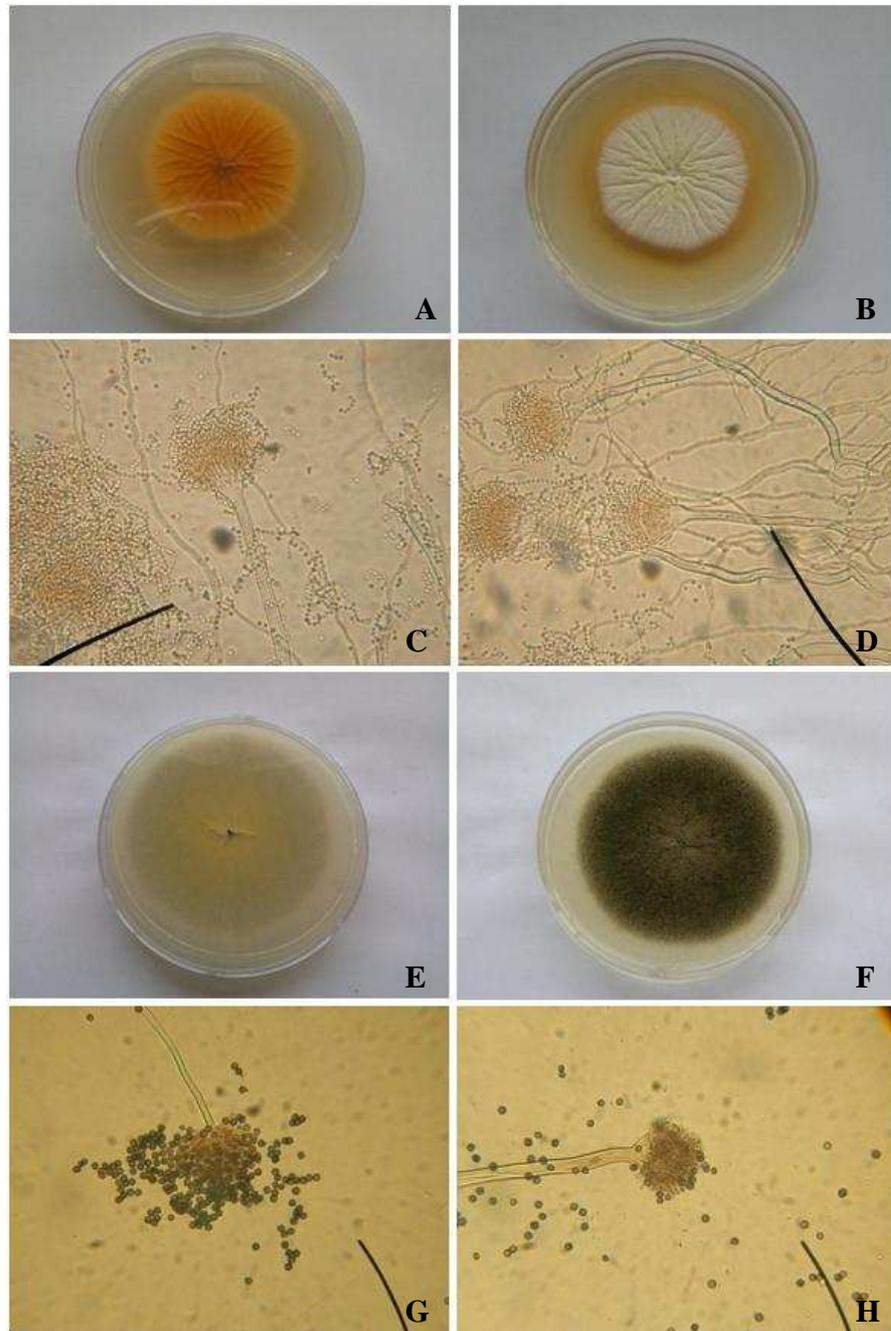


FIGURA 14 – MACROMORFOLOGIA E MICROMORFOLOGIA DE *Aspergillus* sp. SEÇÕES *CIRCUMDATI* E *NIGRI*.

FONTE: O autor (2010)

NOTA: A, B, C e D - Representante da seção *Circumdati*. . E, F, G e H – Representante da seção *Nigri*. **A** e **E** - Morfologia colonial (reverso) em meio BDA, com 7 dias de crescimento a 28°C. **B** e **F** - Morfologia colonial em meio BDA, com 7 dias de crescimento. **C**, **D**, **G** e **H** - Micélio vegetativo em meio BDA e crescimento de 7 dias. Aumento de 400X.

5.2 EXTRAÇÃO DE DNA

Os 47 isolados identificados como *Aspergillus* sp. das seções *Nigri* e *Circumdati*, foram submetidos à extração de DNA, utilizando o protocolo CIA modificado por Vicente (2000). Este protocolo caracteriza-se por ter um baixo custo e por ser uma técnica rápida. Entretanto, 6 isolados da seção *Nigri* (de 13 isolados) e 14 isolados da seção *Circumdati* (de 34 isolados) não tiveram seu DNA extraído por esta técnica.

Conseqüentemente vários testes foram realizados, a partir do protocolo modificado por Vicente (2000), como tentativa para obtenção do DNA dos isolados.

Segundo o protocolo modificado por Vicente (2000), a amostra deve ser centrifugada por 7 minutos a 12000 rpm com 500 µL de CIA (24 partes de clorofórmio e 1 parte de álcool isoamílico), deve-se retirar o sobrenadante e repetir o processo de centrifugação com CIA. Em um dos testes realizados utilizou-se o clorofórmio no lugar do CIA e no outro teste utilizou-se primeiramente o clorofórmio e depois o CIA.

O clorofórmio é usado para remover proteínas das preparações de ácidos nucleicos na fase de purificação. A forma padronizada de remover proteínas das soluções de ácido nucleico é extrair uma vez com fenol, outra com uma mistura de 1:1 de fenol e clorofórmio e novamente com clorofórmio. Este procedimento é vantajoso pelo fato de a desproteinização ser mais eficiente quando dois diferentes solventes orgânicos são usados ao invés de um apenas (VICENTE, 2000).

Quando se utilizou o clorofórmio no lugar do CIA não foi possível obter os DNAs dos isolados. Entretanto, quando foi utilizado primeiramente o clorofórmio e depois o CIA, os 6 isolados restantes da seção *Nigri* tiveram seus DNAs extraídos. O que não foi observado para os 14 isolados restantes de seção *Circumdati*.

Foram testados ainda 2 métodos de purificação do DNA, um com acetato de sódio e outro com acetato de amônio. Após o DNA ter sido ressuspensionado com água milliQ, acrescentou-se 2 volumes de etanol absoluto (200 µL) e 10% de acetato de sódio ou acetato de amônio, a amostra permaneceu *overnight* no freezer. Centrifugou-se por 7 minutos a 12000 rpm, retirou-se o sobrenadante, lavando-o com álcool 70%. O

pellet foi ressuspendido novamente em água milliQ. Tais métodos de purificação não foram eficientes para as amostras das seções *Nigri* e *Circumdati*.

Para os representantes da seção *Circumdati* nenhuma das adaptações anteriores foi suficiente para a extração do DNA. Das 34 amostras de isolados da seção *Circumdati*, 14 delas só tiveram seu DNA extraído a partir do protocolo com fenol-clorofórmio (RAEDER; BRODA, 1985) modificado por Blanco (1999).

5.3 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS

Treze isolados da seção *Nigri* foram testados com o par de oligonucleotídeos iniciadores específico para identificação de *A. niger* (SARTORI *et al.*, 2006) (QUADRO 3).

O volume total da reação foi de 13 μL , contendo: cerca de 20 ng de DNA, tampão 1X, 1 mM MgCl_2 , 0,2 mM de dNTP, 0,77 μM de cada oligonucleotídeo iniciador e 0,04 U de Taq DNA polimerase.

Na reação de PCR proposta por SARTORI *et al.* (2006), o volume total era de 25 μL , entretanto, o volume utilizado foi de 13 μL , otimizando a quantidade de reagentes. O volume de DNA utilizado na reação também foi reduzido, de 3 μL para 2 μL , pois nenhum fragmento foi amplificado quando se utilizou 3 μL de DNA.

Dos 13 isolados que foram submetidos a esta reação de PCR, 7 deles apresentaram uma banda de 372 pb, indicando serem isolados de *Aspergillus niger* (FIGURA 15).

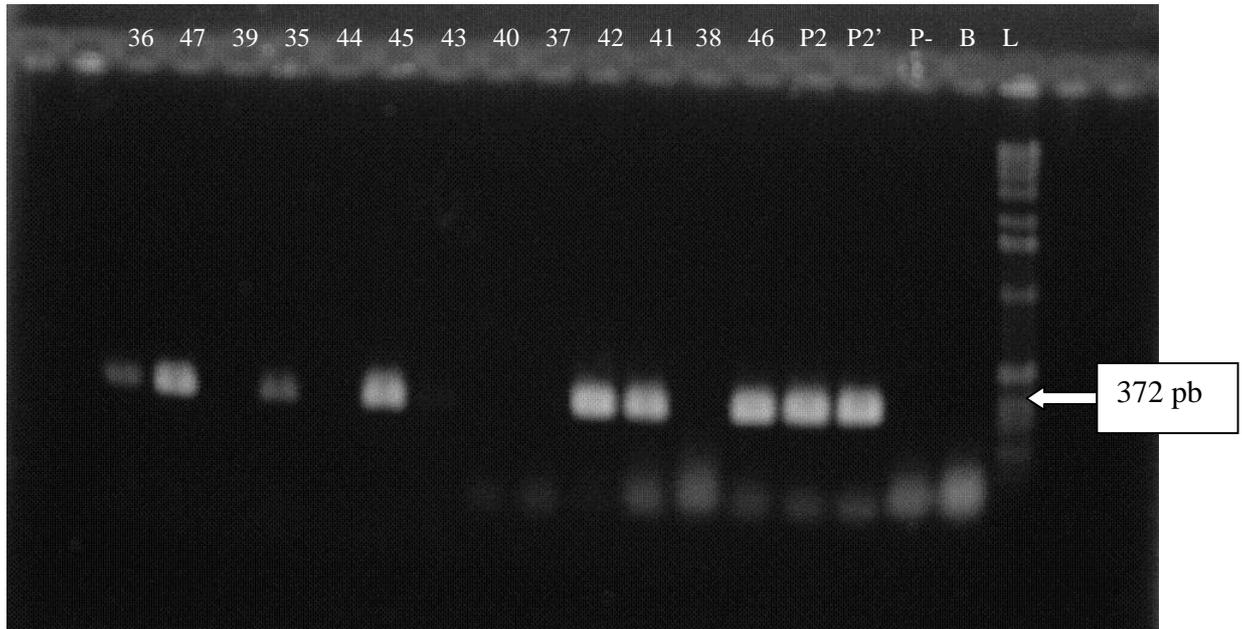


FIGURA 15 – AMPLIFICAÇÃO DE LINHAGENS DE *Aspergillus* sp. COM OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES ESPECÍFICOS PARA *A. niger*

FONTE: O autor (2010)

NOTA: Isolados 36 47, 35, 45, 42, 41, 46 (*A. niger*), P2 e P2' (controle positivo de *A. niger*), P-: *Penicillium* sp. - controle negativo, B: Branco, L: Marcador de peso molecular DNA ladder 1 Kb.

Magnani *et al.* (2005), realizaram uma identificação molecular de *Aspergillus* spp. isolados de grãos de café. Dentre as espécies com potencial produção de ocratoxina A encontradas, 24% foram identificadas como *Aspergillus niger*, sendo a espécie mais frequente no estudo. Mas também foram identificadas *A. carbonarius* (1%), *A. ochraceus* (17%).

Noonim *et al.* (2008), procederam com isolamento e identificação de fungos potencialmente produtores de ocratoxina A em cafés de origem tailandesa. Os principais contaminantes dos grãos de café foram *Aspergillus* das seções *Nigri* e *Circumdati*. Da seção *Nigri* quatro espécies foram encontradas, sendo o *A. niger* a espécie predominante.

Em demais trabalhos como de Taniwaki *et al.* (2003), pode-se observar que dentre a seção *Nigri* a espécie mais frequentemente isolada é a *A. niger*. Entretanto é

importante ressaltar que nem todas as linhagens de *A. niger* são capazes de produzir a ocratoxina A.

Segundo Costa e Scussel (2002), é importante enfatizar que a detecção de fungos toxigênicos em alimentos não significa a presença da micotoxina, especialmente se os fungos não forem expostos às condições que permitam seu crescimento. Porém, a presença de fungos toxigênicos indica que existe risco potencial de contaminação por micotoxinas. Quando o alimento é exposto a fatores físicos tais como alta umidade e temperatura os riscos de contaminação aumentam, especialmente durante longo tempo de armazenamento.

Para Frisvad *et al.* (2007), a falta de habilidade em produzir a OTA pode ser causada por genes silenciados ou por mutações funcionais ou em genes regulatórios.

Os demais isolados estudados no presente trabalho (*A. carbonarius*, *A. ochraceus* e *A. westerdjkiae*) não puderam ser identificados através do método da PCR com oligonucleotídeos iniciadores espécie específicos. Ocorreu a amplificação de fragmentos de alguns isolados quando testados com os pares de oligonucleotídeos iniciadores de *A. ochraceus* e *A. westerdjkiae*, entretanto não se observou a reprodutibilidade dos resultados. Além disso, foi observada a amplificação de bandas inespecíficas, que mesmo com alterações no protocolo continuavam a aparecer. Os padrões utilizados para *A. ochraceus* e *A. westerdjkiae* sempre apresentavam uma única banda corresponde ao descrito pelos autores (260 pb para *A. ochraceus* e 347 pb para *A. westerdjkiae*) (QUADRO 3).

No trabalho de Schmidt *et al.* (2003), em que foi descrito o par de oligonucleotídeos iniciadores para *A. ochraceus* não há qualquer menção da subdivisão da espécie *A. ochraceus* em *A. ochraceus* e *A. westerdjkiae*. Esta subdivisão foi proposta em 2004 quando Fungaro *et al.*, analisaram dados genotípicos da espécie e Frisvad *et al.* (2004) realizaram uma reorganização taxonômica da mesma. Portanto, o par de oligonucleotídeos iniciadores que deveria ser específico para *A. ochraceus* amplificava fragmentos de DNA de *A. ochraceus* e *A. westerdjkiae*.

Quando utilizado o par de oligonucleotídeos iniciadores específico para *A. carbonarius* nem o próprio padrão de *A. carbonarius* foi amplificado. Quanto à amplificação de fragmentos de DNAs dos isolados, foi observado que o par de

oligonucleotídeos iniciadores em questão amplificava DNAs de isolados já identificados anteriormente como *A. niger*, surgindo muitas vezes também bandas inespecíficas.

Vários testes foram realizados como, preparo de todos os reagentes, novas diluições dos DNAs, alterações na temperatura de anelamento, aumento e diminuição do volume de DNA. Entretanto nenhuma mudança foi suficiente para que a amplificação fosse visualizada.

Como hipótese da não amplificação dos fragmentos desejados, acredita-se que as condições do DNA não foram ideais para a amplificação pelos oligonucleotídeos iniciadores utilizados. Novas extrações de DNA deverão ser realizadas, seguidas de novas amplificações por PCR. Ainda, outros oligonucleotídeos iniciadores, contemplando regiões mais discriminatórias do genoma fúngico poderão ser empregados. Uma alternativa para a identificação destes isolados poderia ser o sequenciamento de regiões espaçadoras internas (ITS) do DNA ribossomal.

5.4 PRODUÇÃO DE OCRATOXINA A

5.4.1 ÁGAR COCO

A técnica do Ágar Coco foi desenvolvida por Lin e Dianese em 1976, para a detecção de aflatoxina produzida por linhagens de *Aspergillus* sp.. Desde então, outros autores vem utilizando tal técnica para verificar a produção de demais micotoxinas, como citrinina (COSTA e SCUSSEL, 2002; BUGNO *et al*, 2006), ocratoxina A (COSTA e SCUSSEL, 2002; BATISTA *et al*, 2003; BUGNO *et al*, 2006; TORELLI *et al*, 2006) e esterigmatocistina (MILANEZ; SCHOENLEIN-CRUSIUS; OKINO, 2002).

Dos 47 isolados testados para o Ágar Coco, 24 (51%) mostraram ser potenciais produtores de ocratoxina A através da formação de um halo fluorescente azulado (FIGURA 16).

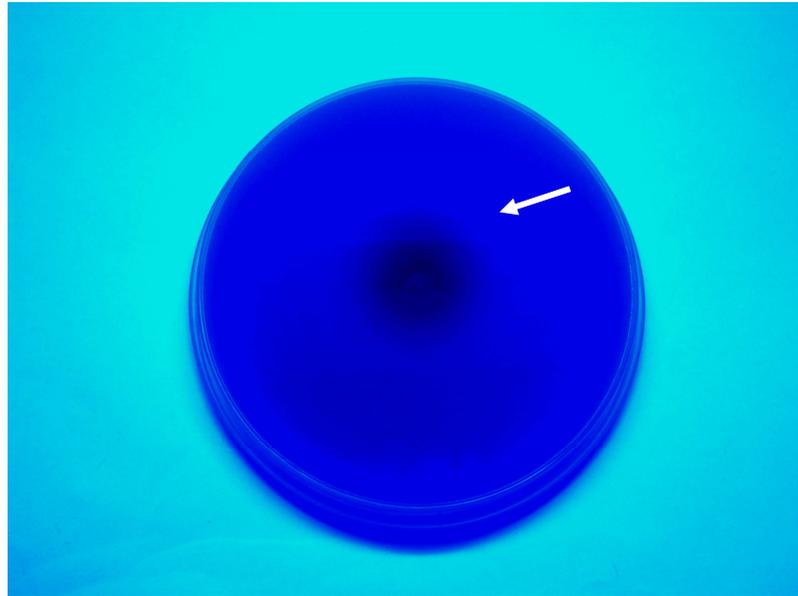


FIGURA 16 – CRESCIMENTO COLONIAL E FORMAÇÃO DE HALO DE *Aspergillus* sp. DA SEÇÃO *CIRCUMDATI* POTENCIAL PRODUTOR DE OCRATOXINA A, EM ÁGAR COCO, APÓS 3 DIAS (72 HORAS) DE CRESCIMENTO A 28°C, OBSERVADO SOB LUZ U.V. (365 nm)

FONTE: O autor (2010)

NOTA: Seta indica a formação de halo fluorescente azulado.

Dos 34 isolados da seção *Circumdati*, 20 apresentaram um halo fluorescente azulado sob a luz U.V., e dos 13 isolados da seção *Nigri*, 4 apresentaram um halo fluorescente azulado sob a luz U.V., indicando a presença de ocratoxina A (TABELA 1).

TABELA 1 – PRODUÇÃO DE OCRATOXINA A VISUALIZADA PELA FORMAÇÃO DE HALO EM MEIO ÁGAR COCO EM 3 DIAS DE CRESCIMENTO (72 HORAS) A 28°C (continua)

| Seção | Isolados | Diâmetro mm (72h) da colônia | Produção de ocratoxina A |
|-------------------|--------------|------------------------------|--------------------------|
| <i>Circumdati</i> | 1 | 1,7 | + |
| | 2 | 1,6 | + |
| | 3 | 1,5 | + |
| | 4 | 1,5 | + |
| | 5 | 2,1 | + |
| | 6 | 2 | + |
| | 7 | 1,7 | - |
| | 8 | 1,6 | - |
| | 9 | 2,1 | - |
| | 10 | 1,6 | + |
| | 11 | 1,6 | + |
| | 12 | 1,4 | - |
| | 13 | 1,7 | + |
| | 14 | 1,9 | + |
| | 15 | 1,8 | + |
| | 16 | 1,3 | - |
| | 17 | 2 | - |
| | 18 | 1,8 | + |
| | 19 | 2,5 | + |
| | 20 | 1,9 | - |
| | 21 | 2 | - |
| | 22 | 1,7 | - |
| | 23 | 1,8 | + |
| | 24 | 2,1 | + |
| | 25 | 1,5 | + |
| | 26 | 1,6 | + |
| | 27 | 1,6 | - |
| | 28 | 2,4 | - |
| | 29 | 2,2 | - |
| | 30 | 1,7 | + |
| | 31 | 2 | + |
| | 32 | 2 | - |
| | 33 | 1,7 | - |
| | <i>Nigri</i> | 34 | 2,2 |
| 35 | | 2 | + |
| 36 | | 2 | - |
| 37 | | 1,6 | + |
| 38 | | 2,1 | + |
| 39 | | 1,7 | - |

TABELA 1 – PRODUÇÃO DE OCRATOXINA A VISUALIZADA PELA FORMAÇÃO DE HALO EM MEIO ÁGAR COCO EM 3 DIAS DE CRESCIMENTO (72 HORAS) A 28°C (conclusão)

| Seção | Isolados | Diâmetro mm (72h) da colônia | Produção de ocratoxina A |
|--------------|----------|------------------------------|--------------------------|
| <i>Nigri</i> | 40 | 1,9 | - |
| | 41 | 2 | + |
| | 42 | 2,1 | - |
| | 43 | 2 | - |
| | 44 | 2 | - |
| | 45 | 2,1 | - |
| | 46 | 2,2 | - |
| | 47 | 2,5 | - |

FONTE: O autor (2010)

NOTA: +: presença de halo; -: ausência de halo.

Uma análise visual foi realizada a fim de encontrar alguma relação do tamanho da colônia com a ausência ou presença de halo. Entretanto, verificou-se que não existe nenhum tipo de relação entre esses dois fatores.

Milanez, Schoenlein-Crusius e Okino (2002) avaliaram o Ágar Coco como método para verificar a produção de aflatoxina B₁, B₂, G₁ e G₂, ocratoxina A e esterigmatocistina em 13 linhagens de *Aspergillus* sp.. Nenhuma das linhagens apresentaram as micotoxinas mencionadas, pois não foi verificada a presença de halo, sendo necessária a confirmação por cromatografia (CCD). Os resultados encontrados por Milanez, Schoenlein-Crusius e Okino (2002) não corroboram com os resultados encontrados no presente trabalho, pois foi possível verificar a presença do halo fluorescente sugerindo a presença de OTA tanto em isolados representantes da seção *Nigri* quanto em isolados representantes da seção *Circumdati*.

Comparando os dados da PCR e do teste de Ágar Coco, observa-se que dos 7 isolados identificados como *A. niger* através da PCR, somente os isolados 35 e 41 produziram um halo fluorescente azulado em Ágar Coco, identificando-os como prováveis produtores de Ocratoxina A.

Diferentes espécies de *Aspergillus* da seção *Nigri* foram relatadas em grãos de café em vários países, sendo *A. niger* e *A. carbonarius* mais frequentes. Em um estudo

de grãos de café Arabica por Taniwaki *et al.* (2003), observou-se que *A. niger* foi a espécie mais encontrada (63%), entretanto somente 3% foram capazes de produzir ocratoxina A. Fato parecido foi observado por Abarca *et al.* (1994).

Segundo os relatos de porcentagens de isolados ocratoxigênicos descritos por Abarca *et al.* (2004), a espécie *A. carbonarius* é o representante da seção *Nigri* que mais produz OTA, de 25 a 100%. A porcentagem de *A. niger* é menor, de 0,6 a 50%. Entretanto, a espécie com maior frequência em alimentos é a *A. niger*, o que pode ser explicado por uma provável identificação equivocada da espécie.

5.4.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

As análises da CLAE iniciaram com a confecção da curva de calibração. Para tal, foram utilizados 5 pontos, sendo as diluições: 0,1 µg/L, 0,5 µg/L, 1,25 µg/L, 5 µg/L e 10 µg/L. Contudo, a diluição de 0,1 µg/L não foi quantificada pelo equipamento. A curva permaneceu, portanto, com 4 pontos (0,5 µg/L, 1,25 µg/L, 5 µg/L e 10 µg/L) e o limite de quantificação da ocratoxina A foi de 0,5 µg/L (FIGURAS 17 e 18).

A curva de calibração apresentou um coeficiente de correlação de 0,9998, considerada dentro dos parâmetros utilizados atualmente. Ghali *et al.* (2008), obtiveram em seu trabalho o coeficiente de correlação de 0,996 e Dinis, Lino e Pena (2007). verificaram o coeficiente de correlação de 0,9998.

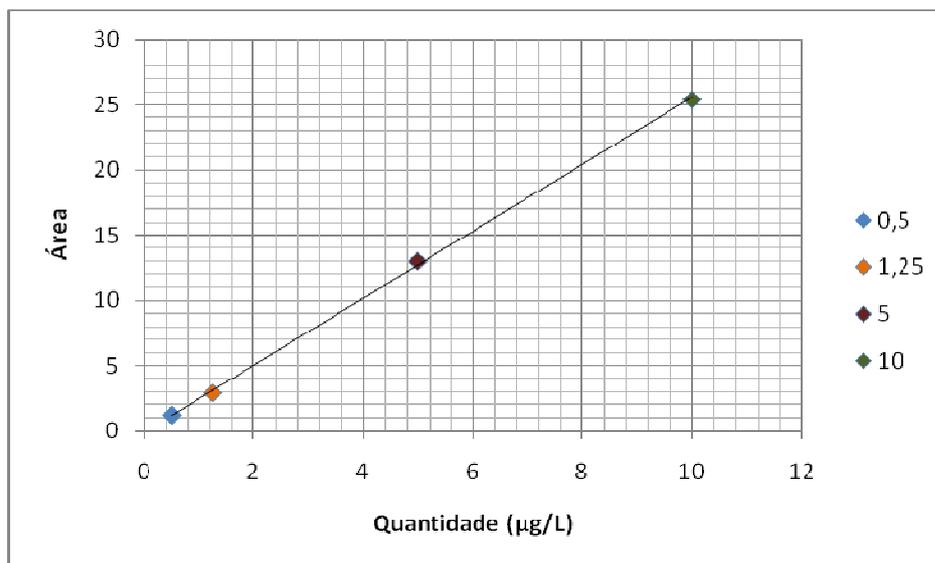


FIGURA 17 – CURVA DE CALIBRAÇÃO, COM DILUIÇÕES DE OCRATOXINA A, OBTIDA POR CLAE
FONTE: O autor (2010)

NOTA: coeficiente de correlação=0,9998.

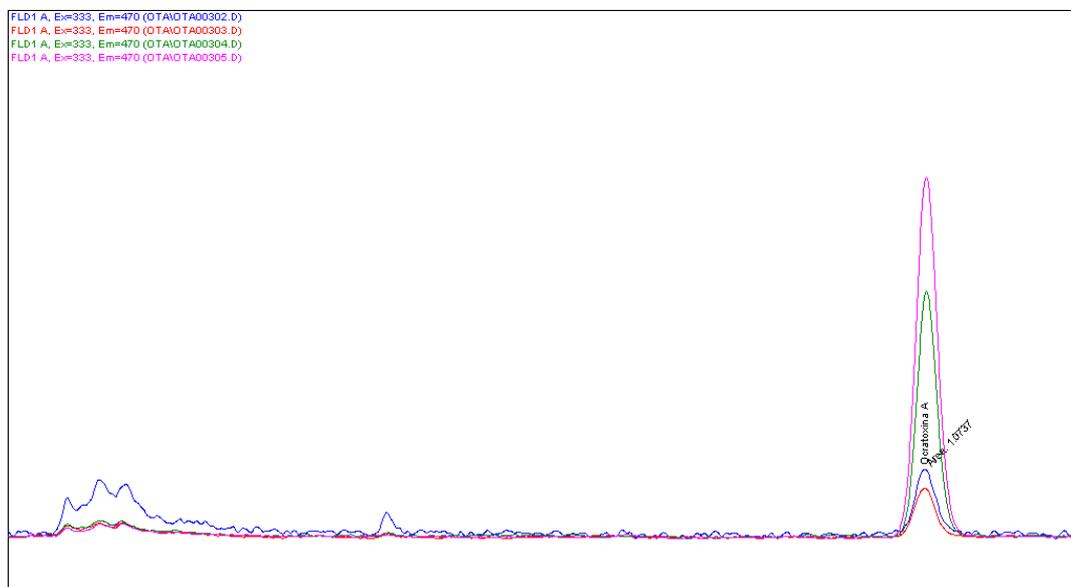


FIGURA 18 – PICOS DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DAS DILUIÇÕES DA OCRTOXINA A
FONTE: O autor (2010)

NOTA: Concentrações De ocratoxina A - Vermelho: 0,5 µg/L; Azul: 1,25 µg/L; Verde: 5 µg/L; Rosa: 10 µg/L.

Para a análise das amostras foram realizados alguns testes quanto às diluições das mesmas. Segundo Perrone *et al.* (2006), após a filtração das amostras, 100 µL destas deveriam ser diluídas em 900 µL de fase móvel. Porém, quando realizado o teste foi observado que a concentração de OTA nas amostras era baixa e esta diluição contribuía para a não detecção e quantificação. Optou-se, portanto, por usar as amostras sem diluí-las, sendo possível, assim, quantificar a micotoxina em questão.

No total foram analisadas 10 amostras (selecionadas ao acaso) em triplicata (A, B e C). A corrida para cada amostra foi de 16 minutos e o tempo de retenção da OTA variou de 12 a 14 minutos (FIGURA 19).

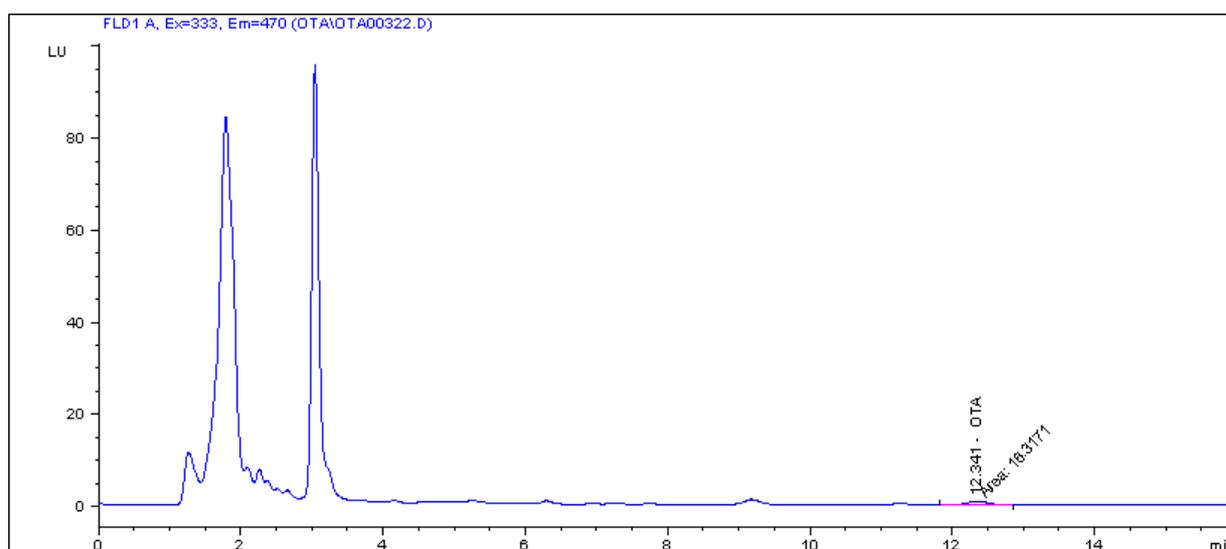


FIGURA 19 – CORRIDA DA AMOSTRA 16 B

FONTE: O autor (2010)

NOTA: Pode-se observar o pico da ocratoxina A por volta dos 12 minutos e 30 segundos.

Os resultados encontrados para as amostras e repetições podem ser observados na TABELA 2 e APÊNDICES do 1 ao 17.

TABELA 2 – PRODUÇÃO DE OCRATOXINA A POR FUNGOS DO GÊNERO *Aspergillus* sp. QUANTIFICADA ATRAVÉS DO CLAE

| Amostra | Seção | Repetições | Produção de OTA (µg/L) |
|---------|-------------------|------------|------------------------|
| 38 | <i>Nigri</i> | A | 0 |
| | | B | 0 |
| | | C | 0 |
| 41 | <i>Nigri</i> | A | 0 |
| | | B | 0 |
| | | C | 0 |
| 47 | <i>Nigri</i> | A | 0 |
| | | B | 0 |
| | | C | 0 |
| 13 | <i>Circumdati</i> | A | 1,33443 |
| | | B | 1,39291 |
| | | C | 1,95051 |
| 18 | <i>Circumdati</i> | A | 0 |
| | | B | 3,30499 |
| | | C | 0 |
| 10 | <i>Circumdati</i> | A | 1,24648 |
| | | B | 1,41722 |
| | | C | 1,60370 |
| 11 | <i>Circumdati</i> | A | 0,634607 |
| | | B | 0 |
| | | C | 1,88903 |
| 31 | <i>Circumdati</i> | A | 2,71227 |
| | | B | 0,971241 |
| | | C | 0 |
| 16 | <i>Circumdati</i> | A | 1,32428 |
| | | B | 6,39487 |
| | | C | 2,50084 |
| 20 | <i>Circumdati</i> | A | 2,52742 |
| | | B | 0 |
| | | C | 0,559545 |

FONTE: O autor (2010)

Verificou-se que, das 10 amostras avaliadas, 7 delas tinham ao menos uma repetição com concentrações quantificáveis de OTA (acima do valor de quantificação de 0,5 µg/L). As 3 amostras que não apresentaram valores de ocratoxina A são representantes da seção *Nigri* e os 7 produtores são representantes da seção *Circumdati*.

Observou-se que numa mesma amostra existiram repetições que produziram a OTA e outras repetições que não a produziram, como as amostras 18 (A = 0; B = 3,30499; C = 0) e 11 (A = 0,634607; B = 0; C = 1,88903). Observou-se ainda repetições com concentrações bem diferenciadas, sendo o caso das amostras 31 (A = 2,71227; B = 0,971241; C = 0), 16 (A = 1,32428; B = 6,39487; C = 2,50084) e 10 (A = 2,52742; B = 0; C = 0,559545).

Analisando as amostras por repetições verifica-se que, das 30 repetições, 16 (53,33%) foram capazes de produzir níveis detectáveis de ocratoxina A, enquanto 14 (46,66%) repetições não produziram a micotoxina.

Deve-se levar em conta, também, o número de esporos viáveis que foram colocados nos frascos, mesmo que a quantidade de micélio fosse padronizada.

Noonim *et al.* (2008), realizaram o isolamento, identificação e a produção de OTA por espécies de *Aspergillus* isoladas de grãos de café da Tailândia. Foram analisadas 52 amostras de fungos da seção *Circumdati* e 82 amostras de fungos da seção *Nigri* através de CLAE quanto à presença de OTA. Foi observado que todos os isolados das espécies *A. westerdijkiae* (42 isolados), *A. steynii* (13) e *A. carbonarius* (35) produziram altas quantidades de OTA, enquanto 1 isolado de *A. sclerotiorum* e 13% dos isolados de *A. niger* produziram quantidades intermediárias de OTA.

Os resultados encontrados por Noonim *et al.* (2008), concordam com os dados obtidos no presente trabalho quanto à seção *Circumdati*. Segundo os autores, os representantes da seção *Circumdati* (*A. westerdijkiae*, *A. steynii* e *A. sclerotiorum*) produziram OTA, alguns em altas quantidades; o mesmo foi visto no presente trabalho, onde todos os isolados representantes da seção *Circumdati* testados por CLAE produziram OTA. Quando se trata da seção *Nigri* os resultados obtidos no presente trabalho demonstram que nenhum dos isolados representantes desta seção produziu OTA em concentrações detectáveis, ao contrário do que ocorreu no trabalho de Noonim *et al.* (2008), onde *A. carbonarius* e *A. niger* produziram altas e intermediárias concentrações de OTA.

Resultados semelhantes aos encontrados por Noonim *et al.* (2008), foram vistos por Pardo *et al.* (2004), que analisaram a ocorrência de fungos ocratoxigênicos isolados de grãos de café. Utilizaram-se 260 isolados de *Aspergillus* da seção *Nigri* e 19 isolados

de *A. ochraceus* para a verificação da capacidade de produção da OTA por CLAE. Dentro da seção *Nigri* 6% dos isolados foram capazes de produzir OTA e 16% de isolados de *Aspergillus ochraceus* também produziram a OTA.

Bayman *et al.* (2002) avaliaram a produção de OTA, via CLAE, por fungos isolados de alimentos. Nenhum isolado de *A. ochraceus* e *A. melleus* (seção *Circumdati*) produziram OTA com valores superiores ao limite de detecção de 0,01 µg/mL. Os resultados encontrados por Bayman *et al.* (2002) diferem de resultados encontrados no presente trabalho, e também dos trabalhos de Noonim *et al.* (2008) e Pardo *et al.* (2004).

Gollücke, Taniwaki e Tavares (2004), analisaram a produção de OTA por CLAE em amostras de café verde brasileiro destinado à exportação. Os resultados demonstraram que a concentração de OTA esteve entre 0,16 ng/g e 6,24 ng/g. Tais resultados indicam que o café verde brasileiro destinado à exportação encontra-se dentro dos limites para OTA já estabelecidos.

Romani *et al.* (2000), também avaliaram a produção de OTA em grãos de café verde, entretanto os grãos analisados eram provenientes de diferentes regiões (África, América e Ásia). Das 162 amostras analisadas, 106 foram positivas para OTA, com concentrações variando de 0 a 48 µg/Kg. Segundo os limites estabelecidos para grãos de café verde (8 - 20 µg/Kg, segundo Leong *et al.* (2007) algumas amostras analisadas apresentaram valores superiores a estes limites, ao contrário dos resultados encontrados por Gollücke, Taniwaki e Tavares (2004).

Serra, Mendonça e Venâncio (2006), realizaram o isolamento de fungos de uvas em Portugal, realizando uma análise nos isolados para observar a produção de OTA. A OTA foi detectada em culturas de *A. carbonarius* e *A. ochraceus*, entretanto, nenhum isolado identificado como *A. niger* foi capaz de produzir tal micotoxina.

Perrone *et al.* (2006), realizaram o isolamento de fungos da seção *Nigri* de uvas na Itália, tendo como objetivo verificar a produção de OTA por estes isolados. Foi observado que 22 das 23 linhagens de *A. carbonarius* produziram a OTA (6 a 7500 µg/L), 5 das 20 linhagens de *A. tubingensis* produziram OTA (4 a 130 µg/L) e 3 de 15 linhagens de *A. niger* também produziram OTA (250 a 360 µg/L). As concentrações de OTA encontradas por Perrone *et al.* (2006) foram muito superiores às encontradas no

presente trabalho. Primeiramente porque, neste último, nenhum isolado representante da seção *Nigri* produziu concentrações detectáveis de OTA, mas mesmo tomando a maior concentração de OTA encontrada aqui (6,39 µg/L) ela é ainda muito inferior aos valores encontrados por Perrone *et al.* (2006).

5.4.3 Ágar Coco X CLAE

Leong *et al.* (2007), verificaram a produção de ocratoxina A por fungos do gênero *Aspergillus* isolados de grãos de café verdes do Vietnã. Para tal, realizou-se um *screening* por meio do ágar coco, sendo que aqueles isolados que não apresentaram halo fluorescente característico da produção da OTA foram avaliados através dos métodos de CCD e CLAE. Entre os resultados, observou-se que nenhum dos 98 isolados de *A. niger* testados produziu OTA em Ágar Coco, não sendo detectada também através do CCD e CLAE. Entretanto, 101 dos 113 isolados de *A. carbonarius* produziram um halo azul fluorescente típico da produção da OTA quando crescido em ágar coco. Os 12 isolados de *A. carbonarius* que não produziram fluorescência foram testados por técnicas mais sensíveis (CCD e CLAE), somente 3 desses isolados não produziram a OTA. Dos 88 isolados da seção *Circumdati* testados em Ágar Coco, nenhum deles apresentou o halo indicando a produção de ocratoxina A, sendo necessária a confirmação da presença de OTA por CCD. Durante o teste por CCD e CLAE, a produção de OTA foi observada em 11 isolados, sendo 10 deles identificados como *A. westerdijkiae*, e 1 isolado identificado como *A. steynii*. E dos 77 isolados identificados como *A. ochraceus* nenhum apresentou produção de OTA.

O Ágar Coco foi utilizado também no trabalho de Joosten *et al.* (2001) para verificar a possível produção de OTA por linhagens de *Aspergillus*. Foram utilizadas 12 linhagens de *Aspergillus*, incluindo 6 linhagens de *A. carbonarius* e 1 linhagem de *A. ochraceus* isolados de grãos de café tailandeses. Sete linhagens produziram um halo fluorescente indicando a presença de OTA, inclusive a linhagem de *A. ochraceus*. Através do teste do Ágar Coco selecionou-se uma linhagem de *A. carbonarius*, maior

produtora de OTA, para testes subsequentes de produção de OTA, como temperatura e atividade água. Foi observada uma temperatura ótima de 25°C e atividade água de 0,99 a_w para a produção de OTA.

No presente trabalho, comparando os resultados do Ágar Coco com os dados da CLAE, verificou-se que houve falsos positivos e falsos negativos (TABELA 3). Entre os falsos positivos encontram-se representantes da seção *Nigri*. Leong *et al.* (2007) encontrou falsos negativos entre as linhagens de *Aspergillus* das seções *Nigri* e *Circumdati* quando utilizado a CCD e a CLAE para confirmar os resultados do Ágar Coco.

TABELA 3 – COMPARAÇÃO DA DETECÇÃO DE OCRATOXINA A PELOS MÉTODOS DE ÁGAR COCO E CLAE

| Isolados | Seção | Detecção da produção de OTA por ágar coco | Detecção da produção de OTA por CLAE |
|----------|-------------------|--|---|
| 38 | <i>Nigri</i> | + | - |
| 41 | <i>Nigri</i> | + | - |
| 47 | <i>Nigri</i> | - | - |
| 13 | <i>Circumdati</i> | + | + |
| 18 | <i>Circumdati</i> | + | + |
| 10 | <i>Circumdati</i> | + | + |
| 11 | <i>Circumdati</i> | + | + |
| 31 | <i>Circumdati</i> | + | + |
| 16 | <i>Circumdati</i> | - | + |
| 20 | <i>Circumdati</i> | - | + |

FONTE: O autor (2010)

NOTA: +: presença de halo; -: ausência de halo.

Observou-se que o isolado 41 identificado como *A. niger* por PCR e que foi indicado como potencial produtor de OTA pelo Ágar Coco, quando testado pela CLAE não demonstrou produção de OTA (TABELA 3).

Torelli *et al.* (2006), utilizaram o meio Ágar Coco para verificar a produção de ocratoxina A por fungos do gênero *Penicillium* spp. isolados de diferentes cultivares de uva. Este estudo revelou a presença de 34 das 379 (9%) linhagens de *Penicillium* como

potenciais produtoras de ocratoxina A. Conseqüentemente os 34 isolados foram analisados por CCD. Onze fungos deram origem a pontos fluorescentes: 4 linhagens das 34 (10%) produziram um metabólito com um ponto similar em cor e valor de R_f como o padrão de OTA e da linhagem de *A. niger* produtora de OTA, enquanto outras 7 linhagens produziram 2 pontos diferentes em cor e valor de R_f do padrão de OTA e da linhagem referência. Os autores confirmam que o Ágar Coco é um método adequado para o *screening* de fungos potencialmente produtores de OTA. Entretanto, outros metabólitos podem ser fluorescentes causando interpretações erradas, portanto, análises específicas são essenciais para determinar a presença de linhagens produtoras de OTA.

Costa e Scussel (2002), utilizaram a técnica do Ágar Coco para a verificação dos potenciais produtores de aflatoxinas, ocratoxina A e citrinina, sendo estas extraídas do próprio meio com solvente orgânico, para posterior identificação e confirmação por CCD. As principais espécies produtoras de micotoxinas encontradas foram: *A. flavus* (aflatoxina), *A. parasiticus* (aflatoxina), *A. ochraceus* (ocratoxina A) e *P. citrinum* (citrinina), sendo avaliada também a quantidade de produção das micotoxinas. Para os autores, os testes toxigênicos não fornecem todas as informações devido às diferenças de comportamento dos fungos em diferentes meios ou diferentes substratos, portanto, os dados obtidos devem ser considerados somente como um indicativo.

As considerações feitas por Torelli *et al.* (2006) e Costa e Scussel (2002), são totalmente válidas, pois os dados obtidos por técnicas como o Ágar Coco não são de total certeza, sendo necessário a realização de testes confirmatórios. A técnica do Ágar Coco deve ser utilizada como um *screening* inicial, sendo capaz de indicar potenciais produtores de OTA.

Entretanto, pode-se observar que os resultados encontrados no Ágar Coco são muitas vezes confirmados por metodologias mais sensíveis como o CLAE, como foi o caso do trabalho desenvolvido por O'Callaghan, Caddick e Dobson (2003). O objetivo do trabalho era comprovar a necessidade do gene policetídeo sintetase na biossíntese da OTA em *Aspergillus ochraceus*. Após a inativação de tal gene o método do Ágar Coco foi utilizado para selecionar linhagens mutantes não produtoras de OTA. Das 216 colônias transformantes testadas no Ágar Coco, 7 foram identificadas como

atoxigênicas baseada na ausência de halo ao redor das colônias. Tais resultados foram confirmados posteriormente por CCD e CLAE.

5.5 NIRS

As mesmas amostras selecionadas para o CLAE também foram utilizadas na análise pela NIRS. Os dados obtidos pelo CLAE são de extrema importância, já que a proposta é a utilização da NIRS como método para detecção e quantificação da OTA.

Optou-se pelo uso de 2 métodos pela NIRS: a transmitância, utilizando cristais de fluoreto de cálcio, e o ATR (reflectância) com o uso de cristal de selenito de zinco. Tal escolha ocorreu, pois segundo Dowell *et al.* (2002) a reflectância mostrou melhores resultados na detecção de fumonisina (micotoxina produzida por fungos do gênero *Fusarium* sp.) quando comparados com a transmitância, entretanto, segundo Börjesson, Stenberg e Schnürer (2007) a transmitância pode ser melhor na detecção de metabólitos que apresentam concentrações muito baixas, como é o caso da ocratoxina A (APÊNDICES 18 E 19).

Observa-se na TABELA 4 os dados dos testes realizados para a utilização da NIRS na detecção da OTA (APÊNDICES 20, 21, 22, 23 e 24).

TABELA 4 – PRÉ-TRATAMENTOS (P.T.) UTILIZADOS PARA DETECÇÃO DE OCRATOXINA A, EM AMOSTRAS DE FUNGOS DO GÊNERO *Aspergillus* sp., COM SUAS VARIÁVEIS LATENTES E RESPECTIVOS VALORES DE CALIBRAÇÃO, VALIDAÇÃO, ERROS E PREDIÇÃO

| Dados | P. T. | | | Variáveis | Latentes | | | Predição | $\Sigma=(o-e)^2$ |
|---------------|-------|---------|---------|-----------|----------|---------|---------|----------|------------------|
| Reflectância | 1 | 4 | erro | 5* | erro | 6 | erro | | |
| | | C: 0,99 | C:0,04 | C: 0,99 | C: 0,01 | C:0,99 | C: 0,01 | NP:0,168 | 0,53965 |
| | | V:0,93 | V: 0,19 | V: 0,95 | V: 0,17 | V: 0,96 | V: 0,16 | P:1,168 | |
| Reflectância | 2 | 5 | erro | 6* | erro | 7 | erro | | |
| | | C: 0,99 | C: 0,01 | C: 0,99 | C: 0,01 | C:0,99 | C:0,008 | NP:0,276 | - |
| | | V: 0,96 | V: 0,16 | V: 0,96 | V: 0,15 | V: 0,91 | V: 0,15 | P:m | |
| Transmitância | 3 | 1 | erro | 2* | erro | 3 | erro | | |
| | | C: 0,97 | C: 0,11 | C: 0,99 | C: 0,05 | C:0,99 | C: 0,03 | NP:0,310 | 0,12707 |
| | | V: 0,94 | V: 0,24 | V: 0,95 | V: 0,21 | V: 0,94 | V: 0,21 | P:0,824 | |
| Transmitância | 4 | 2 | erro | 3* | erro | 4 | erro | | |
| | | C: 0,99 | C: 0,06 | C: 0,99 | C: 0,03 | C:0,99 | C: 0,01 | NP:0,363 | 0,18889 |
| | | V: 0,96 | V: 0,21 | V: 0,95 | V: 0,20 | V: 0,95 | V: 0,20 | P:0,761 | |
| Transmitância | 5 | 1 | erro | 2* | erro | 3 | erro | | |
| | | C: 0,98 | C: 0,09 | C: 0,99 | C: 0,04 | C:0,99 | C: 0,01 | NP:0,296 | 0,11824 |
| | | V: 0,97 | V: 0,22 | V: 0,97 | V: 0,19 | V: 0,97 | V: 0,19 | P:0,825 | |

FONTE: O autor (2010)

Nota: Pré-tratamentos: 1- Modelo função MSC sem 18C; 2- Modelo função MSC sem 18C e 20C; 3- Modelo função MSC; 4- Modelo função MSC sem 10A; 5- Modelo função MSC sem 10A e 31A. Predição: NP- não produtor (valor atribuído 0); P- produtor (valor atribuído 1). * Melhor número de variáveis latentes. m= não foi possível realizar a predição, o= valor observado, ou seja, valores obtidos por CLAE, e= valor obtido na predição.

Os modelos escolhidos para a realização da predição foram aqueles que obtiveram os melhores valores de calibração e validação. No caso de reflectância foram usados 2 modelos: 1- Modelo função MSC sem 18C, no qual foi realizado a transformação de reflectância para absorbância e o MSC, retirando a amostra 18C; 2- Modelo função MSC sem 18C e 20C, no qual foi realizado a transformação de reflectância para absorbância e o MSC, ainda neste caso, foram retiradas as amostras 18C e 20C para a obtenção dos melhores resultados.

Para a transmitância utilizou-se 3 modelos: 3- Modelo função MSC, tendo os valores modificados de transmitância para absorvância seguido de MSC; 4- Modelo função MSC sem 10A, o qual sofreu a modificação para absorvância, MSC e a retirada da amostra 10A; 5- Modelo função MSC sem 10A e 31A, tendo os valores modificados para absorvância seguido de MSC e a retiradas das amostras 10A e 31A.

Cada modelo possui o seu melhor número de variáveis latentes(*). Observa-se que nem sempre as melhores variáveis latentes são aquelas com os melhores valores da calibração e validação. No modelo 1, 6 variáveis latentes apresentam valor de validação maior que 5 variáveis; entretanto, quanto o menor número de variáveis latentes no modelo o erro é diminuído. Portanto, a escolha é sempre do modelo que possui menos variáveis latentes.

Ainda na tabela 4, pode-se observar os valores de predição para cada modelo, onde NP= não produtor de OTA e P= produtor de OTA. A melhor predição é aquela na qual o não produtor mais se aproxima de 0 e o produtor mais se aproxima de 1. Para facilitar mais ainda a comparação entre os modelos é usado a somatória dos erros da predição, $\Sigma=(\text{observado}-\text{esperado})^2$, onde o observado, neste caso, é a concentração de OTA detectada pelo CLAE e o esperado é o valor predito de OTA pelo programa.

Neste caso, verifica-se que o melhor modelo para detectar a OTA nas amostras foi o modelo 5. Pois o valor da somatória dos erros da predição foi o menor (0,118241), na própria predição os valores esperados estavam próximos dos valores observados e ainda, o melhor número de variáveis latentes foi 2.

Pode-se observar ainda que os outros 2 modelos que utilizaram os dados obtidos por transmitância, modelos 3 e 4, tiveram as menores variáveis latentes, melhores predições e menores valores da somatória dos erros da predição em relação aos modelos 1 e 2, que utilizaram dados da reflectância. Portanto, a transmitância mostrou-se mais eficiente na detecção de OTA em amostras de fungos.

Em relação à utilização da NIRS para a quantificação de OTA pode-se observar a TABELA 5 (APÊNDICES 25, 26, 27 e 28). A mudança que existe é a atribuição de valores, pois neste caso, sabe-se a concentração de OTA produzida pelos isolados. A amostra utilizada na predição tem a concentração de 3,30 µg/L de OTA, portanto, o

valor atribuído a amostra produtora é de 3,30. Ou seja, o melhor modelo é aquele que o não produtor se aproxima de 0 e o produtor se aproxima de 3,30.

TABELA 5 – PRÉ-TRATAMENTOS (P.T.) UTILIZADOS PARA QUANTIFICAÇÃO DE OCRATOXINA A, EM AMOSTRAS DE FUNGOS DO GÊNERO *Aspergillus* sp., COM SUAS VARIÁVEIS LATENTES E RESPECTIVOS VALORES DE CALIBRAÇÃO, VALIDAÇÃO, ERROS E PREDIÇÃO

| Dados | P. T. | | | Variáveis latentes | | | Predição | $\Sigma=(o-e)^2$ |
|---------------|-------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---|------------------|
| Reflectância | 1 | 2 | erro | 3* | erro | 4 | erro | |
| | | C: 0,95 V: 0,88 | C: 0,41 V: 0,66 | C: 0,96 V: 0,91 | C: 0,33 V: 0,56 | C: 0,97 V: 0,91 | C: 0,31 V: 0,55 NP:-0,06 P:3,131 | 0,03262 |
| Reflectância | 2 | 3 | erro | 4* | erro | 5 | erro | |
| | | C: 0,96 V: 0,84 | C: 0,24 V: 0,49 | C: 0,97 V: 0,85 | C: 0,21 V: 0,47 | C: 0,97 V: 0,85 | C: 0,18 V: 0,48 NP:0,90 P:1,93 | 2,68223 |
| Transmitância | 3 | 1 | erro | 2* | erro | 3 | erro | |
| | | C: 0,94 V: 0,79 | C: 0,29 V: 0,62 | C: 0,98 V: 0,89 | C: 0,01 V: 0,46 | C: 0,99 V: 0,89 | C: 0,11 V: 0,45 NP:0,44 P:2,54 | 0,77296 |
| Transmitância | 4 | 3 | erro | 4* | erro | 5 | erro | |
| | | C: 0,99 V: 0,95 | C: 0,04 V: 0,37 | C: 0,99 V: 0,95 | C: 0,02 V: 0,36 | C: 0,99 V: 0,95 | C: 0,01 V: 0,35 NP:-1,14 P:3,61 | 1,3957 |

FONTE: O autor (2010)

NOTA: Pré-tratamentos: 1- Modelo sem pré-tratamento; 2- Modelo sem pré-tratamento sem 16B; 3- Modelo sem pré-tratamento sem 16B; 4- Modelo função MSC sem 31A e 16B. Predição: NP- não produtor (valor atribuído 0); P- produtor (valor atribuído 3,30). * Melhor número de variáveis latentes. o= valor observado, ou seja, valores obtidos por CLAE, e= valor obtido na predição.

Pode-se observar que, para a quantificação de OTA nos modelos utilizados, os melhores resultados são do modelo 1 (Modelo sem pré-tratamento) que utilizou dados obtidos pela reflectância, e o modelo 3 (Modelo sem pré-tratamento sem 16B), utilizando dados obtidos pela transmitância. Apesar da somatória dos erros da predição ser maior no modelo 3 do que no modelo 1, o número de variáveis latentes necessárias para um melhor resultados no modelo 3 (2 variáveis latentes) é menor do que o necessário no modelo 1 (3 variáveis latentes).

Como para a quantificação de OTA os modelos que utilizaram dados obtidos por transmitância e reflectância foram muito semelhantes, optou-se por realizar uma nova análise com mais amostras para a predição e somatória dos erros das predições de 3 variáveis latentes.

Para a escolha de quais amostras seriam utilizadas na predição realizou-se um PCA (*Principal Components Analysis* – Análise de Componentes Principais), sendo escolhidas amostras de cada um dos quatro quadrantes e aquelas que se encontravam mais ao centro do modelo. (FIGURA 20)

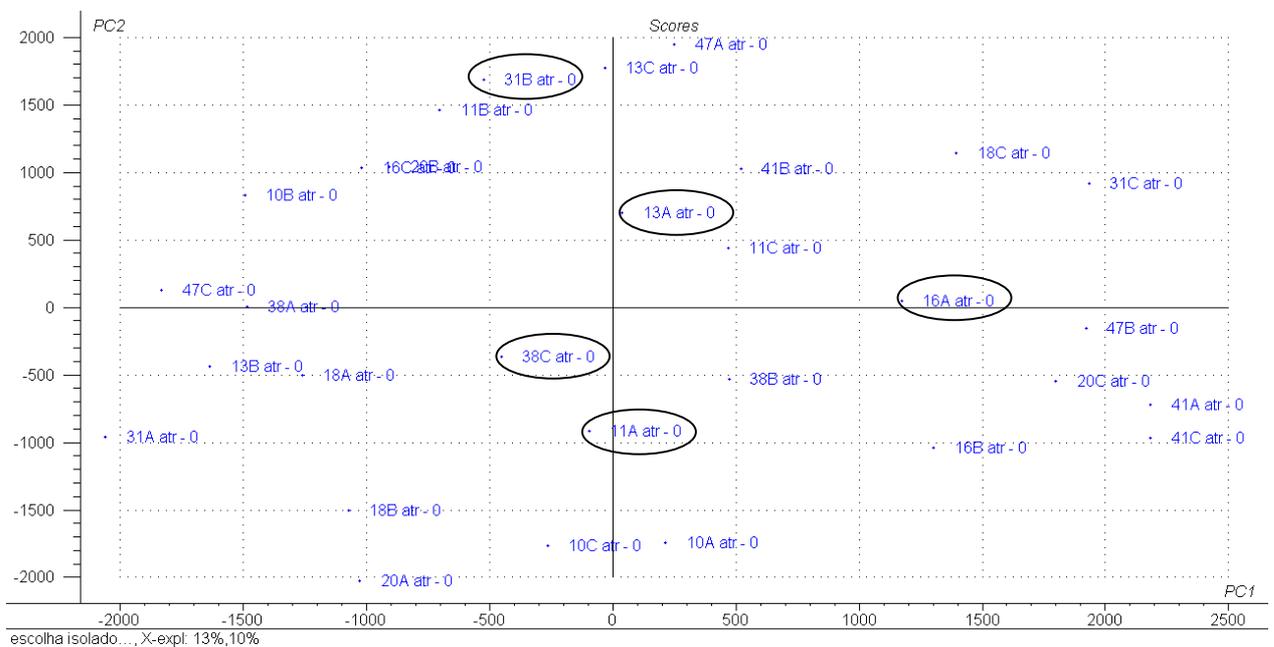


FIGURA 20 – PCA REALIZADO PARA A ESCOLHA DAS AMOSTRAS A SEREM UTILIZADAS NA PREDIÇÃO

FONTE: O autor (2010)

Nota: as amostras circuladas foram escolhidas para as predições dos modelos.

Os dados da TABELA 6 (APÊNDICES 29, 30, 31, 32) foram postados no gráfico a seguir (FIGURA 21) para melhor visualização.

TABELA 6 – PRÉ-TRATAMENTOS (P.T.) UTILIZADOS PARA QUANTIFICAÇÃO DE OCRATOXINA A, EM AMOSTRAS DE FUNGOS DO GÊNERO *Aspergillus* sp., COM SUAS VARIÁVEIS LATENTES, PREDIÇÕES E SOMATÓRIA DOS ERROS DAS PREDIÇÕES

| Dados | P. T. | Predição 2 | $\Sigma=(o-e)^2$ | Predição 3* | $\Sigma=(o-e)^2$ | Predição 4 | $\Sigma=(o-e)^2$ |
|---------------|-------|---------------|------------------|----------------|------------------|---------------|------------------|
| Reflectância | 1 | 38C:0,193 | 1,86555 | 38C:-0,019 | 0,65990 | 38C:-0,072 | 1,96578 |
| | | 13A:1,476 | | 13A:1,494 | | 13A:1,670 | |
| | | 11A:1,603 | | 11A:1,722 | | 11A:1,822 | |
| | | 31B:1,617 | | 31B:1,561 | | 31B:1,542 | |
| | | 16A:1,996 | | 16A:1,643 | | 16A:1,655 | |
| | | Predição 3 | $\Sigma=(o-e)^2$ | Predição 4* | $\Sigma=(o-e)^2$ | Predição 5 | $\Sigma=(o-e)^2$ |
| Reflectância | 2 | 38C:-0,547 | 0,68795 | 38C:-0,471 | 5,33465 | 38C:-0,405 | 0,671019 |
| | | 13A:0,755 | | 13A:-0,794 | | 13A:1,130 | |
| | | 11A:1,251 | | 11A:1,289 | | 11A:1,173 | |
| | | 31B:0,734 | | 31B:0,804 | | 31B:0,679 | |
| | | 16A:0,859 | | 16A:0,961 | | 16A:1,024 | |
| | | Predição 1 | $\Sigma=(o-e)^2$ | Predição 2* | $\Sigma=(o-e)^2$ | Predição 3 | $\Sigma=(o-e)^2$ |
| Transmitância | 3 | 38C:0,077 | 0,20486 | 38C:0,024 | 0,154843 | 38C:-0,137 | 0,71109 |
| | | 13A:1,381 | | 13A:1,591 | | 13A:1,937 | |
| | | 11A:0,475 | | 11A:0,452 | | 11A:0,092 | |
| | | 31B:0,982 | | 31B:1,204 | | 31B:1,138 | |
| | | 16A:0,932 | | 16A:1,308 | | 16A:1,244 | |
| | | Predição 2 | $\Sigma=(o-e)^2$ | Predição 3* | $\Sigma=(o-e)^2$ | Predição 4 | $\Sigma=(o-e)^2$ |
| Transmitância | 4 | 38C:0,111 | 0,02929 | 38C:0,072 | 0,018353 | 38C:0,028 | 0,028009 |
| | | 13A:1,425 | | 13A:1,409 | | 13A:1,462 | |
| | | 11A:0,685 | | 11A:0,677 | | 11A:0,654 | |
| | | 31B:1,044 | | 31B:1,045 | | 31B:1,070 | |
| | | 16A:1,300 | | 16A:1,319 | | 16A:1,343 | |

FONTE: O autor (2010)

NOTA; Pré-tratamentos: 1- Modelo sem pré-tratamento; 2- Modelo sem pré-tratamento sem 16B; 3- Modelo sem pré-tratamento; 4- Modelo função MSC sem 31A e 16B. Predição: valores obtidos pelo CLAE (valores observados) 38C: 0,00; 13A: 1,334; 11A: 0,634; 31B: 0,971; 16A: 1,324. * Melhor número de variáveis latentes. o= valor observado, ou seja, valores obtidos por CLAE, e= valor obtido na predição.

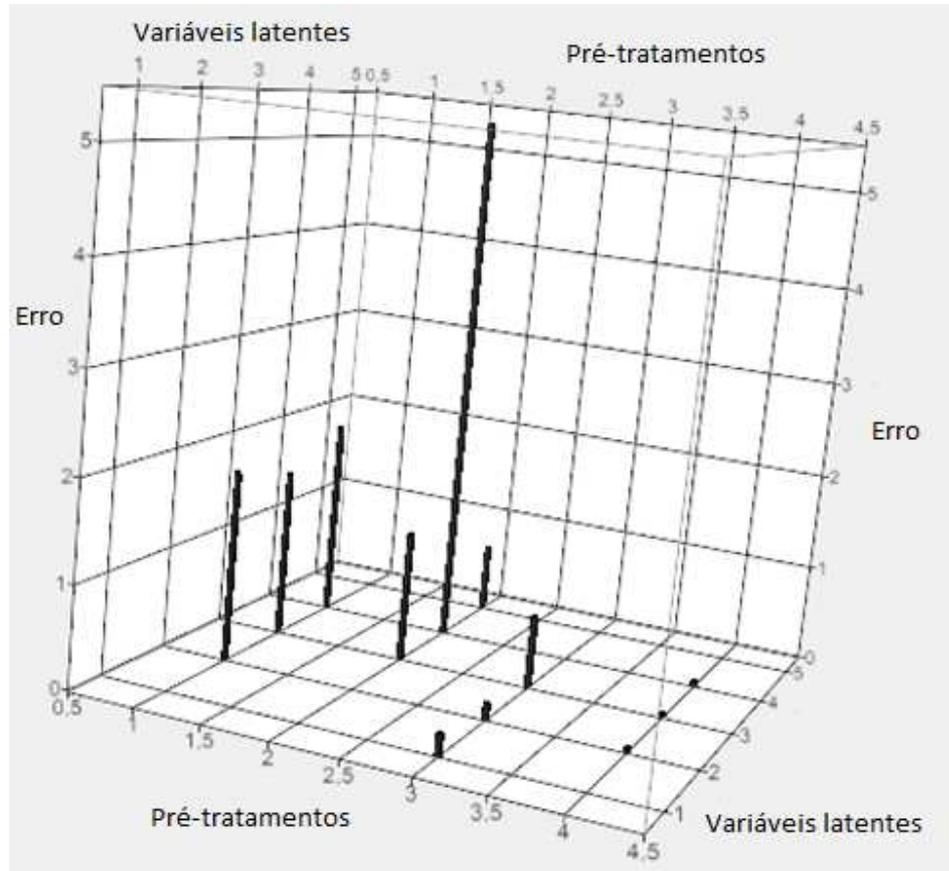


FIGURA 21 – COMPARAÇÃO ENTRE PRÉ-TRATAMENTOS, SOMATÓRIA DOS ERROS DAS PREDIÇÕES E VARIÁVEIS LATENTES

FONTE: O autor (2010)

NOTA: Pré-tratamentos: 1- Modelo sem pré-tratamento (reflectância); 2- Modelo sem pré-tratamento sem 16B (reflectância); 3- Modelo sem pré-tratamento (transmitância); 4- Modelo função MSC sem 31A e 16B (transmitância).

Na Figura 21 pode-se observar que entre os 4 modelos utilizados (1- Modelo sem pré-tratamento (reflectância); 2- Modelo sem pré-tratamento sem 16B (reflectância); 3- Modelo sem pré-tratamento (transmitância); 4- Modelo função MSC sem 31A e 16B (transmitância)), o modelo 4 teve os melhores resultados. O número de variáveis latentes foi baixo (2, 3 e 4) e a somatória dos erros das predições foi o menor. No modelo 3 nota-se que o número de variáveis (1, 2 e 3) é menor quando comparados ao modelo 4, entretanto o erro no modelo 3 é bem superior.

Já o modelo 2 obteve os piores resultados, tendo o maior número de variáveis latentes (3, 4 e 5) e os maiores erros. E o modelo 1 apresentou menores variáveis latentes (2, 3 e 4) quando comparado ao modelo 2, mas os erros ainda continuam muito altos.

Segundo esses dados, os modelos que utilizaram dados obtidos por transmitância foram os melhores (modelos 3 e 4), quando comparados aos modelos que utilizaram dados obtidos por reflectância, para a quantificação de OTA.

Estes resultados concordam com aqueles obtidos por Börjesson, Stenberg e Schnürer (2007) que dizem que a transmitância pode ser melhor na detecção de metabólitos que apresentam concentrações muito baixas, como é o caso da ocratoxina A. Os autores avaliaram a reflectância e transmitância na detecção de ergosterol em grãos, e verificaram que apesar das duas metodologias apresentarem resultados muito próximos, a transmitância, além de ser mais fácil, obteve resultados um pouco melhores.

Dowell *et al.*, (2002) também verificaram que a transmitância apresentou melhores resultados na utilização da espectroscopia por infravermelho na detecção de fumonisina em grãos, entretanto, mais experimentos com um maior número de amostras devem ser realizados.

Pettersson e Aberg (2003) utilizaram a transmitância para detectar a micotoxina deoxinivalenol (DON) em cereais. Os autores concluíram que é totalmente possível desenvolver um modelo de calibração, o qual pode ser usado para detectar a DON em trigo.

Galvis-Sánchez, Barros e Delgadillo (2007), obtiveram bons resultados quando utilizaram o ATR (reflectância) para a detecção de OTA em sucos de uva. Uma curva de calibração foi construída de 10 a 40 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de OTA. Amostras com níveis de OTA acima de 20 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ foram separados de amostras contaminadas com concentrações abaixo de 10 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ e de amostras não contaminadas.

Uma preocupação que sempre existe quando se utiliza a NIRS para a detecção de micotoxinas é a sua baixa concentração nas amostras, o que foi verificado no presente trabalho.

Börjesson, Stenberg e Schnürer (2007) também levaram em consideração as baixas concentrações de ergosterol nos grãos, entretanto a utilização da NIRS foi eficiente na sua detecção. Dowell *et al.*, (1999) sugerem a existência de uma combinação de diferentes metabólitos, ou seja, a detecção de metabólitos em baixas concentrações podem estar relacionadas a metabólitos em concentrações mais altas, facilitando a detecção pela NIRS. Em outras palavras, pode existir uma relação íntima de metabólitos produzidos em menores concentrações, com metabólitos em maiores concentrações, conseqüentemente mais fáceis de serem detectados.

Outra preocupação em relação à detecção de micotoxinas em meio líquido, como foi utilizado no presente trabalho, é a interferência da água nos resultados, afinal, a água emite sinais muito fortes nas análises da NIRS. Börjesson, Stenberg e Schnürer (2007) verificaram que a água não influenciou em seus resultados quando a NIRS foi utilizada para a detecção de ergosterol. Atualmente existe um grupo conhecido por AquaPhotomics (TSENKOVA, 2007) que defende que a água não influencia nas análises, podendo até ajudar na emissão de sinais de metabólitos menos concentrados.

Partindo de todos os resultados obtidos pelas análises da NIRS, verificou-se que tal metodologia pode ser usada como um rápido *screening* para a verificação da produção e até a quantificação de OTA por isolados fúngicos de alimentos.

6 CONCLUSÕES

- Dos 47 isolados, 13 foram identificados como sendo *Aspergillus* sp. pertencentes a seção *Nigri* e 34 isolados *Aspergillus* sp. representantes da seção *Circumdati*;
- O protocolo de extração de DNA utilizando o CIA não foi eficiente para todos os isolados de *Aspergillus* das seções *Nigri* e *Circumdati* utilizados no presente trabalho;
- Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para identificação de *A. niger* foram satisfatórios;
- Os oligonucleotídeos iniciadores para identificação de *A. ochraceus*, *A. carbonarius* e *A. westerdijkiae* não resultaram em amplificação;
- A técnica do ágar coco pode servir como um *screening* inicial, sendo capaz de indicar potenciais produtores de OTA;
- A transmitância mostrou melhores resultados na detecção e quantificação de ocratoxina A em amostras de isolados fúngicos, entretanto a reflectância pode ser uma boa alternativa;
- A utilização da NIRS para detecção e quantificação de ocratoxina A em isolados fúngicos é uma metodologia viável, entretanto, novos testes precisam ser realizados.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

Para a otimização da técnica da NIRS na detecção e quantificação de OTA, não somente em isolados fúngicos, mas também em alimentos, deve-se montar um modelo aonde são incluídas mais amostras, com mais repetições e diferentes concentração de OTA. Além da confecção de uma curva de calibração com variadas concentrações da OTA.

A possível interferência ou auxílio da água nas análises de metabólitos, como a OTA, devem ser avaliados mais cuidadosamente.

As metodologias de transmitância e reflectância se apresentam como promissoras ferramentas na detecção e quantificação da OTA, para tal, mais testes devem ser realizados utilizando essas duas metodologias. Entre eles, se propõe a realização de diluições das amostras para diminuir sinais que eventualmente estejam interferindo nas análises.

REFERÊNCIAS

ABARCA, M. L.; ACCENSI, F.; CANO, J.; CABAÑES, F. J. Taxonomy and significance of black aspergilli. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 86, p. 33-49, 2004.

ABARCA, M. L.; BRAGULAT, G.; CASTELLÁ, G.; CABAÑES, F. J. Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 7, p. 2650-2652, 1994.

ABRUNHOSA, L. J. **Estratégias para o controle de ocratoxina A em alimentos**. 236 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química e Biológica) - Escola de Engenharia, Universidade do Minho, Portugal, 2008.

ABRUNHOSA, L.; SANTOS, L.; VENÂNCIO, A. Degradation of ochratoxin A by proteases and by a crude enzyme of *Aspergillus niger*. **Food Biotechnology**, v. 20, p. 231-242, 2006.

ABRUNHOSA, L.; SERRA, R.; VENÂNCIO, A. Biodegradation of ochratoxin A by fungi isolated from grapes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p. 7493-7496, 2002.

AL-ANATI, L.; PETZINGER, E. Immunotoxic activity of ochratoxin A. **Journal Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 29, p.79-90, 2006.

ALMEIDA, A. P.; ALABURDA, J.; SHUNDO, L.; RUVIERI, V.; NAVAS, S. A.; LAMARDO, L. C. A.; SABINO, M. Ochratoxin A in Brazilian instant coffee. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 300-303, 2007.

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

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

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

BATISTA, L. R.; CHALFOUN, S. M.; PRADO, G.; SCHWAN, R. F.; WHEALS, A. E. Toxicogenic fungi associated with processed (green) coffee beans (*Coffea Arabica* L.). **International Journal of Food Microbiology**, v. 85, p. 293-300, 2003.

BAPTISTA, A. S.; HORII, J.; BAPTISTA, A. S. Fatores físico-químicos e biológicos ligados à produção de micotoxinas. **B. CEPPA**, Curitiba, v. 22, n. 1, p. 1-14, 2004.

BAYMAN, P.; BAKER, J. L.; DOSTER, M. A.; MICHAILIDES, T. J.; MAHONEY, N. E. Ochratoxin production by the *Aspergillus ochraceus* group and *Aspergillus alliaceus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 5, p. 2323-2329, 2002.

BERARDO, N.; PISACANE, V.; BATTILANI, P.; SCANDOLARA, A.; PIETRI, A.; MAROCCO, A. Rapid detection of kernel rots and mycotoxins in maize by near-infrared reflectance spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 8128-8134, 2005.

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

BEUX, M. R. **Café - estudo da diversidade microbiana de frutos de café do Brasil, seleção de cepas de leveduras e bactérias lácticas com ação fungistática contra *Aspergillus ochraceus* produtor de ocratoxina A**. 128 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

BLANCO, C.G. ***Guignardia citricarpa* Kiely: Análise genética, cariotípica e interação com o hospedeiro**. 200 f. Tese. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, 1999.

BOZZA, A.; TRALAMAZZA, S. M.; REYNAUD, D.; GABARDO, J.; VALASKI, J. C.; MARANGONI, P. R.; PIMENTEL, I. C. Isolamento de fungos associados a grãos de café cv. Iapar de origem do solo e da árvore em diferentes tempos de colheita. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 3, p. 529-534, 2009.

BÖRJESSON; T.; STENBERG; B.; SCHNÜRER; J. Near-Infrared Spectroscopy for Estimation of Ergosterol Content in Barley: A Comparison between Reflectance and Transmittance Techniques. **Cereal Chemistry**, v. 84, n. 3, p. 231-236, 2007.

BUGNO, A.; ALMODOVAR, A. A. B.; PEREIRA, T. C.; PINTO, T. J. A.; SABINO, M. Occurrence of toxigenic fungi in herbal drugs. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 47-51, 2006.

BURDASPAL, P. A.; LEGARDA, T. M. Ochratoxin A in roasted and soluble coffes marketed in Spain. **Alimentaria**, n. 296. p. 31-35, 1998.

CAMARGO, R. de. Padronização do café. **Boletim de Agricultura**, São Paulo, v. 48, p. 421-438, 1947.

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

CARVALHO, V. D.; CHALFOUN, S. M. **Cafeicultura, tecnologias de produção, gerenciamento e comercialização**: Colheita, preparo e armazenamento 1ª edição, Lavras: D4 videographics, 1999. CR-ROM.

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

CHAMBERLAIN, J. S.; GIBBS, R. A.; RANIER, J. E.; NGUYEN, P. N.; CASKEY, C. T. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. **Nucleic Acids Research**, v. 16, p. 11141 -11156, 1988.

COLE, R. J.; JARVIS, B. B.; SCHWEIKERT, M. A. Ochratoxins and related metabolites. **Handbook of secondary fungal metabolites**. Academic Press, San Diego, Califórnia, USA, p. 615-624, 2003. In: ABRUNHOSA, L. J. **Estratégias para o controle de ocratoxina A em alimentos**. 236 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química e Biológica) - Escola de Engenharia, Universidade do Minho, Portugal, 2008.

CONAB(**safras**) Disponível em <<http://www.conab.gov.br>> (acessado em: 02/07/2010).

COSTA, L. L. F.; SCUSSEL, V. M. Toxigenic fungi in beans (*Phaseolus vulgaris* L.) classes black and color cultivated in the state of Santa Catarina, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 138-144, 2002.

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

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

DOWELL, F. E.; PEARSON, T. C.; MAGHORANG, E. B.; XIE, F.; WICKLOW, D. T. Reflectance and transmittance spectroscopy applied to detecting fumonisin in single corn kernels infected with *Fusarium verticillioides*. **Cereal Chemistry**, v. 79, n. 2, p. 222-226, 2002.

DOWELL, F. E.; RAM, M. S.; SEITZ, L. M. Predicting scab, vomitoxin, and ergosterol in single wheat kernels using near infrared spectroscopy. **Cereal Chemistry**, v. 76, p. 573-576, 1999 In: BÖRJESSON; T.; STENBERG; B.; SCHNÜRER; J. Near-Infrared Spectroscopy for Estimation of Ergosterol Content in Barley: A Comparison between Reflectance and Transmittance Techniques. **Cereal Chemistry**, v. 84, n. 3, p. 231-236, 2007.

DOWELL, F.E. Effect of NaOH on visible wavelength spectra of single wheat kernels and color classification efficiency. **Cereal Chemistry**, v. 74, p. 617-620, 1997.

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

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

ESSENDUBI, M; TOUBAS, D; LEPOUSE, C; LEON, A; BOURGEADE, F; PINON, J; MANFAIT, M; SOCKALINGUM, G. D. Epidemiological investigation and typing of

Candida glabrata clinical isolates by FTIR spectroscopy. **Journal of Microbiological Methods**, v. 71, p. 325-31, 2007.

FERRARINI, H. **Determinação de teores nutricionais do milho por espectroscopia no infravermelho e calibração multivariada**. 125f. Dissertação (Mestrado em Química) – Setor de Ciências exatas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

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

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

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

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

FUNGARO, M. H. P.; VIEIRA, M. L. C. Marcadores moleculares 2001. *In*: SERAFINI, I.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. **Biotecnologia na Agricultura e na Agroindústria**, Agropecuária, 2001.

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

FURLANI, R. P. Z.; OLIVEIRA, P. L.; SOARES, L. M. V. Incidência de ocratoxina A em café verde proveniente de várias regiões brasileiras, **IX Encontro Nacional de Micotoxinas**, 18-21 maio, 1998, Florianópolis. Livro de Resumos. Universidade Federal de Santa Catarina, 175 p., 1998.

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

GALVIS-SÁNCHEZ, A.; BARROS, A.; DELGADILLO, I. FTIR-ATR infrared spectroscopy for the detection of ochratoxin A in dried vine fruit. **Food Additives and Contaminants**. v. 24, n. 11, p. 1299-1305, 2007.

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

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

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

GILBERT, J.; ANKLAN, E. Validation of analytical methods for determining mycotoxins in foodstuffs. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 21, p. 468- 486, 2002.

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

GOLLÜCKE, A. P. B.; TANIWAKI, M. H.; TAVARES, D. Q. Survey on ochratoxin A in Brazilian green coffee destined for exports. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 4, p. 641-645, 2004.

HARA, S.; HESSELTINE, C. Aflatoxin-producing strains of *Aspergillus flavus* detected by fluorescence of agar medium under ultraviolet light. **Applied Microbiology**, v. 27, p. 1118-1123, 1974.

HERNÁNDEZ-HIERRO, J. M.; GARCÍA-VILLANOVA, R. J.; GONZÁLEZ-MARTÍN, I. Potential of near infrared spectroscopy for the analysis of mycotoxins applied to naturally

contaminated red paprika found in the Spanish market. **Analytica Chimica Acta**, v. 622, p.189-194, 2008.

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

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

IAPAR: **Café** - Disponível em <<http://www.pr.gov.br/iapar/cafe/iapar59.html>> (acessado em 18/10/07)

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

JECFA. Disponível em <<http://www.codexalimentarius.net/web/jecfa.jsp>> (acessado em: 30/05/07)

JOOSTEN, H. M. L. J.; GOETZ, J.; PITTET, A.; SCHELLENBERG, M.; BUCHELI, P. Production of ochratoxin A by *Aspergillus carbonarius* on coffee cherries. **International Journal of Food Microbiology**, v. 65, p. 39-44, 2001.

JORDAN, J. A. Real time detection of PCR products and microbiology. **Trends Guide**, v. 12, p. 61-66, 2000.

KERN, M. E.; BLEVINS, K. S. **Micologia médica – Texto e Atlas.** 2. ed. São Paulo: Editorial Premier, 1999.

KLICH, M. A. Identification of clinically relevant aspergilli. **Medical Mycology**. v. 44, p. 127-131, 2006.

KROG, P. Mycotoxin porcine nephropathy: a possible model for Balkan endemic nephropathy. 1974. In: PERAICA, M.; DOMIJAN, A. M.; MILETIC-MEDVED, M.;

FUCHS, R. The involvement of micotoxins in the development of endemic nephropathy. **Wiener Klinische Wochenschrift**, p. 402-407, 2008.

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

LEONG, S. L.; HIEN, L. T.; AN, T. V.; TRANG, N. T.; HOCKING, A. D.; SCOTT, E. S. Ochratoxin A production Aspergilli in vietnamese green coffee beans. **Letters in Applied Microbiology**, v. 45, p. 301-306, 2007.

LEVI, C. P.; TRENK, H. L.; MOHR, H. K. Study of the occurrence of ochratoxin A in green coffee beans. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, New York, v. 57, p. 866-870, 1974.

LIN, M. T.; DIANESE, J. C. A coconut agar medium for rapid detection of aflatoxin production by *Aspergillus* spp. **Phytopathology**, v. 66, p.1466-1469, 1976.

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

LOPES, L. M. V. **Avaliação da qualidade de grãos crus e torrados de cultivares de cafeeiro (*Coffea arabica* L.)**. Dissertação. Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000.

MAGNANI, M.; FERNANDES, T.; PRETE, C. E. ; HOMECHIN, M. ; ONO, E. Y. ; VILASBOAS, L. A.; SARTORI, D.; FURLANETO, M. C.; FUNGARO, M. H. P. . Molecular Identification of *Aspergillus* spp. Isolated from Coffee Beans. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 62, n. 1, p. 45-49, 2005.

MARTINS, M. L.; MARTINS, H. M.; GIMENO, A. Incidence of microflora and of ochratoxin A in green coffee beans (*Coffea arabica*). **Food Additives and Contaminants**, London, v. 20, p. 1127-1131, 2003.

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

MICCO, C.; GOSSI, M.; MIRAGLIA, M.; BRERA, C. A study of the contamination by ochratoxin A of green and roasted coffee beans. **Food Additives and Contaminants**, v. 6, n. 3, p. 333-339, 1989.

MILANEZ, T.; SCHOENLEIN- CRUSIUS, I.; OKINO, L. K. Evaluation of Brazilian terrestrial *Aspergillus* strains for mycotoxin production. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 61, n.1, p.7-11, 2002.

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

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

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

NAUMANN, D.; FIJALA, V. LABISCHINSKI, H. The rapid differentiation and identification of pathogenic bacteria using Fourier Transform infrared spectroscopic and multivariate statistical analysis. **Structure**, v. 174, p. 165- 170, 1988.

NAUMANN, D; HELM, D; LABISCHINSKI, H. Microbiological characterizations by FT-IR spectroscopy. **Nature**, v. 351, p. 81-82, 1991.

NAUMANN, D.; SCHULTZ, C. P.; HELM, D. When can infrared spectroscopy tell us about the structure and composition of intact bacterial cell?. **Infrared spectroscopy of biomolecules**, New York, 1996.

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

NOONIM, P.; MAHAKARNCHANAKUL, W.; NIELSEN, K. F.; FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. Isolation, identification and toxigenic potential of ochratoxina A-

producing *Aspergillus* species from coffee beans grown in two regions of Thailand. **International Journal of Food microbiology**. v. 128, p. 197-202, 2008.

O`CALLAGHAN, J.; CADDICK, M. X.; DOBSON, A. D. W. A polyketide synthase gene required for ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus ochraceus*. **Microbiology**, v. 149, p. 3485-3491, 2003.

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

ÖZPINAR, H.; BILAL, T.; ABAS, I.; KUTAY, C. Degradation of ochratoxin A in rumen fluid in vitro. **Medicine and Biology**, v. 9, n. 1, p. 66-69, 2002.

PARDO, E.; MARÍN, S.; RAMOS, A. J.; SANCHIS, V. Occurrence of ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in green coffee from different origins. **Food Science Technology International**, v. 10, p. 45-49, 2004.

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

PASQUINI, C. Near infrared spectroscopy: Fundamentals, practical aspects and analytical applications. **Journal Brazilian Chemistry Society**, v. 14, n. 2, p. 198-219, 2003.

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

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

PETTERSSON, H.; ABERG, L. Near infrared spectroscopy for determination of mycotoxins in cereals. **Food Control**, v. 14, p. 229-232, 2003.

PEZZINI, V.; VALDUGA, E.; CANSIANI, R. L. Incidência de fungos e micotoxinas em grãos de milho e armazenados sob diferentes condições. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 64, n.1, p. 91-96, 2005.

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

PIMENTA, J. C.; VILELA E. R. Composição microbiana e ocratoxina no café (*Coffea arabica* L.) submetido a diferentes tempos de espera de secagem. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.27, n.6, nov./dez, 2003.

PIOTROWSKA, M.; ZAKOWSKA, Z. The biodegradation of ochratoxin A in food products by lactic acid bacteria and baker's yeast. **Food Biotechnonology**, v. 17, p. 307-310, 2000.

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

PRADO, G.; OLIVEIRA, M. S. de; ABRANTES, F. M.; SANTOS, L. G. dos, VELOSO, T.; BARROSO, R. E. de S. Incidência de ocratoxina A em café torrado e moído e em café solúvel consumido na cidade de Belo horizonte, MG. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 20, n. 2, p.192-196, mai./ago., 2000.

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

RAEDER, U.; BRODA, P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.1, p.17-20, 1985.

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

RINGOT, D.; CHANGO, A.; SCHNEIDER, Y. J.; LARONDELLE, Y. Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update. **Chemico- biological interactions**. v. 159, n. 1, p. 18-46, 2006. In: ABRUNHOSA, L. J. **Estratégias para o controle de**

ochratoxina A em alimentos. 236 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química e Biológica) - Escola de Engenharia, Universidade do Minho, Portugal, 2008.

RODRIGUEZ-FERNANDEZ, J. I. R. **Coenosiini neotropicais (Muscidae: Diptera): Taxonomia, filogenia e contribuição da espectroscopia do infravermelho próximo.** 150 f. Tese (Doutorado em zoologia) – Setor de Zoologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

ROMANI, S.; SACCHETTI, G.; LÓPEZ, C. C.; PINNAVAIA, G. G.; DALLA ROSA, M. Screening on the occurrence of ochratoxin A in green coffee beans of different origins and types. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 8, p. 3616-3619, 2000.

RUHLAND, M.; ENGELHARDT, G.; WALLNOFER, P. R. Transformation of the mycotoxin ochratoxin A in plants. Time course and rates of degradation and metabolite production in cell-suspension cultures of different crop plants. **Mycopathologia**, v. 134, n. 2, p. 97-102, 1996. In: ABRUNHOSA, L.; SANTOS, L.; VENÂNCIO, A. Degradation of ochratoxin A by proteases and by a crude enzyme of *Aspergillus niger*. **Food Biotechnology**, v. 20, p. 231-242, 2006.

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

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

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

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

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

SCHATZMAYR, G.; HEIDLER, D.; FUCHS, E.; MOHNL, M.; TÄUBEL, M.; LOIBNER, A. P.; BRAUN, R.; BINDER, E. M. Investigation of different yeast strains for the detoxification of ochratoxin A. **Mycotoxin Research**, v. 19, p. 124-128, 2003.

SCHMIDT, H.; EHRMANN, M.; VOGEL, R.; TANIWAKI, M. H.; NIESSEN, L. Molecular Typing of *Aspergillus ochraceus* and Construction. **Systems Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 26, p.138–146, 2003.

SERRA, R.; MENDONÇA, C.; VENÂNCIO, A. Fungi and ochratoxin A detected in healthy grapes for wine production. **Letters in Applied Microbiology**, v. 42, p. 42-47, 2006.

SIBANDA, L. Development of a Flow through enzyme immunoassay and application in screening green coffee samples for ochratoxin A with confirmation by High Performance Liquid Chromatography. **Journal Food Protection**, v. 64, n. 10, p. 1597-1602, 2001.

SINGH, C. B.; PALIWAL, J.; JAYAS, D. S.; WHITE, N. D. G. Near-infrared spectroscopy: Applications in the grain industry. **The Canadian Society for Bioengineering**, n. 6-189, 2006.

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

STANCZYK F.Z. Limitations of direct estradiol and testosterone immunoassay kits. **Steroids**, v. 68, p.1173-1178, 2003.

STEYN, P. S.; HOLZAPFEL, C. W.; FERREIRA, N. P. The biosynthesis of the ochratoxins, metabolites of *Aspergillus ochraceus*. **Phytochemistry**, v. 9, n. 9, p. 1977-1983, 1970. In ABRUNHOSA, L. J. **Estratégias para o controle de ocratoxina A em alimentos**. 236 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química e Biológica) - Escola de Engenharia, Universidade do Minho, Portugal, 2008.

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

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

SYDENHAM, E. W.; SHEPHARD, G. S. Chromatographic and allied methods of analysis for selected mycotoxins. In: GILBERT J. **Progress in Food Contaminants Analysis**, London: Blackie Academic & Professional. p.65-146, 1996.

SZEGHALMI, A.; KAMINSKY, S; GOUGH, K. M. A synchrotron FTIR microspectroscopy investigation of fungal hyphae grown under optimal and stressed conditions. **Anal Bioanal Chemistry**, v. 387, p. 1779-1789, 2007.

TANIWAKI, M. H.; URBANO, G. R.; PALACIOS, H. A. C.; LEITAO, M. F. F.; MENEZES, H. C.; VICENTINI, M. C.; IAMANAKA, B. T.; TANIWAKI, N. N. Influence of water activity on mould growth and ochratoxin A production in coffee. 19 st ASIC Coffee Conference, Trieste, Italy, 14-18 May 2001. In: SUÁREZ-QUIROZ, M.; GONZÁLEZ-RIOS, O.; BAREL, M.; GUYOT, B.; SCHORR_GALINDO, S.; GUIRAUD, J. P. Effect of chemical and environmental factors on *Aspergillus ochraceus* growth and toxigenesis in green coffee. **Food Microbiology**, v. 21, p. 629-634, 2004.

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

TANIWAKI, M.H. An update on ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in coffee. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, New York, v. 571, p. 189–202, 2006.

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

TORELLI, E.; FIRRAO, G.; LOCCI, R.; GOBBI, E. Ochratoxin A- producing strains of *Penicillium* spp. isolated from grapes used for the production of “passito” wines. **International Journal of Food Microbiology**, v. 106, p. 307-312, 2006.

TSENKOVA, R. AquaPhotomics: water absorbance pattern as a biological marker for disease diagnosis and disease understanding. **Journal of Near Infrared Spectroscopy**. v. 18, n. 14, 2007.

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

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

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

VICENTE, V. A. **Isolamento e caracterização de fungos da cromoblastomicose**. Piracicaba, 200p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, 2000.

VISCONTI, A.; GIROLAMO, A. Fitness for purpose: Ochratoxin A analytical developments. **Food Additives and Contaminants**. v. 22, n.1, p.37-44, 2005. In: ABRUNHOSA, L. J. **Estratégias para o controle de ocratoxina A em alimentos**. 236 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química e Biológica) - Escola de Engenharia, Universidade do Minho, Portugal, 2008.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VANDE LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, v. 23, p. 4407 – 4414, 1995.

WANG, D.; DOWELL, F. E.; RAM, M.S.; SCHAPAUGH, W. T. Classification of fungal-damaged soybean seeds using near-infrared spectroscopy. **International Journal of Food Properties**, v. 7, p. 75-82. 2004.

WELSH, J.; McCLELLAND, M. Fingerprinting using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acid Research**, London, v. 18, p. 7213-7218, 1990.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, A. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary *primers* are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v.18, n. 22, p. 6531 - 6535, 1990.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). Report of the 56th Meeting of the Joint FAO/WHO **Expert Committee on Food Additives**, Geneva, Switzerland, 6 –15 February, 2002.

XAVIER, M. O.; MADRID, I. M.; CLEFF, M. B.; CABAN, A. I.; SILVA-FILHO, R. P.; MEIRELES, M. C. A. Contaminação do ar por *Aspergillus* em ambiente de reabilitação de animais marinhos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 45, n. 3, p. 174-179, 2008.

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

APÊNDICES

APÊNDICE 1 – CURVA DE CALIBRAÇÃO OBTIDA POR CLAE

Mod C:\HPCHEM\1\METHODS\OTA_LC.M

Calibration Table

Ocratoxina A

Calib. Data Modified : Thursday, 11e January 1e 1998 07:31:27

Calculate : External Standard
Based on : Peak Area

Rel. Reference Window : 5.000 %
Abs. Reference Window : 0.000 min
Rel. Non-ref. Window : 5.000 %
Abs. Non-ref. Window : 0.000 min
Uncalibrated Peaks : not reported
Partial Calibration : Yes, identified peaks are recalibrated
Correct All Ret. Times: No, only for identified peaks

Curve Type : Linear
Origin : Included
Weight : Equal

Recalibration Settings:
Average Response : Average all calibrations
Average Retention Time: Floating Average New 75%

Calibration Report Options :

Printout of recalibrations within a sequence:
Calibration Table after Recalibration
Normal Report after Recalibration
If the sequence is done with bracketing:
Results of first cycle (ending previous bracket)

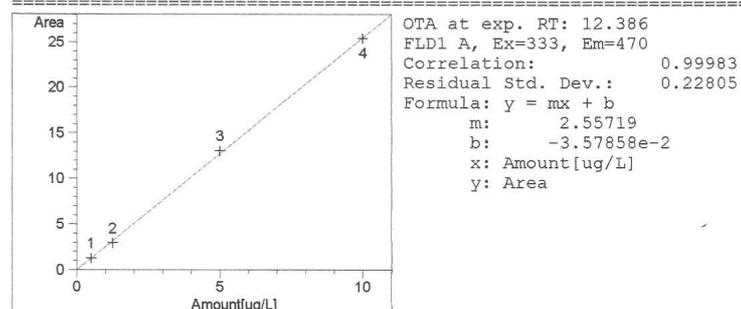
Signal 1: FLD1 A, Ex=333, Em=470

| RetTime [min] | Lvl Sig | Amount [ug/L] | Area | Amt/Area | Ref Grp Name |
|------------------|------------|------------------|----------|------------|--------------|
| 12.386 | 1 | 5.00000e-1 | 1.25484 | 3.98458e-1 | OTA |
| | 2 | 1.25000 | 2.93602 | 4.25747e-1 | |
| | 3 | 5.00000 | 13.04890 | 3.83174e-1 | |
| | 4 | 10.00000 | 25.41418 | 3.93481e-1 | |

Peak Sum Table

No Entries in table

Calibration Curves



APÊNDICE 2 – DETECÇÃO DE OCRATOXINA A NA AMOSTRA 13 A POR CLAE

a File C:\HPCHEM\1\DATA\OTA\OTA00318.D

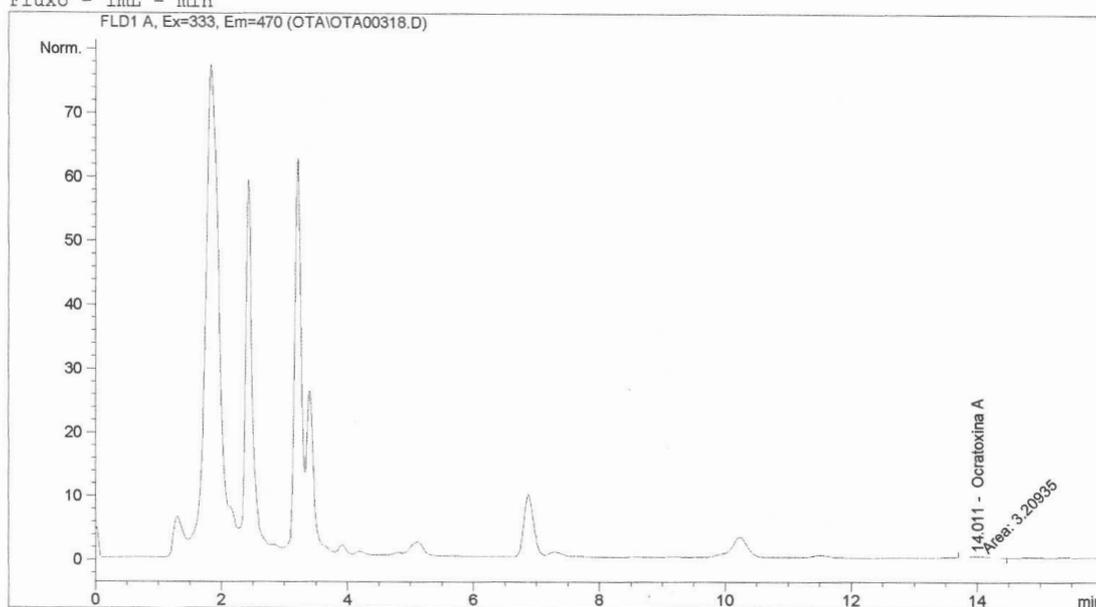
Sample Name: Amostra 4A

```

=====
Injection Date   : 1/1/1998 07:02:23
Sample Name     : Amostra 4A                      Location : Vial 1
Acq. Operator   : Angela
Acq. Method     : C:\HPCHEM\1\METHODS\OTA_LC.M
Last changed    : 1/1/1998 04:03:28 by Angela
                  (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OTA_LC.M
Last changed    : 1/1/1998 07:40:09 by Angela
                  (modified after loading)
  
```

```

Determinação de Ocratoxina A
Coluna - ZorbaxC18 150mm 4,6mm 5um
Fase Móvel - ACN-ácido Acético (41:59)
Fluxo - 1mL - min
  
```



External Standard Report

```

Sorted By       : Signal
Calib. Data Modified : Thursday, 1 1e January 1e 1998 07:27:52
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
  
```

Signal 1: FLD1 A, Ex=333, Em=470

| RetTime [min] | Type | Area LU | Amt/Area *s | Amount [ug/L] | Grp | Name |
|---------------|------|---------|-------------|---------------|-----|--------------|
| 14.011 | MM | 3.20935 | 4.15795e-1 | 1.33443 | | Ocratoxina A |

Totals : 1.33443

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

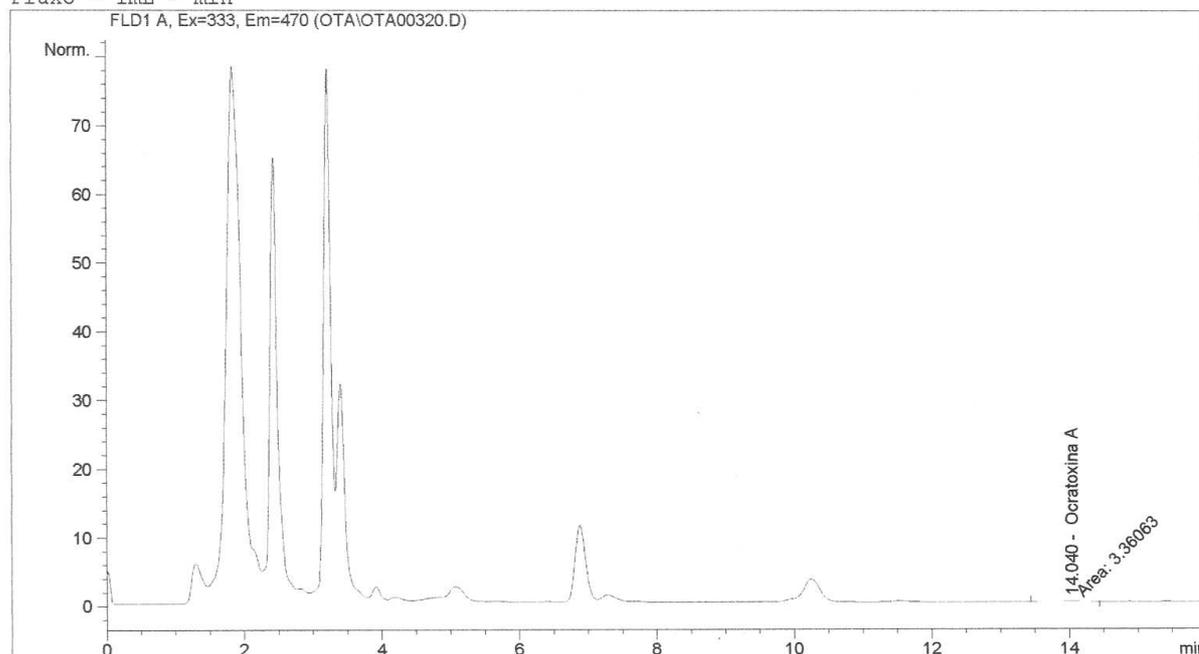
APÊNDICE 3 – DETECÇÃO DE OCRATOXINA A NA AMOSTRA 13B POR CLAE

```

=====
Injection Date   : 1/1/1998 07:37:10
Sample Name     : Amostra 4B                      Location : Vial 1
Acq. Operator   : Angela
Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\OTA_LC.M
Last changed   : 1/1/1998 04:03:28 by Angela
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OTA_LC.M
Last changed   : 1/1/2010 08:26:48 by Angela
                (modified after loading)
  
```

```

Determinação de Ocratoxina A
Coluna - ZorbaxC18 150mm 4,6mm 5um
Fase Móvel - ACN-ácido Acético (41:59)
Fluxo - 1mL - min
  
```



External Standard Report

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 1/1/2010 08:26:47
Multiplier    : 1.0000
Dilution      : 1.0000
  
```

Signal 1: FLD1 A, Ex=333, Em=470

| RetTime [min] | Type | Area LU | Amt/Area *s | Amount [ug/L] | Grp | Name |
|---------------|------|---------|-------------|---------------|-----|--------------|
| 14.040 | MM | 3.36063 | 4.14480e-1 | 1.39291 | | Ocratoxina A |

Totals : 1.39291

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

APÊNDICE 4 – DETECÇÃO DE OCRATOXINA A NA AMOSTRA 13 C POR CLAE

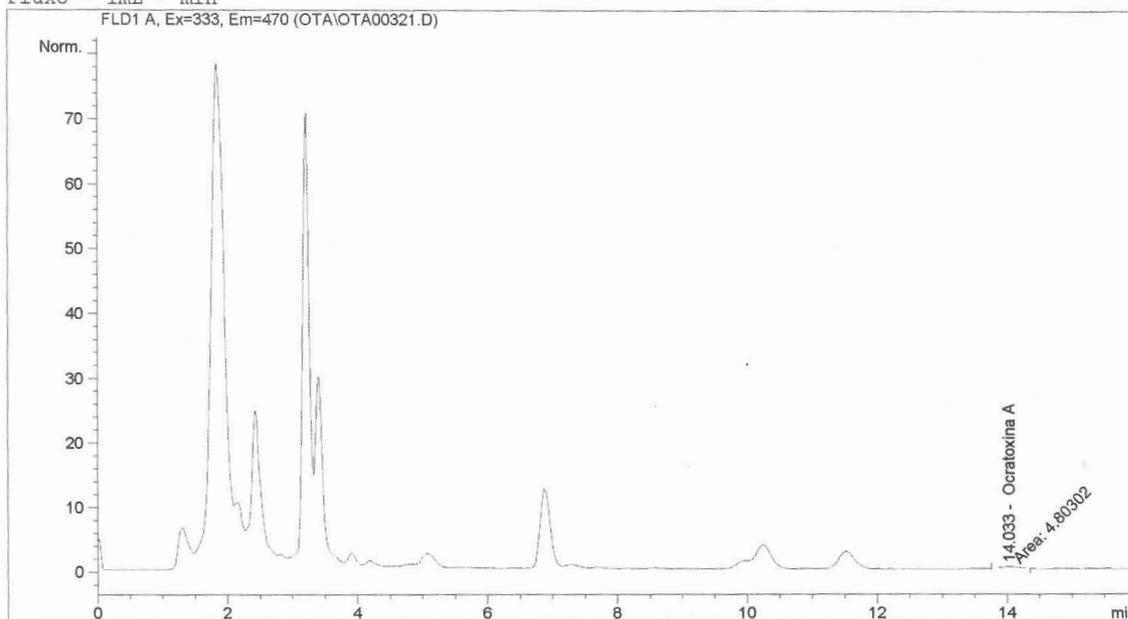
a File C:\HPCHEM\1\DATA\OTA\OTA00321.D

```

=====
Injection Date   : 1/1/1998 07:55:05
Sample Name     : Amostra 4C                      Location : Vial 1
Acq. Operator  : Angela
Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\OTA_LC.M
Last changed   : 1/1/1998 04:03:28 by Angela
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OTA_LC.M
Last changed   : 1/1/2010 08:26:48 by Angela
                (modified after loading)
  
```

```

Determinação de Ocratoxina A
Coluna - ZorbaxC18 150mm 4,6mm 5um
Fase Móvel - ACN-ácido Acético (41:59)
Fluxo - 1mL - min
  
```



External Standard Report

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 1/1/2010 08:26:47
Multiplier    : 1.0000
Dilution      : 1.0000
  
```

Signal 1: FLD1 A, Ex=333, Em=470

| RetTime [min] | Type | Area LU | Amt/Area *s | Amount [ug/L] | Grp | Name |
|---------------|------|---------|-------------|---------------|-----|--------------|
| 14.033 | MM | 4.80302 | 4.06101e-1 | 1.95051 | | Ocratoxina A |

Totals : 1.95051

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

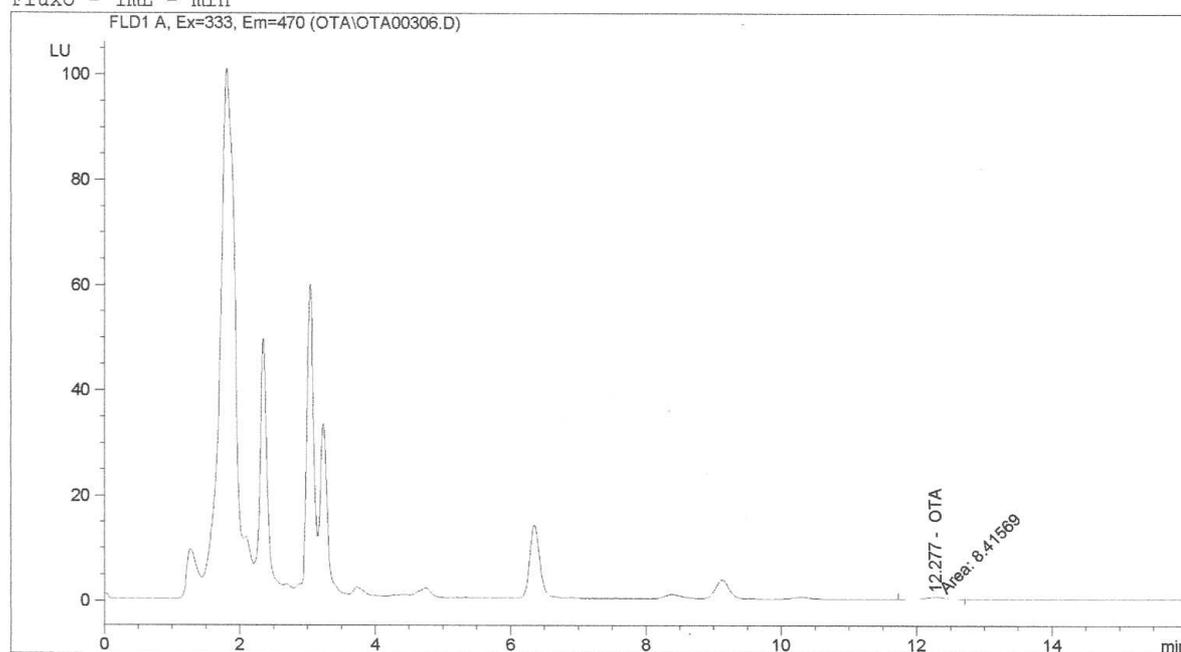
APÊNDICE 5 – DETECÇÃO DE OCRATOXINA A NA AMOSTRA 18B POR CLAE

```

=====
Injection Date   : 1/1/1998 04:27:12
Sample Name     : Amostra 5B                      Location : Vial 1
Acq. Operator   : Eriel
Acq. Method     : C:\HPCHEM\1\METHODS\OTA_LC.M
Last changed    : 1/1/1998 04:22:39 by Eriel
                 (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OTA_LC.M
Last changed    : 1/1/1998 07:31:29 by Eriel
                 (modified after loading)
  
```

```

Determinação de Ocratoxina A
Coluna - ZorbaxC18 150mm 4,6mm 5um
Fase Móvel - ACN-ácido Acético (41:59)
Fluxo - 1mL - min
  
```



External Standard Report

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : Thursday, 1 1e January 1e 1998 07:31:27
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
  
```

Signal 1: FLD1 A, Ex=333, Em=470

| RetTime [min] | Type | Area LU | Amt/Area *s | Amount [ug/L] | Grp | Name |
|---------------|------|---------|-------------|---------------|-----|------|
| 12.277 | MM | 8.41569 | 3.92718e-1 | 3.30499 | OTA | |

Totals : 3.30499

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

APÊNDICE 6 – DETECÇÃO DE OCRATOXINA A NA AMOSTRA 10A POR CLAE

a File C:\HPCHEM\1\DATA\OTA\OTA00308.D

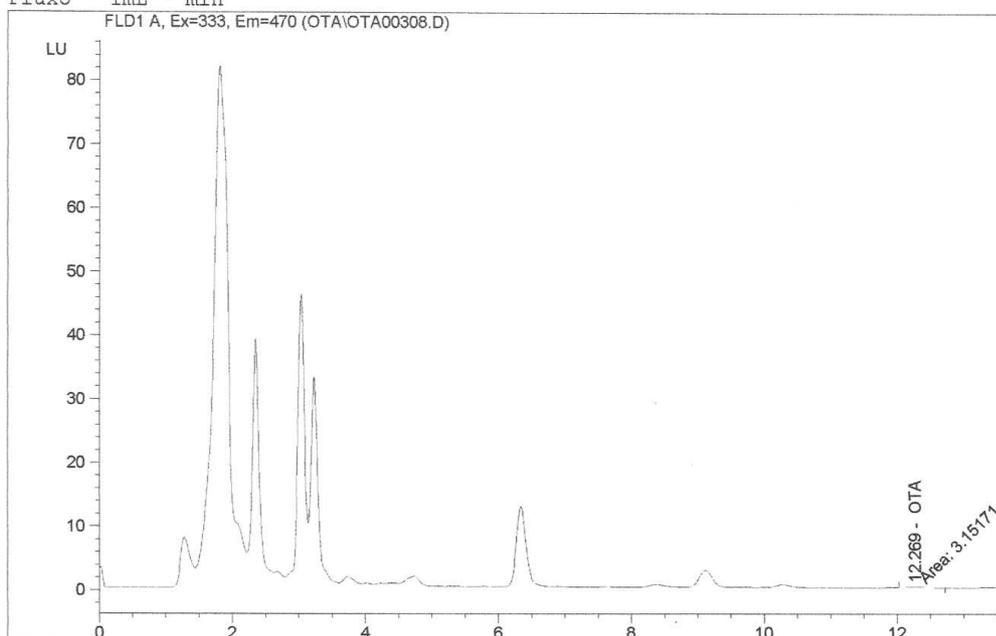
Sample Name

```

=====
Injection Date   : 1/1/1998 05:02:21
Sample Name     : Amostra 6A                      Location : Vial 1
Acq. Operator   : Eriel
Acq. Method     : C:\HPCHEM\1\METHODS\OTA_LC.M
Last changed    : 1/1/1998 04:22:39 by Eriel
                  (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OTA_LC.M
Last changed    : 1/1/1998 07:42:15 by Eriel
                  (modified after loading)
  
```

```

Determinação de Ocratoxina A
Coluna - ZorbaxC18 150mm 4,6mm 5um
Fase Móvel - ACN-ácido Acético (41:59)
Fluxo - 1mL - min
  
```



External Standard Report

```

=====
Sorted By       : Signal
Calib. Data Modified : Thursday, 1 1e January 1e 1998 07:31:27
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
  
```

Signal 1: FLD1 A, Ex=333, Em=470

| RetTime [min] | Type | Area LU *s | Amt/Area | Amount [ug/L] | Grp | Name |
|---------------|------|------------|------------|---------------|-----|------|
| 12.269 | EM | 3.15171 | 3.95495e-1 | 1.24648 | | OTA |

Totals : 1.24648

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

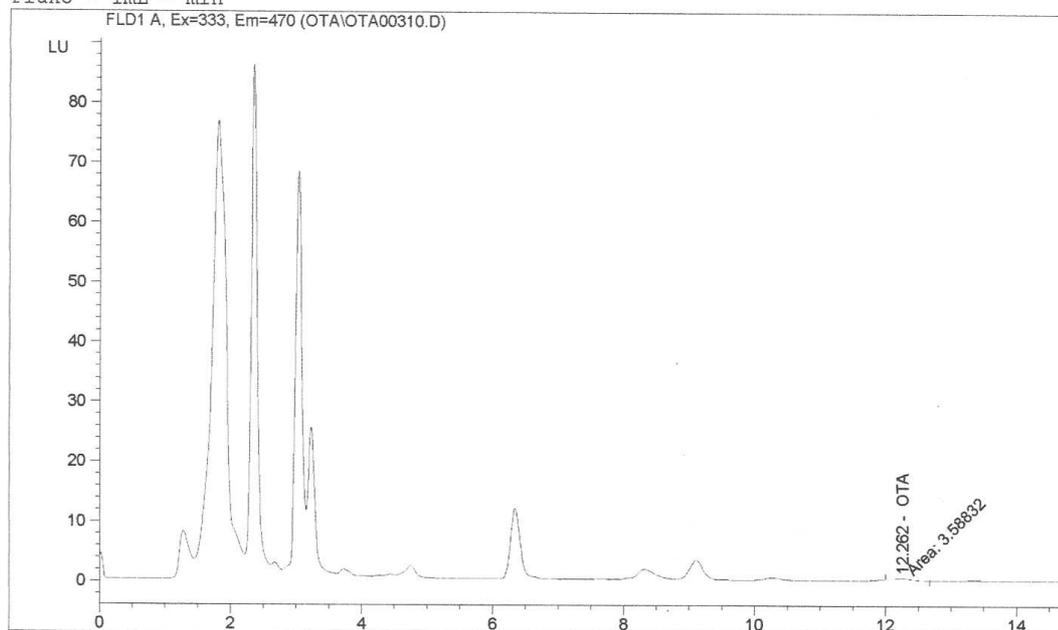
APÊNDICE 7 – DETECÇÃO DE OCRATOXINA A NA AMOSTRA 10B POR CLAE

a File C:\HPCHEM\1\DATA\OTA\OTA00310.D

Sample Name: Amos

```

=====
Injection Date   : 1/1/1998 05:37:14
Sample Name     : Amostra 6B                      Location : Vial 1
Acq. Operator  : Eriel
Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\OTA.LC.M
Last changed   : 1/1/1998 04:22:39 by Eriel
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OTA.LC.M
Last changed   : 1/1/1998 07:45:43 by Eriel
                (modified after loading)
Determinação de Ocratoxina A
Coluna - ZorbaxC18 150mm 4,6mm 5um
Fase Móvel - ACN-ácido Acético (41:59)
Fluxo - 1mL - min
  
```



External Standard Report

```

Sorted By       : Signal
Calib. Data Modified : Thursday, 1 1e January 1e 1998 07:31:27
Multiplier      : 1.0000
Dilution        : 1.0000
  
```

Signal 1: FLD1 A, Ex=333, Em=470

| RetTime [min] | Type | Area LU | Amt/Area *s | Amount [ug/L] | Grp | Name |
|---------------|------|---------|-------------|---------------|-----|------|
| 12.262 | MM | 3.58832 | 3.94955e-1 | 1.41722 | | OTA |

Totals : 1.41722

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

APÊNDICE 8 – DETECÇÃO DE OCRATOXINA A NA AMOSTRA 10C POR CLAE

a File C:\HPCHEM\1\DATA\OTA\OTA00311.D

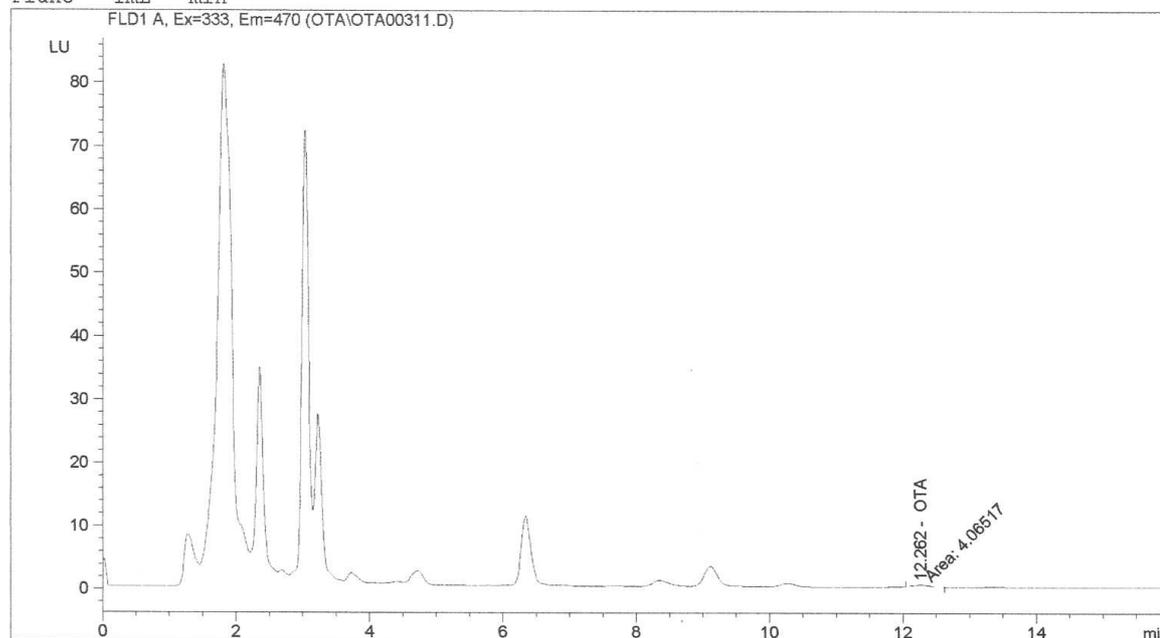
Sample Name: Amostra 6C

```

=====
Injection Date   : 1/1/1998 05:54:30
Sample Name     : Amostra 6C                      Location : Vial 1
Acq. Operator  : Eriel
Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\OTA_LC.M
Last changed   : 1/1/1998 04:22:39 by Eriel
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OTA_LC.M
Last changed   : 1/1/1998 07:45:43 by Eriel
                (modified after loading)
  
```

```

Determinação de Ocratoxina A
Coluna - ZorbaxC18 150mm 4,6mm 5um
Fase Móvel - ACN-ácido Acético (41:59)
Fluxo - 1mL - min
  
```



External Standard Report

```

=====
Sorted By       : Signal
Calib. Data Modified : Thursday, 1 1e January 1e 1998 07:31:27
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
  
```

Signal 1: FLD1 A, Ex=333, Em=470

| RetTime [min] | Type | Area LU | Amt/Area *s | Amount [ug/L] | Grp | Name |
|---------------|------|---------|-------------|---------------|-----|------|
| 12.262 | MM | 4.06517 | 3.94497e-1 | 1.60370 | | OTA |

Totals : 1.60370

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

APÊNDICE 9 – DETECÇÃO DE OCRATOXINA A NA AMOSTRA 11A POR CLAE

```

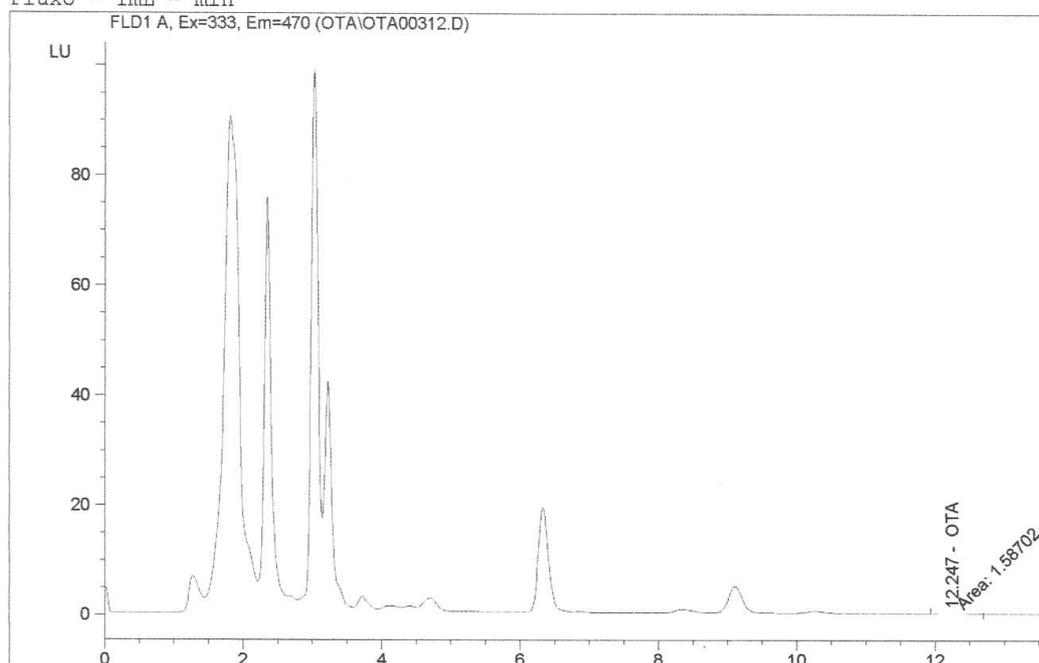
=====
Injection Date   : 1/1/1998 06:11:50
Sample Name     : Amostra 7A                               Location : Vial 1
Acq. Operator   : Eriel
Acq. Method     : C:\HPCHEM\1\METHODS\OTA_LC.M
Last changed    : 1/1/1998 04:22:39 by Eriel
                  (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OTA_LC.M
Last changed    : 1/1/1998 07:45:43 by Eriel
                  (modified after loading)

```

```

Determinação de Ocratoxina A
Coluna - ZorbaxC18 150mm 4,6mm 5um
Fase Móvel - ACN-ácido Acético (41:59)
Fluxo - 1mL - min

```



External Standard Report

```

=====
Sorted By       : Signal
Calib. Data Modified : Thursday, 1 1e January 1e 1998 07:31:27
Multiplier      : 1.0000
Dilution        : 1.0000

```

Signal 1: FLD1 A, Ex=333, Em=470

| RetTime [min] | Type | Area LU | Amt/Area *s | Amount [ug/L] | Grp | Name |
|---------------|------|---------|-------------|---------------|-----|------|
| 12.247 | MM | 1.58702 | 3.99873e-1 | 6.34607e-1 | | OTA |

Totals : 6.34607e-1

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

APÊNDICE 10 – DETECÇÃO DE OCRATOXINA A NA AMOSTRA 11C POR CLAE

a File C:\HPCHEM\1\DATA\OTA\OTA00315.D

Sample Name: Ar

```

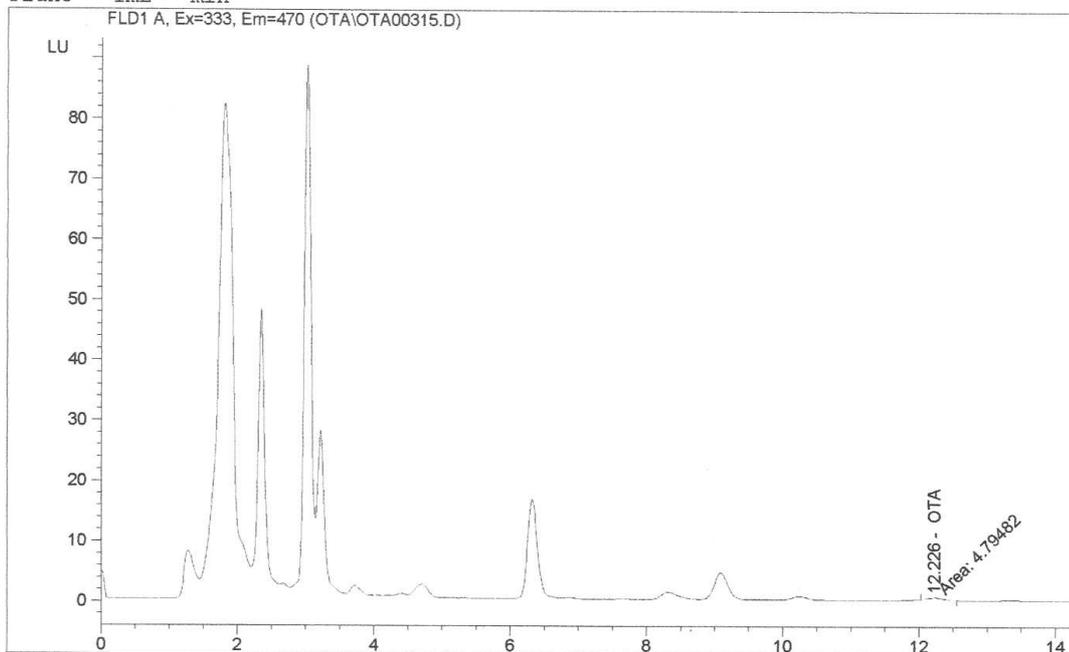
=====
Injection Date   : 1/1/1998 07:03:41
Sample Name     : Amostra 7C                      Location : Vial 1
Acq. Operator   : Eriel
Acq. Method     : C:\HPCHEM\1\METHODS\OTA_LC.M
Last changed    : 1/1/1998 04:22:39 by Eriel
                  (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OTA_LC.M
Last changed    : 1/1/1998 07:45:43 by Eriel
                  (modified after loading)
  
```

Determinação de Ocratoxina A

Coluna - ZorbaxC18 150mm 4,6mm 5um

Fase Móvel - ACN-ácido Acético (41:59)

Fluxo - 1mL - min



External Standard Report

```

=====
Sorted By       : Signal
Calib. Data Modified : Thursday, 1 1e January 1e 1998 07:31:27
Multiplier      : 1.0000
Dilution        : 1.0000
  
```

Signal 1: FLD1 A, Ex=333, Em=470

| RetTime [min] | Type | Area LU *s | Amt/Area | Amount [ug/L] | Grp | Name |
|---------------|------|------------|------------|---------------|-----|------|
| 12.226 | MM | 4.79482 | 3.93973e-1 | 1.88903 | | OTA |

Totals : 1.88903

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

APÊNDICE 11 – DETECÇÃO DE OCRATOXINA A NA AMOSTRA 31A POR CLAE

File C:\HPCHEM\1\DATA\OTA\OTA00316.D

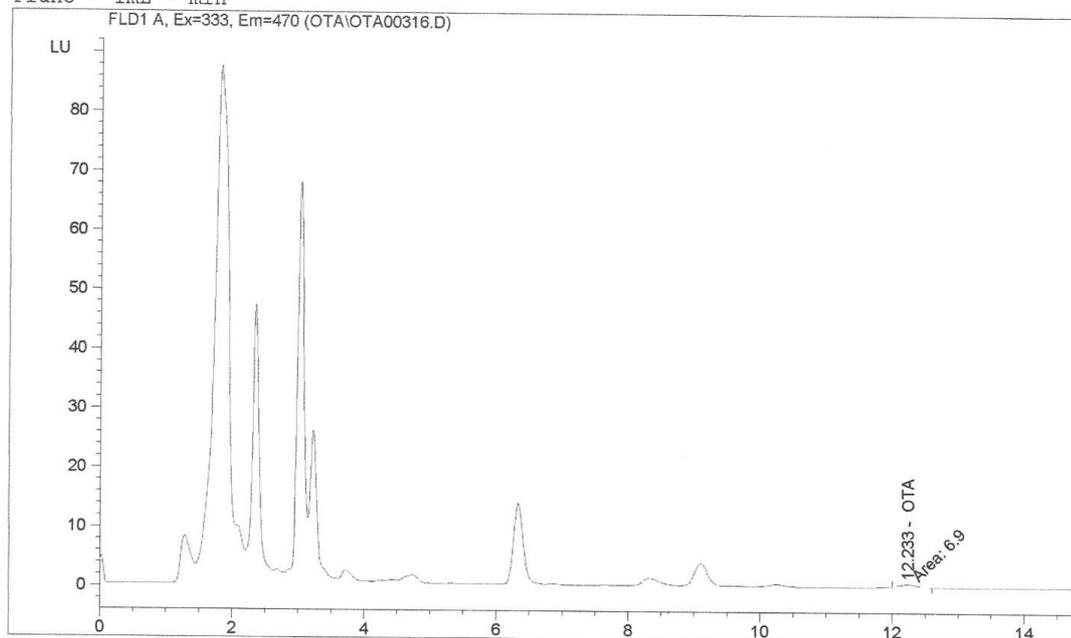
Sample Name: Amos

```

=====
Injection Date   : 1/1/1998 07:20:49
Sample Name     : Amostra 8A                      Location : Vial 1
Acq. Operator   : Eriel
Acq. Method     : C:\HPCHEM\1\METHODS\OTA_LC.M
Last changed    : 1/1/1998 07:31:29 by Eriel
                  (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OTA_LC.M
Last changed    : 1/1/1998 07:45:43 by Eriel
                  (modified after loading)
  
```

```

Determinação de Ocratoxina A
Coluna - ZorbaxC18 150mm 4,6mm 5um
Fase Móvel - ACN-ácido Acético (41:59)
Fluxo - 1mL - min
  
```



External Standard Report

```

Sorted By       : Signal
Calib. Data Modified : Thursday, 11e January 1e 1998 07:31:27
Multiplier      : 1.0000
Dilution        : 1.0000
  
```

Signal 1: FLD1 A, Ex=333, Em=470

| RetTime [min] | Type | Area LU | Amt/Area *s | Amount [ug/L] | Grp | Name |
|---------------|------|---------|-------------|---------------|-----|------|
| 12.233 | MM | 6.90000 | 3.93083e-1 | 2.71227 | | OTA |

Totals : 2.71227

Results obtained with enhanced integrator!

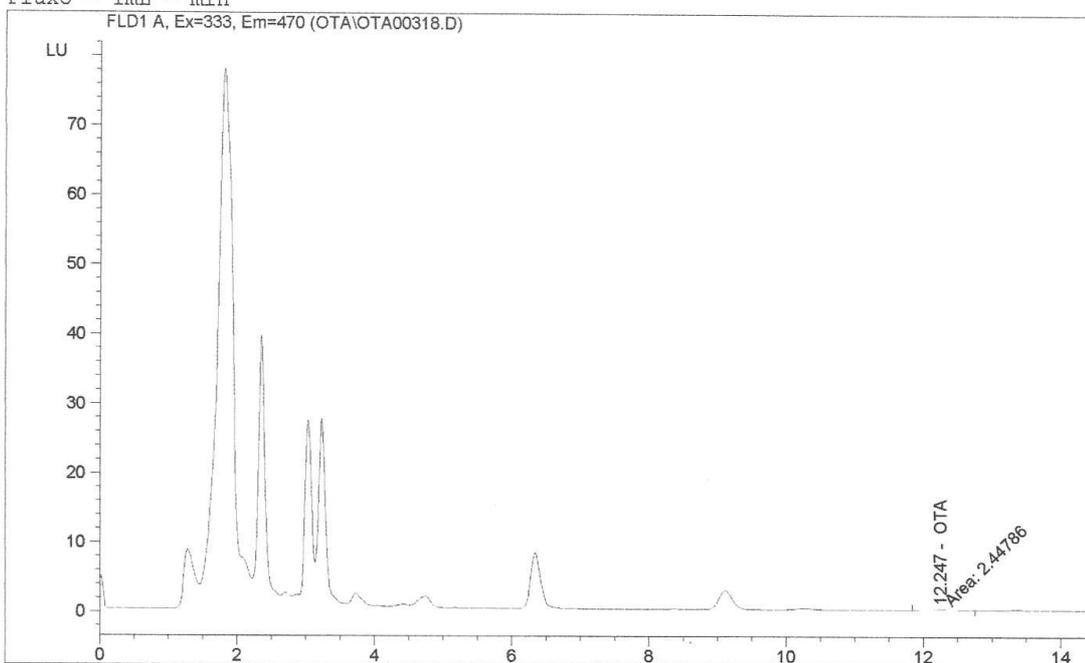
*** End of Report ***

APÊNDICE 12 – DETECÇÃO DE OCRATOXINA A NA AMOSTRA 31B POR CLAE

```

=====
Injection Date   : 1/1/1998 07:55:59
Sample Name      : Amostra 8B                               Location : Vial 1
Acq. Operator    : Eriel
Acq. Method      : C:\HPCHEM\1\METHODS\OTA_LC.M
Last changed     : 1/1/1998 07:45:43 by Eriel
                  (modified after loading)
Analysis Method  : C:\HPCHEM\1\METHODS\OTA_LC.M
Last changed     : 1/1/1998 08:21:18 by Eriel
                  (modified after loading)

Determinação de Ocratoxina A
Coluna - ZorbaxC18 150mm 4,6mm 5um
Fase Móvel - ACN-ácido Acético (41:59)
Fluxo - 1mL - min
  
```



External Standard Report

```

Sorted By       : Signal
Calib. Data Modified : Thursday, 1 1e January 1e 1998 07:31:27
Multiplier      : 1.0000
Dilution        : 1.0000
  
```

Signal 1: FLD1 A, Ex=333, Em=470

| RetTime [min] | Type | Area LU | Amt/Area *s | Amount [ug/L] | Grp | Name |
|------------------|------|------------|----------------|------------------|-----|------|
| 12.247 | MM | 2.44786 | 3.96772e-1 | 9.71241e-1 | | OTA |

Totals : 9.71241e-1

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

APÊNDICE 13 - DETECÇÃO DE OCRATOXINA A NA AMOSTRA 16A POR CLAE

a File C:\HPCHEM\1\DATA\OTA\OTA00320.D

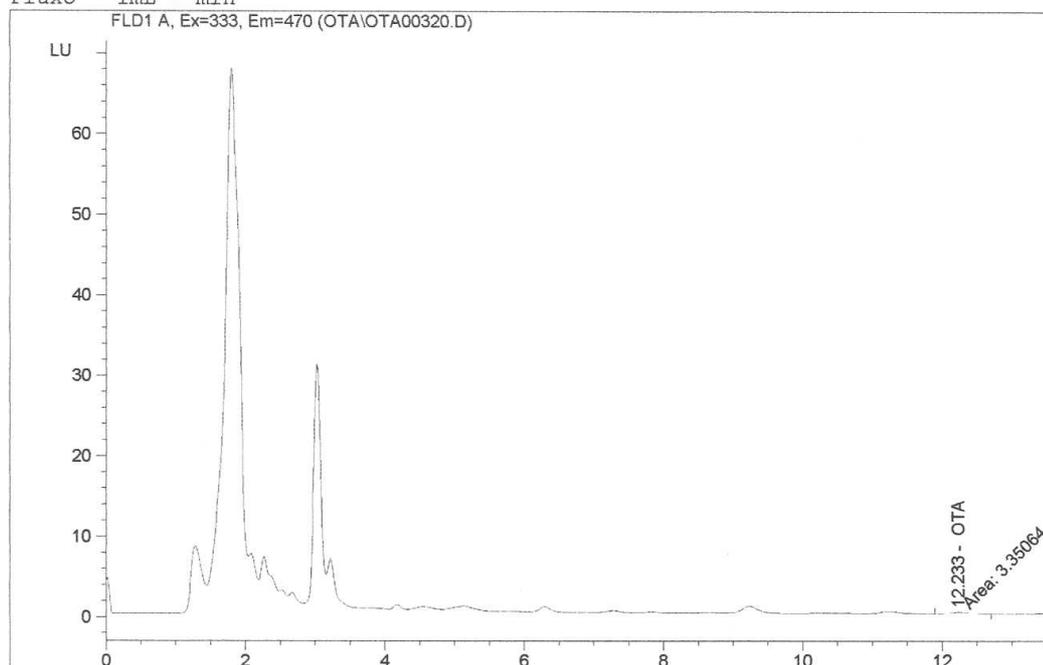
Sample Name

```

=====
Injection Date   : 1/1/1998 08:30:52
Sample Name     : Amostra 9A                      Location : Vial 1
Acq. Operator  : Eriel
Method         : C:\HPCHEM\1\METHODS\OTA_LC.M
Last changed   : 1/1/1998 08:21:18 by Eriel
                (modified after loading)
  
```

```

Determinação de Ocratoxina A
Coluna - ZorbaxC18 150mm 4,6mm 5um
Fase Móvel - ACN-ácido Acético (41:59)
Fluxo - 1mL - min
  
```



External Standard Report

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : Thursday, 1 1e January 1e 1998 07:31:27
Multiplier    : 1.0000
Dilution      : 1.0000
  
```

Signal 1: FLD1 A, Ex=333, Em=470

| RetTime [min] | Type | Area LU | Amt/Area *s | Amount [ug/L] | Grp | Name |
|---------------|------|---------|-------------|---------------|-----|------|
| 12.233 | MM | 3.35064 | 3.95231e-1 | 1.32428 | | OTA |

Totals : 1.32428

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

APÊNDICE 14 – DETECÇÃO DE OCRATOXINA A NA AMOSTRA 16B POR CLAE

File C:\HPCHEM\1\DATA\OTA\OTA00322.D

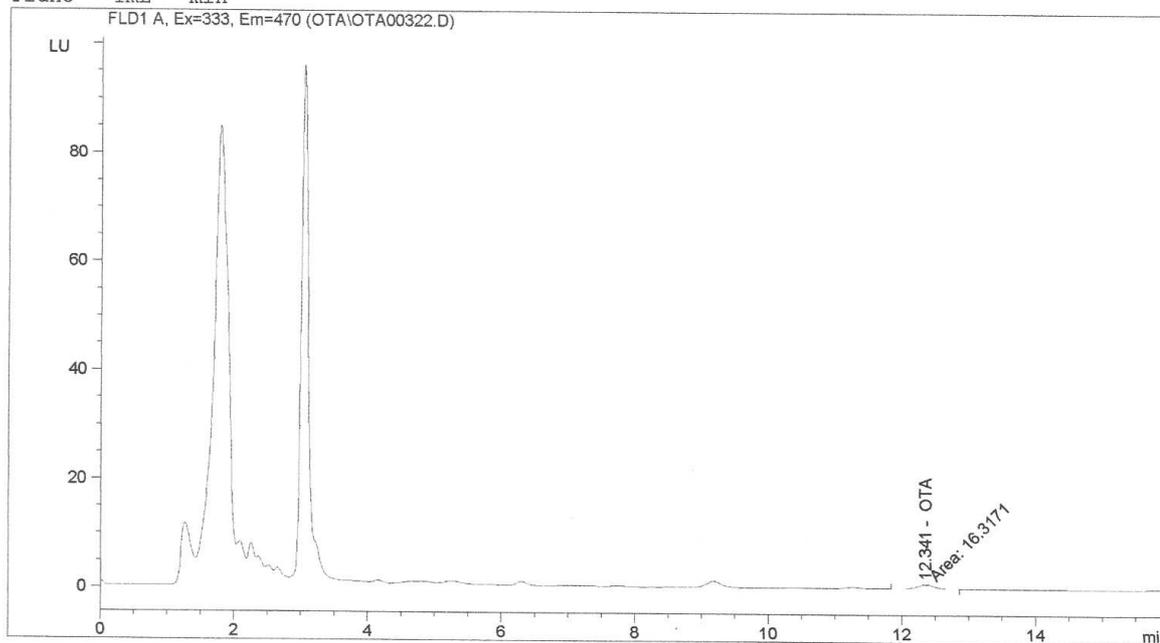
Sample Name: Amostra 9B

```

=====
Injection Date   : 2/1/1998 00:23:32
Sample Name     : Amostra 9B                      Location : Vial 1
Acq. Operator  : Eriel
Acq. Method     : C:\HPCHEM\1\METHODS\OTA_LC.M
Last changed   : 2/1/1998 00:17:41 by Eriel
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OTA_LC.M
Last changed   : 2/1/1998 02:52:38 by Eriel
                (modified after loading)
  
```

```

Determinação de Ocratoxina A
Coluna - ZorbaxC18 150mm 4,6mm 5um
Fase Móvel - ACN-ácido Acético (41:59)
Fluxo - 1mL - min
  
```



External Standard Report

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : Thursday, 11e January 1e 1998 07:31:27
Multiplier    : 1.0000
Dilution      : 1.0000
  
```

Signal 1: FLD1 A, Ex=333, Em=470

| RetTime [min] | Type | Area LU *s | Amt/Area | Amount [ug/L] | Grp | Name |
|---------------|------|------------|------------|---------------|-----|------|
| 12.341 | MM | 16.31710 | 3.91913e-1 | 6.39487 | | OTA |

Totals : 6.39487

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

APÊNDICE 15 – DETECÇÃO DE OCRATOXINA A NA AMOSTRA 16C POR CLAE

File C:\HPCHEM\1\DATA\OTA\OTA00323.D

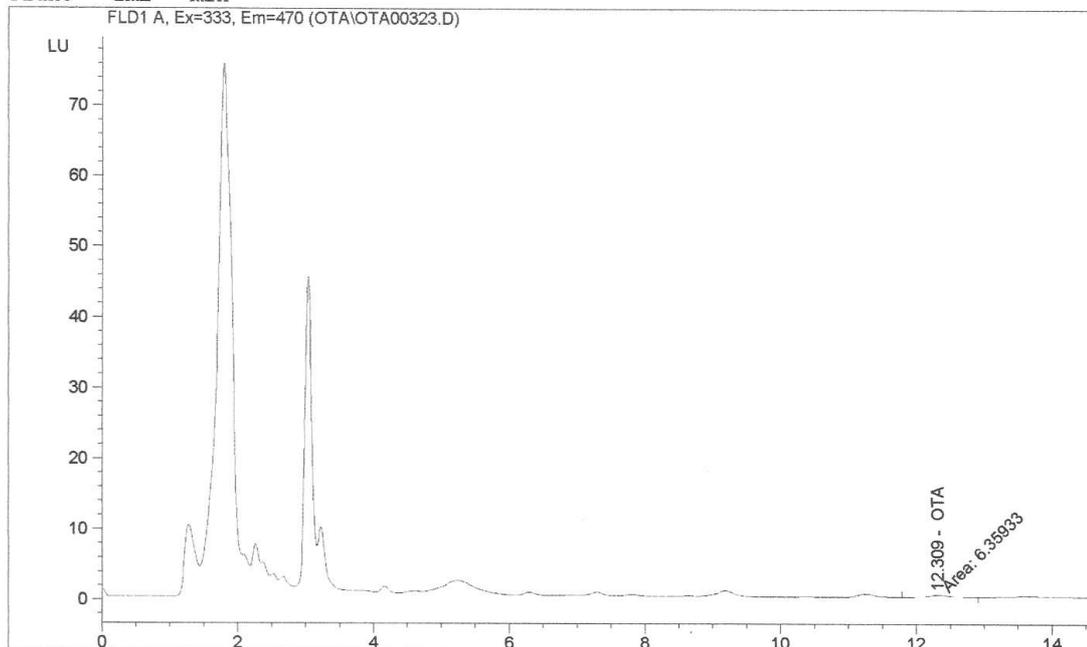
Sample Name: Amo

```

=====
Injection Date   : 2/1/1998 00:40:43
Sample Name     : Amostra 9C                      Location : Vial 1
Acq. Operator   : Eriel
Acq. Method     : C:\HPCHEM\1\METHODS\OTA_LC.M
Last changed    : 2/1/1998 00:17:41 by Eriel
                  (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OTA_LC.M
Last changed    : 2/1/1998 02:52:38 by Eriel
                  (modified after loading)
  
```

```

Determinação de Ocratoxina A
Coluna - ZorbaxC18 150mm 4,6mm 5um
Fase Móvel - ACN-ácido Acético (41:59)
Fluxo - 1mL - min
  
```



External Standard Report

```

Sorted By       : Signal
Calib. Data Modified : Thursday, 11e January 1e 1998 07:31:27
Multiplier      : 1.0000
Dilution        : 1.0000
  
```

Signal 1: FLD1 A, Ex=333, Em=470

| RetTime [min] | Type | Area LU *s | Amt/Area | Amount [ug/L] | Grp | Name |
|---------------|------|------------|------------|---------------|-----|------|
| 12.309 | MM | 6.35933 | 3.93255e-1 | 2.50084 | | OTA |

Totals : 2.50084

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

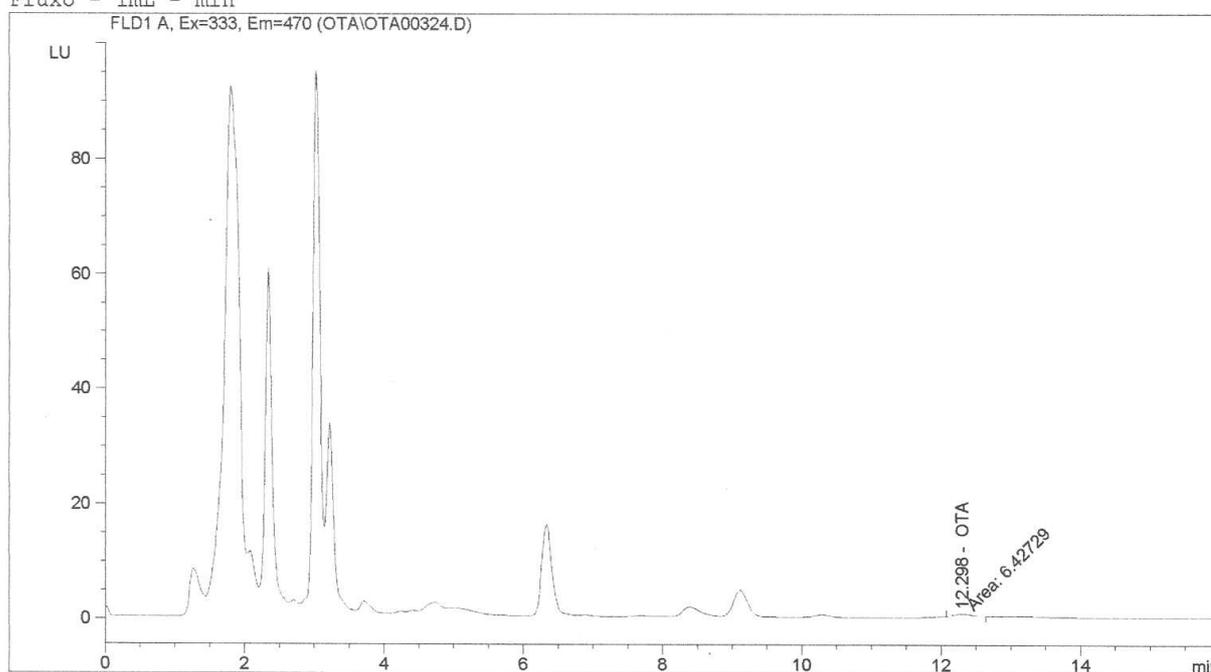
APÊNDICE 16 – DETECÇÃO DE OCRATOXINA A NA AMOSTRA 20A POR CLAE

```

=====
Injection Date   : 2/1/1998 00:58:02
Sample Name     : Amostra 10A                      Location : Vial 1
Acq. Operator  : Eriel
Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\OTA_LC.M
Last changed   : 2/1/1998 00:17:41 by Eriel
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OTA_LC.M
Last changed   : 2/1/1998 02:52:38 by Eriel
                (modified after loading)
  
```

```

Determinação de Ocratoxina A
Coluna - ZorbaxC18 150mm 4,6mm 5um
Fase Móvel - ACN-ácido Acético (41:59)
Fluxo - 1mL - min
  
```



External Standard Report

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : Thursday, 1 1e January 1e 1998 07:31:27
Multiplier    : 1.0000
Dilution      : 1.0000
  
```

Signal 1: FLD1 A, Ex=333, Em=470

| RetTime [min] | Type | Area LU *s | Amt/Area | Amount [ug/L] | Grp | Name |
|---------------|------|------------|------------|---------------|-----|------|
| 12.298 | MM | 6.42729 | 3.93232e-1 | 2.52742 | | OTA |

Totals : 2.52742

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

APÊNDICE 17 – DETECÇÃO DE OCRATOXINA A NA AMOSTRA 20C POR CLAE

File C:\HPCHEM\1\DATA\OTA\OTA00327.D

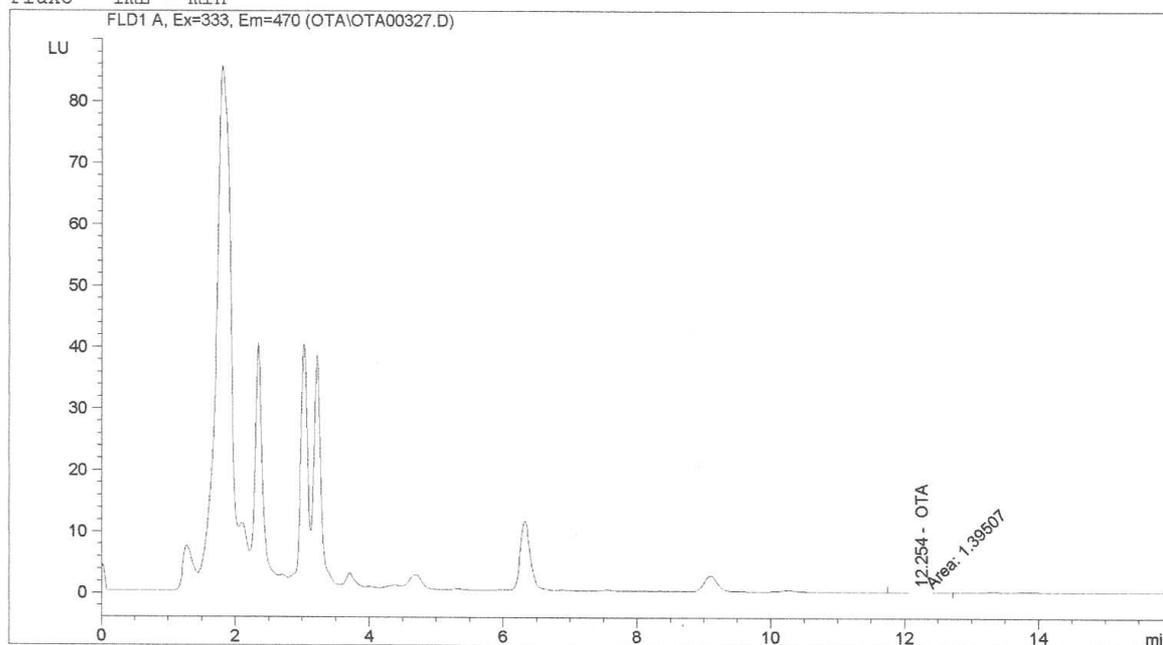
Sample Name: Amostra 10C

```

=====
Injection Date   : 2/1/1998 01:49:46
Sample Name     : Amostra 10C                Location : Vial 1
Acq. Operator  : Eriel
Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\OTA_LC.M
Last changed   : 2/1/1998 00:17:41 by Eriel
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OTA_LC.M
Last changed   : 2/1/1998 03:01:03 by Eriel
                (modified after loading)
  
```

```

Determinação de Ocratoxina A
Coluna - ZorbaxC18 150mm 4,6mm 5um
Fase Móvel - ACN-ácido Acético (41:59)
Fluxo - 1mL - min
  
```



External Standard Report

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : Thursday, 11e January 1e 1998 07:31:27
Multiplier    : 1.0000
Dilution      : 1.0000
  
```

Signal 1: FLD1 A, Ex=333, Em=470

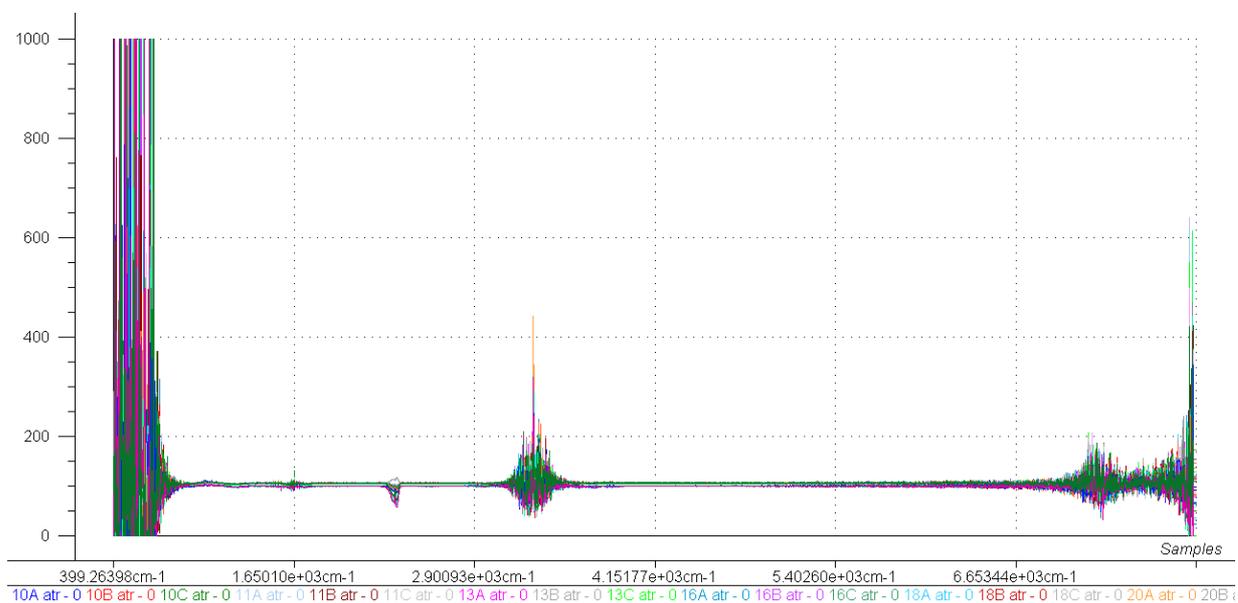
| RetTime [min] | Type | Area LU | Amt/Area *s | Amount [ug/L] | Grp | Name |
|---------------|------|---------|-------------|---------------|-----|------|
| 12.254 | MM | 1.39507 | 4.01086e-1 | 5.59545e-1 | | OTA |

Totals : 5.59545e-1

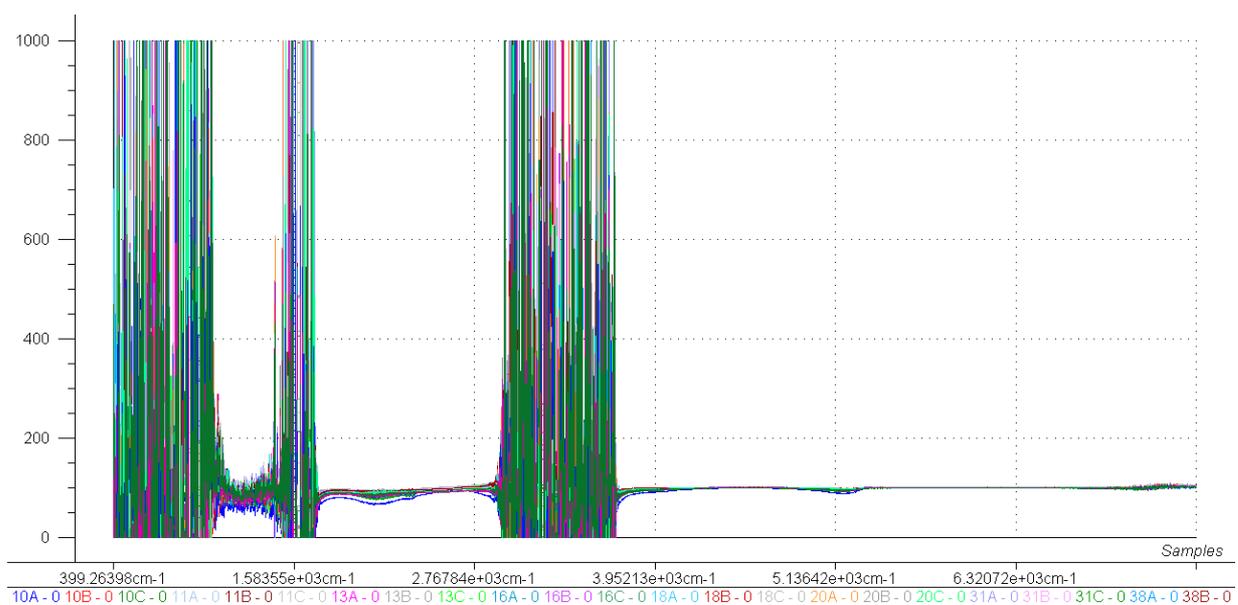
Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

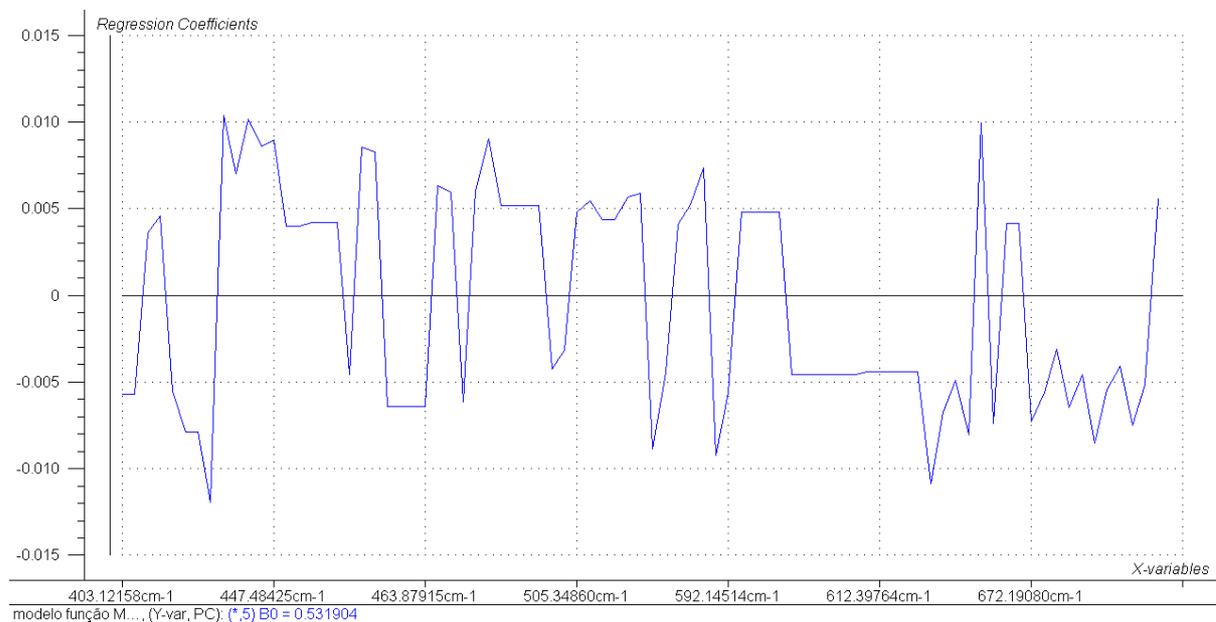
APÊNDICE 18 – ESPECTROS OBTIDOS POR REFLECTÂNCIA DE TODAS AS AMOSTRAS ANALISADAS



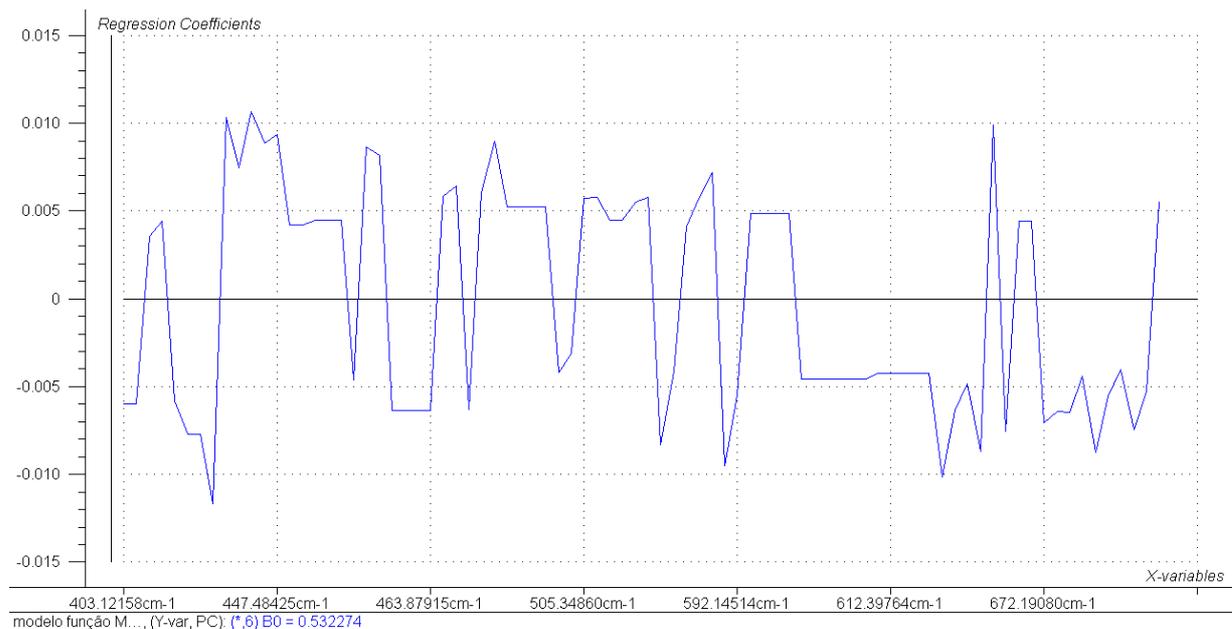
APÊNDICE 19 – ESPECTROS OBTIDOS POR TRANSMITÂNCIA DE TODAS AS AMOSTRAS ANALISADAS



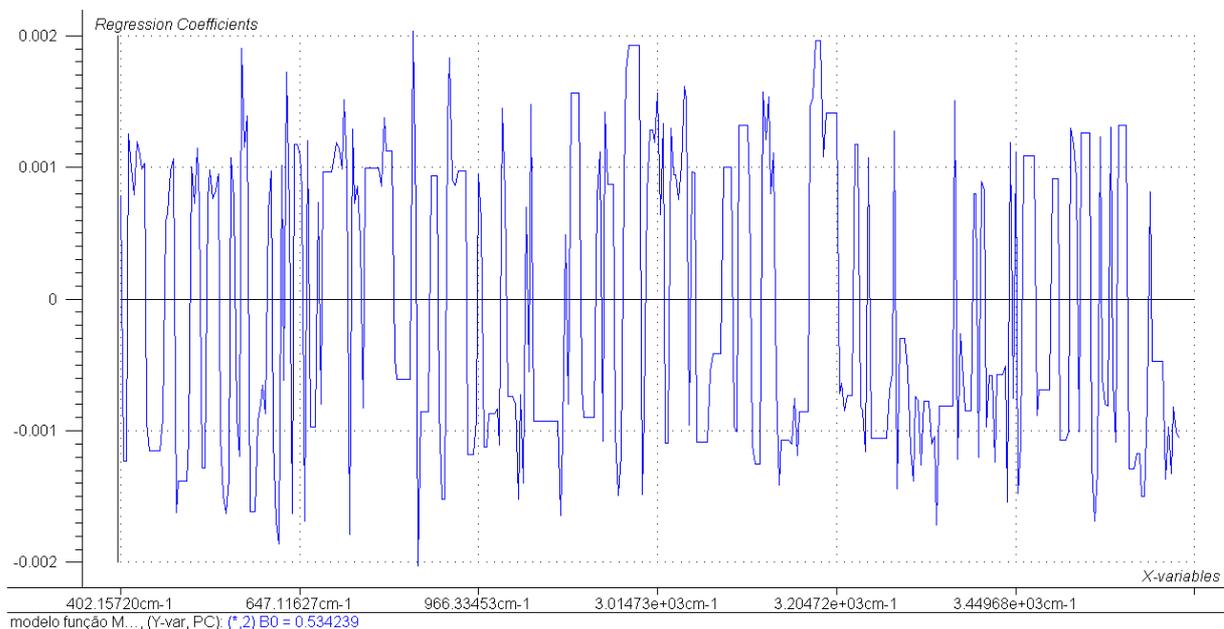
APÊNDICE 20 – ESPECTRO DO MODELO FUNÇÃO MSC SEM 18C A PARTIR DE DADOS OBTIDOS POR REFLECTÂNCIA (TABELA 4)



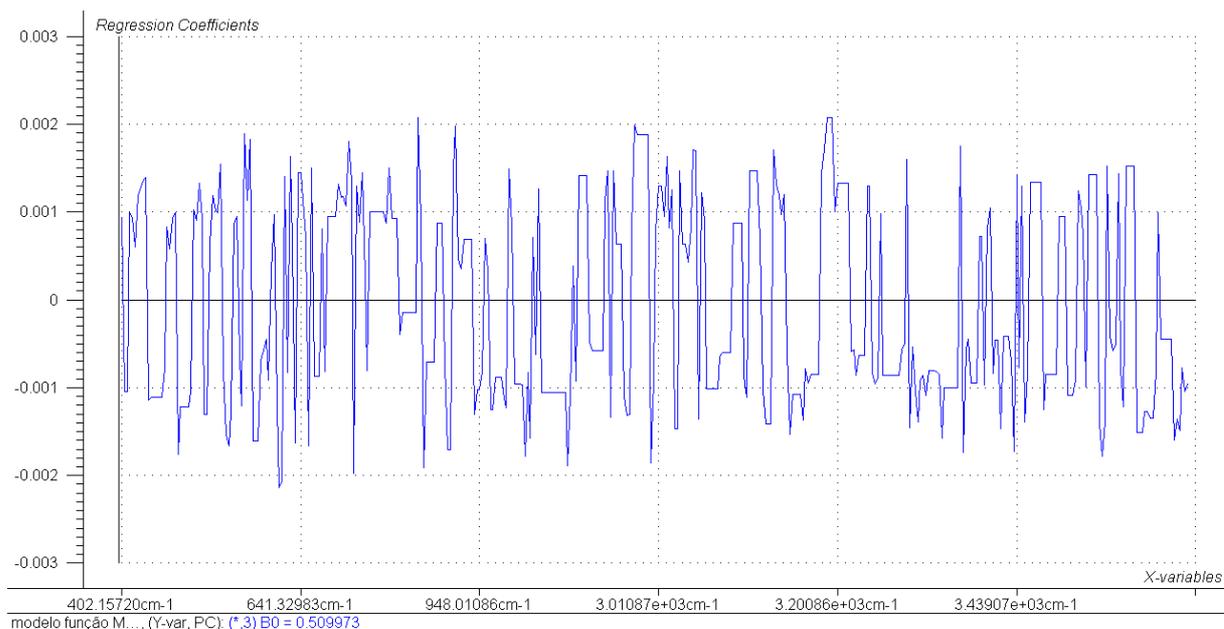
APÊNDICE 21 – ESPECTRO DO MODELO FUNÇÃO MSC SEM 18C E 20C A PARTIR DE DADOS OBTIDOS POR REFLECTÂNCIA (TABELA 4)



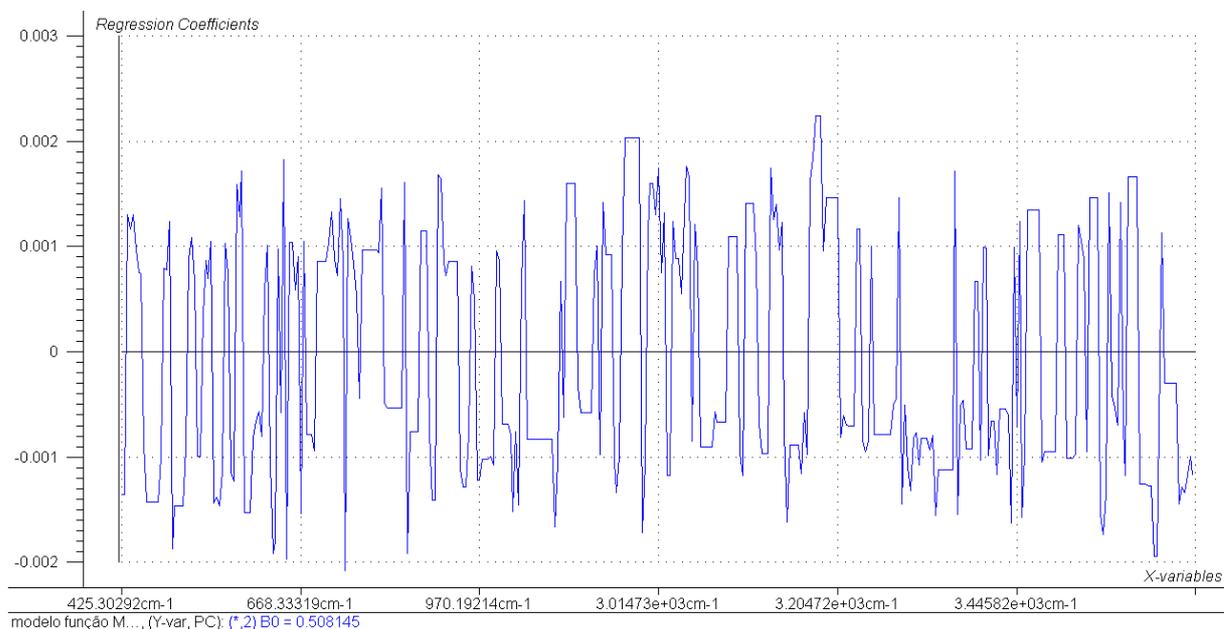
APÊNDICE 22 – ESPECTRO DO MODELO FUNÇÃO MSC A PARTIR DE DADOS OBTIDOS POR TRANSMITÂNCIA (TABELA 4)



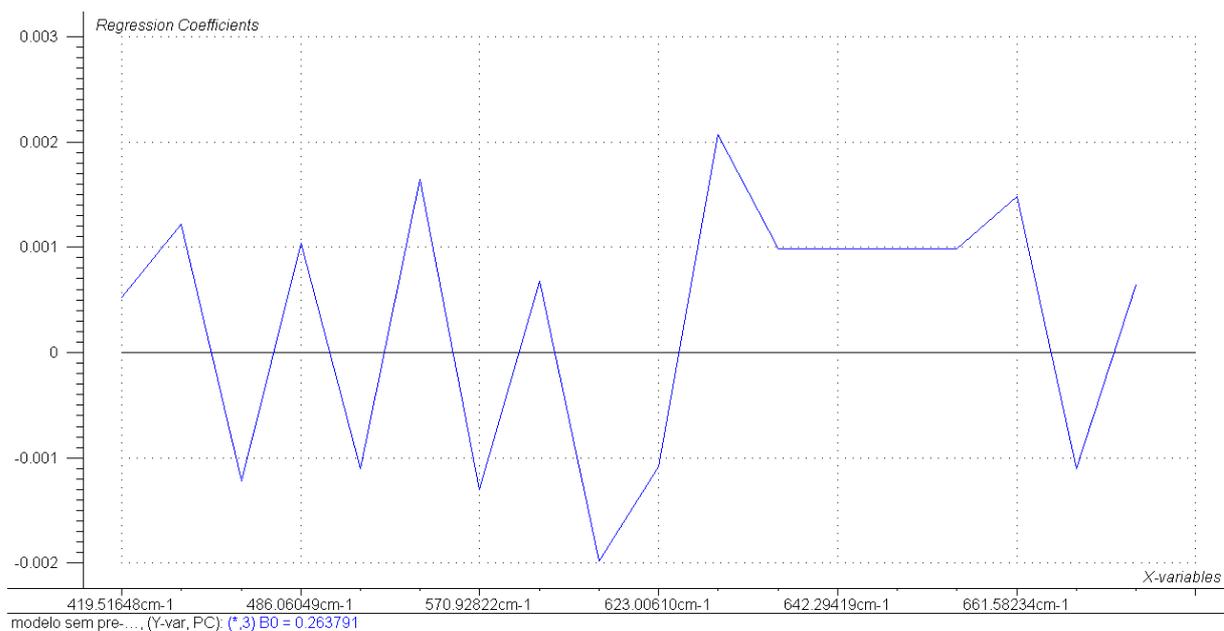
APÊNDICE 23 – ESPECTRO DO MODELO FUNÇÃO MSC SEM 10A A PARTIR DE DADOS OBTIDOS POR TRANSMITÂNCIA (TABELA 4)



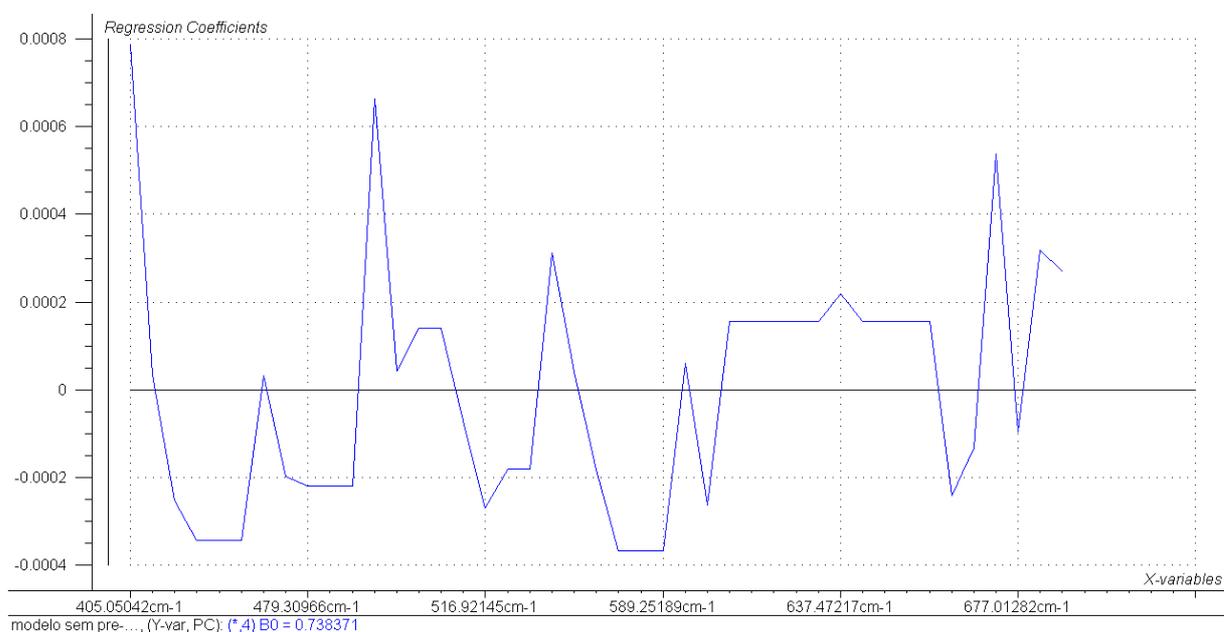
APÊNDICE 24 – ESPECTRO DO MODELO FUNÇÃO MSC SEM 10A E 31A A PARTIR DE DADOS OBTIDOS POR TRANSMITÂNCIA (TABELA 4)



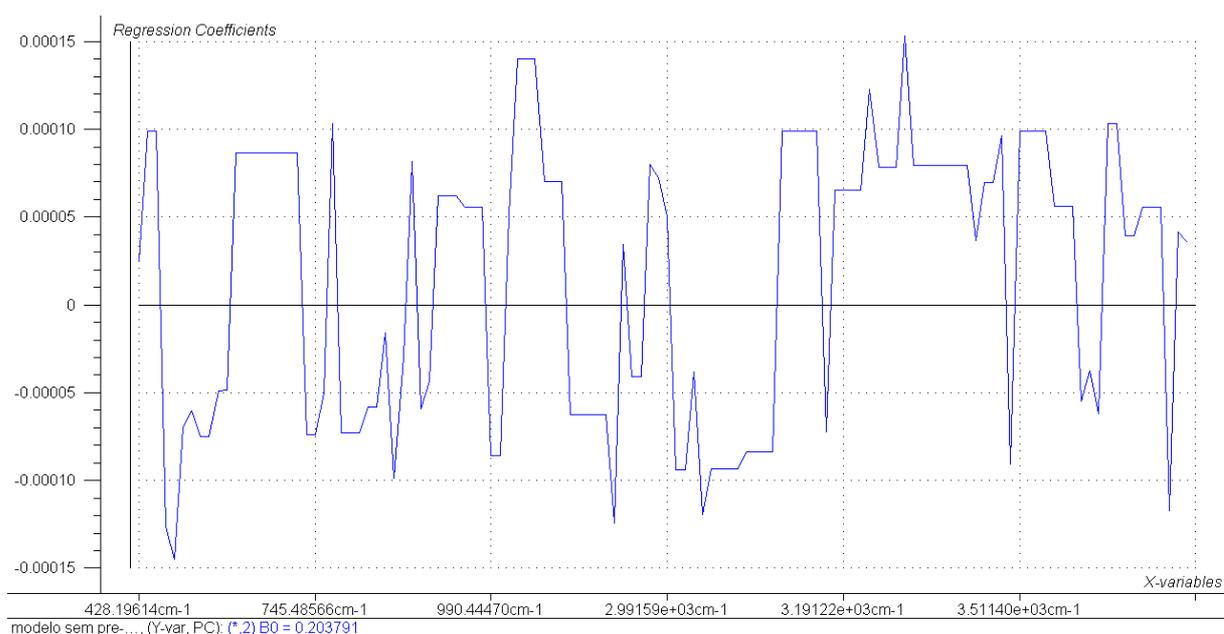
APÊNDICE 25 – ESPECTRO DO MODELO SEM PRÉ-TRATAMENTO A PARTIR DE DADOS OBTIDOS POR REFLECTÂNCIA (TABELA 5)



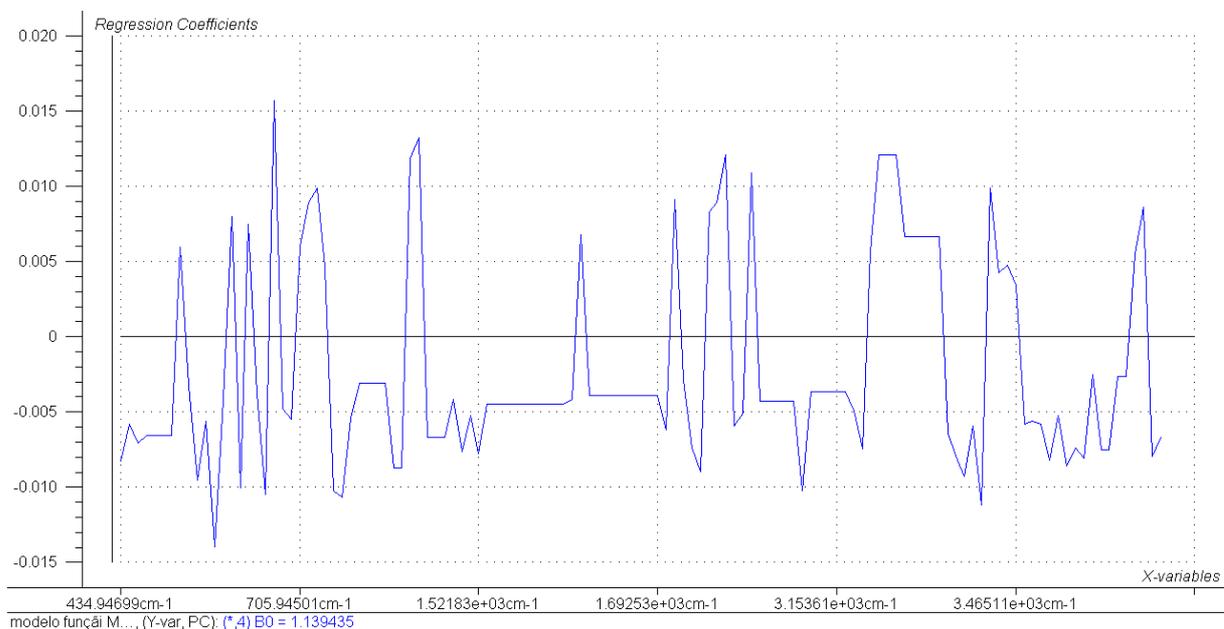
APÊNDICE 26 – ESPECTRO DO MODELO SEM PRÉ-TRATAMENTO SEM 16B A PARTIR DE DADOS OBTIDOS POR REFLECTÂNCIA (TABELA 5)



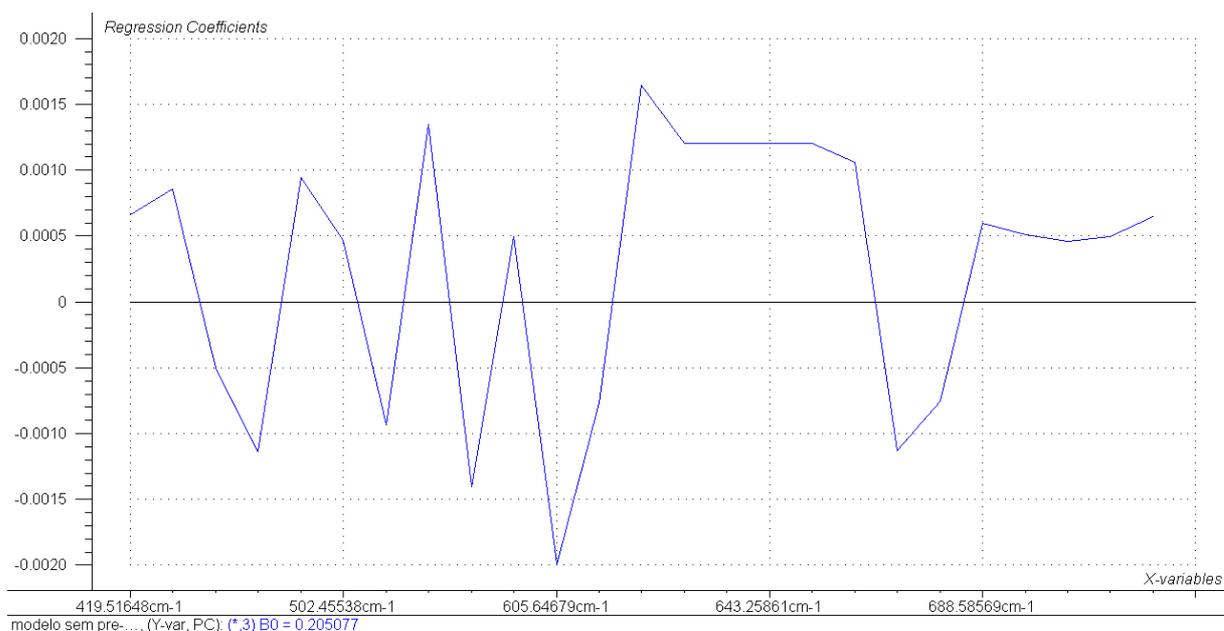
APÊNDICES 27 – ESPECTRO DO MODELO SEM PRÉ-TRATAMENTO SEM 16B A PARTIR DE DADOS OBTIDOS POR TRANSMITÂNCIA (TABELA 5)



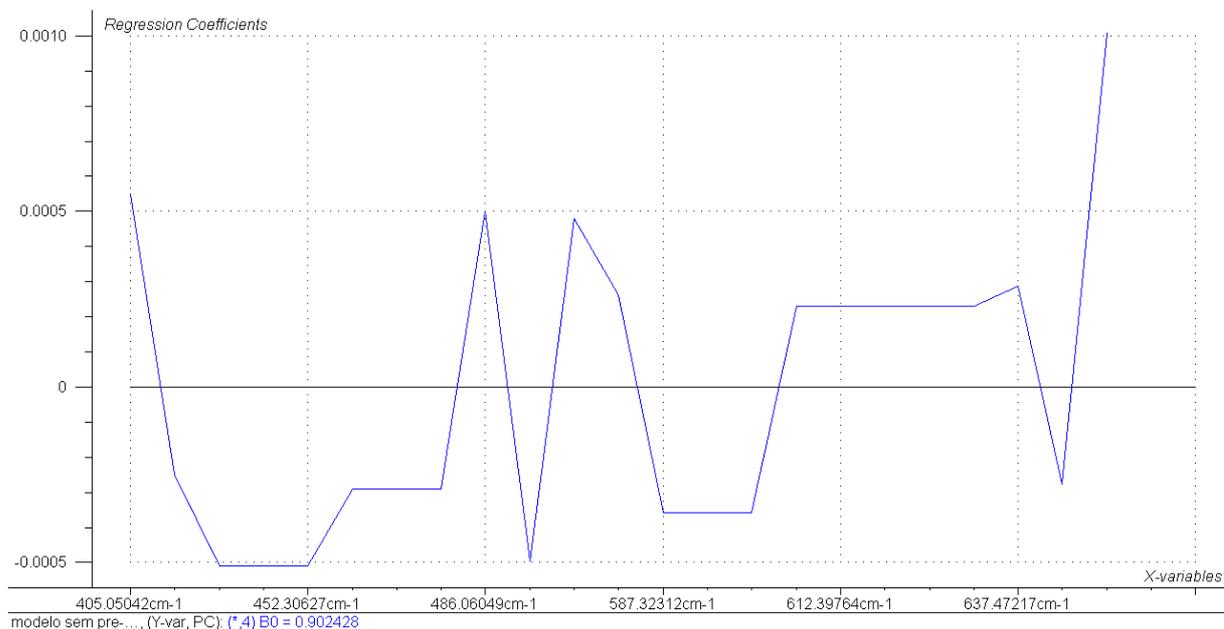
APÊNDICE 28 – ESPECTRO DO MODELO FUNÇÃO MSC SEM 31A E 16B A PARTIR DE DADOS OBTIDOS POR TRANSMITÂNCIA (TABELA 5)



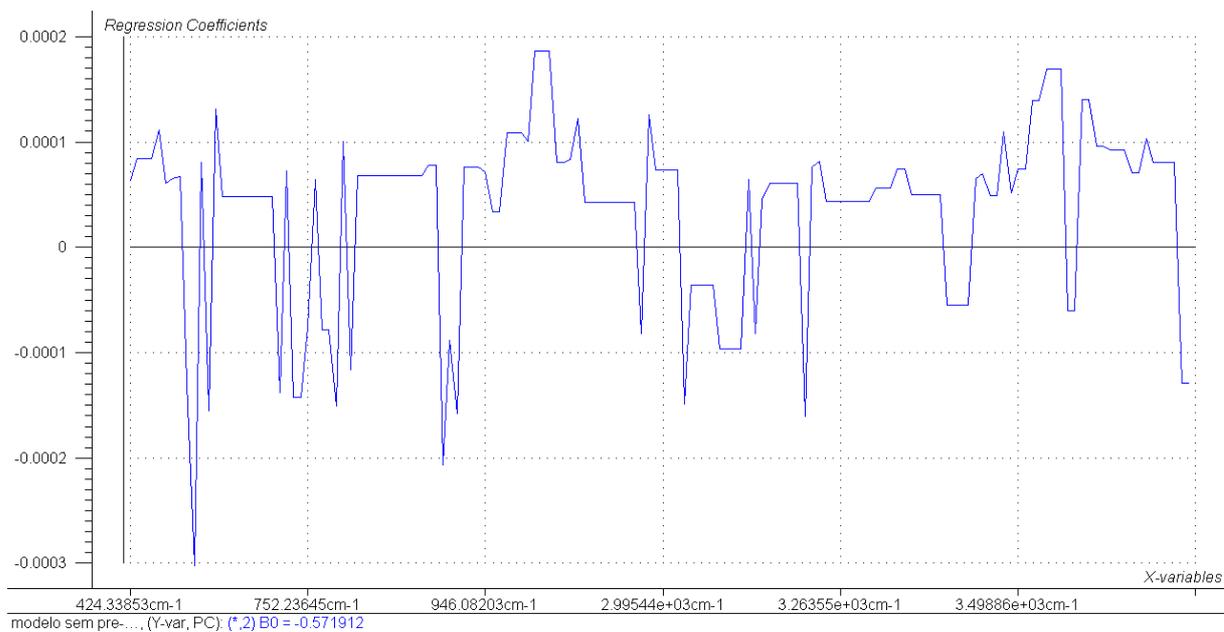
APÊNDICE 29 – ESPECTRO DO MODELO SEM PRÉ-TRATAMENTO A PARTIR DE DAOS OBTIDOS POR REFLECTÂNCIA (TABELA 6)



APÊNDICE 30 – ESPECTRO DO MODELO SEM PRÉ-TRATAMENTO SEM 9B A PARTIR DE DADOS OBTIDOS POR REFLECTÂNCIA (TABELA 6)



APÊNDICE 31 – ESPECTRO DO MODELO SEM PRÉ-TRATAMENTO A PARTIR DE DADOS OBTIDOS POR TRANSMITÂNCIA (TABELA 6)



APÊNDICE 32 – ESPECTRO DO MODELO FUNÇÃO MSC SEM 31A E 16B A PARTIR DE DADOS OBTIDOS POR TRANSMITÂNCIA (TABELA 6)

