



**GISLAINE OLIVEIRA**

**INCIDÊNCIA DE FUNGOS DO GÊNERO  
*Aspergillus* Seção *Circumdati* E *Nigri* EM GRÃOS  
DE CAFÉ CULTIVADOS EM MINAS GERAIS E  
O EFEITO *IN VITRO* DE FATORES ABIÓTICOS  
NO CRESCIMENTO E NA BIOSÍNTESE DE  
OCRATOXINA A**

**LAVRAS - MG**

**2016**

**GISLAINE OLIVEIRA**

**INCIDÊNCIA DE FUNGOS DO GÊNERO *Aspergillus* Seção *Circumdati* E  
*Nigri* EM GRÃOS DE CAFÉ CULTIVADOS EM MINAS GERAIS E O  
EFEITO *IN VITRO* DE FATORES ABIÓTICOS NO CRESCIMENTO E  
NA BIOSÍNTESE DE OCRATOXINA A**

Tese apresentada a Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de Doutor.

Orientador

Dr. Luís Roberto Batista

Coorientadora

Dra. Fabiana Reinis Franca Passamani

**LAVRAS - MG**

**2016**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha  
Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados  
informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Oliveira, Gislaine.

Incidência de fungos do gênero *Aspergillus* seção *Circumdati* e *Nigri* em grãos de café cultivados em Minas Gerais e o efeito *in vitro* de fatores abióticos no crescimento e na biossíntese de ocratoxina A / Gislaine Oliveira. - Lavras: UFLA, 2016.

97 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2016.

Orientador(a): Luís Roberto Batista.

Bibliografia.

1. Micotoxinas. 2. Café. 3. Fungos toxigênicos. 4. Temperatura. 5. Atividade de água. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

**GISLAINE OLIVEIRA**

**INCIDÊNCIA DE FUNGOS DO GÊNERO *ASPERGILLUS* SEÇÃO  
*CIRCUMDATI* E *NIGRI* EM GRÃOS DE CAFÉ CULTIVADOS EM  
MINAS GERAIS E O EFEITO *IN VITRO* DE FATORES ABIÓTICOS NO  
CRESCIMENTO E NA BIOSÍNTESE DE OCRATOXINA A**

Tese apresentada a Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 02 de junho de 2016.

Dra. Sara Maria Chalfoun de Souza	EPAMIG
Dra. Margarete Marin Lordelo Volpato	EPAMIG
Dra. Sabrina Carvalho Bastos	UFLA
Dra. Caroline Lima Angélico	Pesquisadora/bolsista - EPAMIG

Dr. Luís Roberto Batista  
Orientador

**LAVRAS - MG**

**2016**

*Aos meus pais, que tanto amo, José Ilício e Genice, pelo constante incentivo, dedicação e imenso amor.*

*À minha irmã, Clesiane, por todo estímulo, carinho e amizade.*

*Ao meu marido, Luciano, pela enorme paciência e companheirismo.*

*A meu filho, Heitor, um amor especial, que me ensinou que posso ser mais forte do que imagino.*

*Vocês são a lição mais profunda de amor*

DEDICO.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. Luís Roberto Batista, pelos estímulos, paciência e ensinamento e pela compreensão silenciosa dos momentos difíceis e de dúvidas pelos quais passei, permitindo que meu tempo interno fluísse, respeitosamente. Muito obrigada.

À minha coorientadora, Dra. Fabiana Reinis Franca Passamani, por ser paciente e generosa, disposta a oferecer estímulos, ouvir com interesse e ânimo todas as questões, dúvidas e problemas. Muito obrigada pelas conversas e conselhos e, principalmente, por sua amizade.

À Dra. Sara, por toda a ajuda, atenção, incentivos e disponibilidade.

À professora Dra. Sabrina Carvalho Bastos, pela disposição em esclarecer minhas dúvidas com o delineamento experimental.

À professora Dra. Maria das Graças Cardoso, por permitir as análises de cromatografia em seu laboratório.

Ao Wilder, por toda ajuda e prontidão, auxiliando nas análises de quantificação da ocratoxina A.

Às amigas do Laboratório de Micologia e Micotoxinas do DCA que fizeram os meus dias mais felizes. Muito obrigada pelo companheirismo e amizade.

Às amigas Luísa e Nathasha, pela amizade, carinho e dedicação. Vocês foram de grande importância para a concretização deste trabalho. Nenhuma palavra poderia expressar a minha eterna gratidão. Muito obrigada por tudo.

À minha sogra, Marisa, que cuidou com todo amor e carinho do meu filho para que fosse possível a concretização deste trabalho. Serei eternamente grata por toda a ajuda.

A Katiany, minha amiga querida, obrigada pela amizade, paciência e conselhos.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento Ciências dos Alimentos, que permitiram a realização deste trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram, agradeço profundamente e dedico o resultado deste trabalho.

## RESUMO GERAL

Os fatores abióticos que mais influenciam o crescimento e a biossíntese de ocratoxina A (OTA) em fungos são a temperatura e a atividade de água (aw). Nesse sentido, esse estudo foi realizado com o objetivo de avaliar a incidência de fungos do gênero *Aspergillus* Seção *Circumdati* e *Nigri* em grãos de café cultivados em duas regiões produtoras de Minas Gerais, além de avaliar o efeito *in vitro* de dois fatores abióticos (temperatura e aw) no crescimento e na biossíntese de OTA por *A. carbonarius* e *A. ochraceus* em meio de cultura sintético à base de café. Foram analisadas 14 amostras de grãos de café arábica (*Coffea arabica* L.), sendo sete da região Sul de Minas e sete da região do Cerrado de Minas. A identificação foi realizada com base nas características morfológicas. A quantificação de OTA dos isolados foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Foram isolados e identificados 90 fungos do gênero *Aspergillus* Seção *Circumdati* e *Nigri*, dos quais 82% eram pertencentes à Seção *Nigri* e 18%, pertencentes à Seção *Circumdati*. Na região Sul de Minas, a porcentagem de contaminação dos grãos de café por fungos filamentosos foi de 65,5%. A porcentagem de contaminação das amostras do Cerrado foi de 34,5%. Nas duas regiões avaliadas, a espécie encontrada com maior frequência foi *A. niger*. Neste estudo, 43,24% dos isolados pertencentes à Seção *Nigri* foram produtores de OTA. Dos isolados pertencentes à Seção *Circumdati*, 81,25% foram produtores de OTA. Para avaliar o efeito dos fatores abióticos, foi utilizado um delineamento central composto. Os isolados produtores de OTA foram cultivados em meio de cultura sintético à base de café. Os isolados de *A. carbonarius* apresentaram o maior crescimento nos intervalos de aw entre 0,935 a 0,965 e temperatura entre 25 °C a 32 °C. Do mesmo modo, as condições ótimas de crescimento para os isolados de *A. ochraceus* ocorreram nos intervalos de aw, entre 0,940 a 0,990 e temperatura entre 21 °C a 30 °C. A maior quantidade de OTA produzida por *A. carbonarius* CCDCA10288 e CCDCA10293 (19,7-15,7 µg/g respectivamente) foi obtida em aw de 0,99 e temperatura entre 15 °C a 25 °C. Verificou-se uma tendência para maior produção de OTA por *A. ochraceus* CCDCA10211 e CCDCA10212 (8,9-7,9 µg/g, respectivamente) em aw entre 0,98 a 0,99 e temperatura entre 25 °C a 35 °C e 22 °C a 32 °C, respectivamente. Essas informações demonstram que o crescimento e a produção de OTA estão relacionados com a aw e a temperatura. O efeito destes fatores sobre a produção de OTA pode contribuir para o desenvolvimento de modelos que simulem cenários climáticos, proporcionando estratégias de adaptação.

Palavras-chave: Micotoxinas. Café. Fungos toxigênicos. Temperatura. Atividade de água.

## GENERAL ABSTRACT

Abiotic factors that more influence the growth and the ochratoxin A biosynthesis (OTA) in fungi are the temperature and water activity (aw). In this sense, this study was conducted to evaluate the fungi incidence of the genus *Aspergillus*, section *Circumdati* and *Nigri*, in coffee beans grown in two producing regions of Minas Gerais, besides evaluating the in vitro effect of two abiotic factors (temperature and aw) on the growth and OTA biosynthesis by *A. carbonarius* and *A. ochraceus* in synthetic culture coffee base. It was analyzed 14 samples of Arabica coffee beans (*Coffea arabica* L.), seven of them being of the South of Minas and seven in the Cerrado region of Minas. The identification was based on morphological characteristics. In the isolates, the OTA quantification was performed by high-performance liquid chromatography (HPLC). Ninety (90) fungi of the genus *Aspergillus* Section *Nigri* and *Circumdati* were isolated and identified, of which 82% were owned by section *Nigri* and 18% belonging to Section *Circumdati*. In the South region of Minas, the percentage of coffee beans contamination by filamentous fungi was 65.5%. The contamination percentage of the Cerrado samples was 34.5%. In the two regions evaluated, the species most frequently found was *A. niger*. In this study, 43.24% of isolates belonging to Section *Nigri* were producers of OTA. Isolates belonging to Section *Circumdati*, 81.25% were OTA producers. To evaluate the effect of abiotic factors, it was used a central composite design. The Isolates of OTA producers were cultivated on synthetic culture coffee base. *A. carbonarius* isolates showed the largest increase in aw ranges from 0.935 to 0.965, and temperatures between 25 ° C to 32 ° C. Similarly, the optimum growth conditions for the isolates of *A. ochraceus* occurred in aw intervals between 0.940 to 0.990, and temperatures between 21 ° C to 30 ° C. The biggest amount of OTA produced by *A. carbonarius* CCDCA10288 and CCDCA10293 (19.7 to 15.7 µg /g, respectively) was obtained at aw 0.99 and temperature of 15 ° C to 25 ° C. There was a trend for increased OTA production by *A. ochraceus* CCDCA10211 and CCDCA10212 (8.9-7,9 µg/g, respectively) in aw of 0.98 to 0.99, and temperatures between 25 ° C to 35 ° C and 22 ° C to 32 ° C, respectively. All these information demonstrate that the growth and production of OTA are related to w and temperature. The effect of these factors on OTA production may contribute to the development of models that simulate weather scenarios, providing adaptation strategies.

Keywords: Mycotoxins. Coffee. Toxigenic fungi. Temperature. Water activity.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

Figura 1	Fungo do gênero <i>Aspergillus</i> Seção <i>Nigri</i> .....	22
Figura 2	Fungo do gênero <i>Aspergillus</i> Seção <i>Circumdati</i> .....	23
Figura 3	Estrutura química da ocratoxina A.....	26

### CAPÍTULO 2

Figura 1	Porcentagem de contaminação por <i>Aspergillus</i> em grãos de café nas diferentes municípios do Sul de Minas. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade.....	53
Figura 2	Porcentagem de contaminação por <i>Aspergillus</i> em grãos de café nos diferentes municípios do Cerrado de Minas. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade.....	54
Figura 3	Frequência de ocorrência das espécies em relação ao total de <i>Aspergillus</i> Seção <i>Circumdati</i> e <i>Nigri</i> isolados de grãos de café no Sul de Minas.....	56
Figura 4	Frequência de ocorrência das espécies em relação ao total de <i>Aspergillus</i> Seção <i>Nigri</i> isolados de grãos de café no Cerrado de Minas.....	57

### CAPÍTULO 3

Figura 1	Diagrama de Pareto com efeito da temperatura (X1) e atividade de água (X2) sobre <i>Aspergillus carbonarius</i> CCDCA10288 (a) e <i>Aspergillus carbonarius</i> CCDCA10293 (b).....	76
Figura 2	Curva de contorno para crescimento, em função das interações entre temperatura e atividade de água sobre <i>Aspergillus carbonarius</i> CCDCA10288 (a) e <i>Aspergillus carbonarius</i> CCDCA10293 (b) .....	77
Figura 3	Diagrama de Pareto com efeito da temperatura (X1) e atividade de água (X2) sobre <i>Aspergillus ochraceus</i> CCDCA10211 (a); <i>Aspergillus ochraceus</i> CCDCA10212 (b).....	79
Figura 4	Curva de contorno para crescimento em função das interações entre temperatura e atividade de água sobre <i>Aspergillus ochraceus</i> CCDCA10211 (a); <i>Aspergillus ochraceus</i> CCDCA10212 (b) .....	80

Figura 5	Diagrama de Pareto com efeito da temperatura (X1) e atividade de água (X2) sobre <i>Aspergillus carbonarius</i> CCDCA10288 (a); <i>Aspergillus carbonarius</i> CCDCA10293 (b).....	84
Figura 6	Curva de contorno para produção de ocratoxina A, em função das interações entre temperatura e atividade de água sobre <i>Aspergillus carbonarius</i> CCDCA10288 (a); <i>Aspergillus carbonarius</i> CCDCA10293 (b).....	84
Figura 7	Diagrama de Pareto com efeito da temperatura (X1) e atividade de água (X2) sobre <i>Aspergillus ochraceus</i> CCDCA10211 (a); <i>Aspergillus ochraceus</i> CCDCA10212 (b).....	86
Figura 8	Curva de contorno para produção de ocratoxina A, em função das interações entre temperatura e atividade de água sobre <i>Aspergillus ochraceus</i> CCDCA10211 (a); <i>Aspergillus ochraceus</i> CCDCA10212 (b) .....	86
Figura 9	Concentração de OTA ( $\mu\text{g/g}$ ) com projeção atual, otimista (aumento da temperatura em 1,0 °C) e pessimista (aumento da temperatura em 3,7 °C) em relação à temperatura máxima (a) e mínima (b) anual da região do Sul de Minas.....	89
Figura 10	Concentração de OTA ( $\mu\text{g/g}$ ) com projeção atual, otimista (aumento da temperatura em 1,0 °C) e pessimista (aumento da temperatura em 3,7 °C) em relação à temperatura máxima (a) e mínima (b) anual da região do Cerrado de Minas .....	90
Figura 11	Concentração de OTA ( $\mu\text{g/g}$ ) com projeção atual, otimista (aumento da temperatura em 1,0 °C) e pessimista (aumento da temperatura em 3,7 °C) em relação à temperatura máxima (a) e mínima (b) anual da região da Zona da Mata de Minas .....	90
Figura 12	Concentração de OTA ( $\mu\text{g/g}$ ) com projeção atual, otimista (aumento da temperatura em 1,0 °C) e pessimista (aumento da temperatura em 3,7 °C) em relação à temperatura máxima (a) e mínima (b) anual da região da Chapada de Minas .....	91

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

Tabela 1	Principais micotoxinas encontradas em produtos agroalimentares..	25
----------	--	----

### CAPÍTULO 2

Tabela 1	Valores médios de isolados <i>A.circumdatti</i> e <i>A. nigri</i> em grãos de café de duas regiões de Minas Gerais .....	58
Tabela 2	Valores médios das concentrações de OTA dos isolados .....	60

### CAPÍTULO 3

Tabela 1	Variáveis experimentais com valores reais e codificados.....	70
Tabela 2	Matriz do delineamento experimental.....	70
Tabela 3	Matriz do delineamento e valores obtidos nos ensaios de avaliação do crescimento de <i>Aspergillus carbonarius</i> CCDCA10288 e CCDCA10293.....	75
Tabela 4	Matriz do delineamento e valores obtidos nos ensaios de avaliação do crescimento de <i>Aspergillus ochraceus</i> CCDCA10211 e CCDCA10212.....	75
Tabela 5	Modelos preditos para o crescimento dos isolados avaliados (mm)	76
Tabela 6	Matriz do delineamento e valores obtidos nos ensaios de avaliação de produção de OTA por <i>Aspergillus carbonarius</i> CCDCA10288 e CCDCA10293 .....	81
Tabela 7	Matriz do delineamento e valores obtidos nos ensaios de avaliação de produção de OTA por <i>Aspergillus ochraceus</i> CCDCA10211 e CCDCA10212.....	82
Tabela 8	Modelos preditos para produção de OTA pelos isolados avaliados ( $\mu\text{g/g}$ ).....	83

## SUMÁRIO

	<b>CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	14
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	17
<b>2.1</b>	<b>História e evolução da cafeicultura no Brasil</b> .....	17
<b>2.2</b>	<b>Principais fungos produtores de ocratoxina A em café</b> .....	19
<b>2.2.1</b>	<b>Gênero <i>Aspergillus</i> Seção <i>Nigri</i> e Seção <i>Circumdati</i></b> .....	21
<b>2.3</b>	<b>Principais micotoxinas encontradas em alimentos e riscos oferecidos à saúde do consumidor</b> .....	24
<b>2.3.1</b>	<b>Ocratoxina A: caracterização, ocorrência e limites máximos de ingestão</b> .....	26
<b>2.3.2</b>	<b>Ocratoxina A: riscos à saúde do consumidor</b> .....	28
<b>2.4</b>	<b>Fatores que influenciam o desenvolvimento fúngico e a produção de ocratoxina A em café</b> .....	29
<b>2.5</b>	<b>Efeitos das mudanças climáticas sobre o desenvolvimento do cafeeiro</b> .....	30
<b>2.6</b>	<b>Efeitos das mudanças climáticas sobre a produção de micotoxinas</b> .....	34
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	36
	<b>CAPÍTULO 2 Incidência de fungos do gênero <i>Aspergillus</i> Seção <i>Circumdati</i> e <i>Nigri</i> em grãos de café cultivados em duas regiões produtoras do estado de Minas Gerais</b> .....	46
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	48
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	50
<b>2.1</b>	<b>Área de estudo e amostragem</b> .....	50
<b>2.2</b>	<b>Avaliação do percentual de contaminação por fungos do gênero <i>Aspergillus</i> Seção <i>Circumdati</i> e <i>Nigri</i> em grãos de café cultivados em duas regiões de Minas Gerais</b> .....	50
<b>2.3</b>	<b>Isolamento e identificação dos fungos</b> .....	51
<b>2.4</b>	<b>Avaliação da produção de OTA pelos <i>Aspergillus</i> Seção <i>Circumdati</i> e <i>Nigri</i></b> .....	51
<b>2.5</b>	<b>Análises estatísticas</b> .....	52
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	53
<b>3.1</b>	<b>Percentual de contaminação por <i>Aspergillus</i> Seção <i>Circumdati</i> e <i>Nigri</i> em grãos de café cultivados em duas regiões de Minas Gerais</b> .....	53
<b>3.2</b>	<b>Potencial ocratoxigênico das espécies</b> .....	58
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	61
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	62
	<b>CAPÍTULO 3 Influência <i>in vitro</i> de fatores abióticos no crescimento e na biossíntese de Ocratoxina A por <i>Aspergillus</i></b>	

	<i>carbonarius</i> e <i>Aspergillus ochraceus</i> em meio de cultura sintético à base de café no estado de Minas Gerais .....	65
1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	67
2	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	69
2.1	Obtenção dos isolados.....	69
2.2	Reativação dos isolados e avaliação do potencial ocratoxigênico ....	69
2.3	Delineamento experimental.....	70
2.4	Preparo do meio de cultura à base de café .....	71
2.5	Inoculação dos esporos .....	71
2.6	Avaliação do crescimento de <i>Aspergillus carbonarius</i> e <i>Aspergillus ochraceus</i> .....	72
2.7	Extração e quantificação de OTA.....	72
3	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	74
3.1	Avaliação do crescimento de <i>Aspergillus carbonarius</i> e <i>Aspergillus ochraceus</i> em diferentes temperaturas e atividades de água.....	74
3.2	Avaliação da produção de ocratoxina A por <i>Aspergillus carbonarius</i> e <i>Aspergillus ochraceus</i> em diferentes temperaturas e atividades de água .....	81
3.3	Uso do modelo predito para estimar a produção de OTA por <i>Aspergillus carbonarius</i> em quatro regiões cafeeiras de Minas Gerais: Sul, Cerrado, Zona da Mata e Chapada de Minas .....	88
4	<b>CONCLUSÃO</b> .....	92
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	93

## CAPÍTULO 1

### INTRODUÇÃO GERAL

#### 1 INTRODUÇÃO

O café é reconhecido como um dos principais produtos agrícolas exportados pelo Brasil e um importante gerador de divisas para o país, além de ter função social, fixando mão de obra no campo e gerando empregos. O Brasil se destaca, em relação à produção do café, como maior produtor e exportador mundial, além de ser considerado o maior mercado consumidor dessa *commodity* (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2015).

Vários estudos comprovam que o café, além de saboroso, faz muito bem à saúde, sendo rico em minerais, açúcares, aminoácidos e compostos fenólicos (COSTA; DOREA, 2005). A qualidade do café é determinada comercialmente por características físicas dos grãos e sensoriais da bebida. No entanto, o desenvolvimento de infecções microbianas nos grãos de café pode comprometer tanto o seu aspecto visual quanto o sabor e o aroma (BATISTA et al., 2003). Entre os microrganismos associados a frutos e a grãos de café, os fungos filamentosos representam o principal grupo causador de maior dano, pois podem produzir micotoxinas.

As micotoxinas são compostos químicos tóxicos prejudiciais aos seres humanos e animais e as que ocorrem com maior frequência em alimentos são as aflatoxinas e as ocratoxinas (ABRUNHOSA, 2008). As principais espécies de fungos produtores de OTA em café são *A. ochraceus*, *A. carbonarius* e *A. niger* (GILBERT; ANKLAM, 2002; MORELLO et al., 2007). Estudos demonstraram que a OTA tem ação nefrotóxica, citotóxica, carcinogênica, teratogênica e

imunossupressora (ABRUNHOSA; SANTOS; VENÂNCIO, 2006; DACHOUPAKAN et al., 2009; GHALI et al., 2009; LINO et al., 2008; SUÁREZ-QUIROZ et al., 2004; ZHANG et al., 2009), sendo classificada, pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC), como possível carcinogênico renal humano (grupo 2B). Além disso, está relacionada com a nefropatia endêmica dos Bálcãs, doença degenerativa dos rins que afeta a população adulta rural (ESTEBAN et al., 2006; LOBEAU et al., 2005).

Os resultados dos estudos sobre OTA em alimentos despertaram preocupação da União Europeia, que estabeleceu legislação específica limitando em até 5 µg/kg a concentração de OTA para grãos de café torrado e moído e 10 µg/kg para café solúvel (COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES - CEC, 2006). No Brasil, a concentração de OTA em café torrado e solúvel é de 10 µg/kg, conforme o estabelecido pela Resolução - RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011 (BRASIL, 2011).

Associada às condições ambientais, a produção de OTA pode acontecer no processamento pós-colheita, durante a secagem, o transporte ou no armazenamento dos grãos. Os parâmetros macroclimáticos podem aumentar a umidade do ambiente, afetando a composição química da mucilagem do café e, assim, influenciando a atividade microbiana (ALVES; VOLPATO; VIEIRA, 2011).

O desenvolvimento e a biossíntese de OTA por fungos toxigênicos dependem de fatores climáticos, sendo a temperatura e a aw os que desempenham o papel mais importante. Estes fatores estão relacionados ao crescimento microbiológico (PARK; BIN; BROD, 2001), além de ter a capacidade de influenciar a expressão dos genes envolvidos na biossíntese de micotoxinas (O'CALLAGHAN; STAPLETON; DOBSON, 2006). O efeito desses fatores sobre a produção de micotoxinas é compreendido mais facilmente quando ocorre o agrupamento de dados e desenvolvem-se modelos que simulem

cenários climáticos, proporcionando estratégias de adaptação (FELS-KLERX et al., 2009; MIRAGLIA et al., 2009).

Nesse sentido, esse estudo foi realizado com o objetivo de avaliar a incidência de fungos do gênero *Aspergillus* Seção *Circumdati* e *Nigri* em grãos de café cultivados em duas regiões produtoras de Minas Gerais, além de analisar o efeito *in vitro* de dois fatores abióticos (temperatura e atividade de água) no crescimento e na biossíntese de OTA por *Aspergillus carbonarius* e *Aspergillus ochraceus* em meio de cultura sintético à base de café.

Os resultados deste trabalho são apresentados em três capítulos. No primeiro encontra-se uma revisão de literatura. No segundo capítulo avalia-se a incidência de fungos produtores de OTA pertencentes ao gênero *Aspergillus* Seção *Circumdati* e *Nigri* em grãos de café cultivados em duas regiões produtoras do estado de Minas Gerais. No terceiro capítulo analisa-se a influência *in vitro* da temperatura e da atividade de água no crescimento e na biossíntese de OTA por *Aspergillus carbonarius* e *Aspergillus ochraceus* em meio de cultura sintético à base de café.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 História e evolução da cafeicultura no Brasil**

O café chegou ao norte do Brasil, mais precisamente em Belém, em 1727, trazido da Guiana Francesa pelo sargento-mor Francisco de Mello Palheta, a pedido do governador do Maranhão e Grão Pará, que o enviara às Guianas com essa missão. As boas condições climáticas presentes no país facilitaram o cultivo e a cultura se espalhou rapidamente, com produção voltada para o mercado doméstico (SEGGES, 2001).

Em sua trajetória pelo Brasil, o café propagou-se pelos estados do Maranhão, Bahia, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Minas Gerais. Num espaço de tempo relativamente curto, o café passou de uma posição relativamente secundária para a de produto-base da economia brasileira. Desenvolveu-se com total independência, ou seja, apenas com recursos nacionais, sendo, afinal, a primeira cultura exclusivamente brasileira que visou à produção de riquezas (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ - ABIC, 2015).

O café é uma das bebidas mais consumidas mundialmente. No Brasil, seu consumo também se destaca entre as demais bebidas. De acordo com a ABIC (2015), o consumo interno de café no Brasil, que havia registrado retração de -1,23%, em 2013, mostrou recuperação de +1,24%. No período compreendido entre novembro/2013 e outubro/2014, a ABIC registrou o consumo de 20,333 milhões de sacas. O consumo per capita foi de 6,12 kg de café em grão cru ou 4,89 kg de café torrado, o equivalente a 81 litros para cada brasileiro por ano.

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 país ainda é o maior produtor mundial, muito 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, 2015). A concorrência de mercado tem exigido constante preocupação com a qualidade, pois é um dos poucos produtos agrícolas que têm seus preços baseados em parâmetros qualitativos.

Segundo a Organização Internacional do Café - OIC (2015), a produção do ano-safra 2014/15 girará em torno de 141,9 milhões de sacas beneficiadas de 60 kg. O Brasil é, de longe, o maior consumidor de café dos países exportadores, 20,8 milhões de sacas em 2014, seguido pela Indonésia (4,2 milhões), a Etiópia, (3,7 milhões) e o México (2,4 milhões). No quesito exportação em âmbito mundial, o total em fevereiro de 2015 foi de 8,6 milhões de sacas, uma queda de 10,2% em relação a fevereiro de 2014.

Os principais estados produtores de café no Brasil são Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Paraná, Bahia, Rondônia, Mato Grosso, Pará e Rio de Janeiro. A produção em Minas Gerais foi de 23,341 milhões de sacas na safra 2015, com variação percentual de 2,71% para mais ou para menos, com intervalo de produção entre 22,709 milhões e 23,973 milhões de sacas. Em comparação com a safra 2014, quando ocorreu uma inversão da bienalidade da safra cafeeira no estado, o resultado do presente levantamento sinaliza uma tendência de rápido crescimento da produção em Minas Gerais, da ordem de 3,08%, pautada, principalmente, na expansão projetada para regiões como a Zona da Mata Mineira e para algumas microrregiões cafeeiras do Sul de Minas que apresentam bienalidade invertida com relação ao estado e se encontram, portanto, em período de bienalidade alta. Esta tendência é respaldada, também, nas condições verificadas até o momento em todas as regiões produtoras do estado, quais sejam, a melhora nos tratos culturais, incentivada pela recuperação dos preços do café em 2014, as boas floradas ocorridas nas principais regiões

produtoras de café e as condições climáticas favoráveis no período pós-floradas (CONAB, 2015).

Como qualquer outro produto, o café está susceptível à contaminação por microrganismos. O desenvolvimento de infecções microbianas nos grãos de café compromete tanto o aspecto visual quanto o sabor e o aroma, além de influenciar a qualidade e produzir micotoxinas (BATISTA et al., 2003).

## 2.2 Principais fungos produtores de ocratoxina A em café

De acordo com Silva (2008), os principais fungos produtores de OTA são *Penicillium verrucosum*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus sulphureus*, *Aspergillus sclerotiorum* e *Aspergillus niger*. São três os principais fungos produtores de OTA que estão associados ao café: *A. carbonarius*, *A. ochraceus* e *A. niger*.

Atualmente, sabe-se que a OTA é produzida por outras espécies de fungos pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, entretanto, sua presença em amostras de café tem sido atribuída, principalmente, à ocorrência de espécies do gênero *Aspergillus* pertencentes à *Seção Circumdati* e à *Seção Nigri* (CHALFOUN; PARIZZI, 2008). Segundo Chalfoun e Batista (2006), fungos produtores de OTA em café são encontrados com maior frequência na *Seção Circumdati*, especialmente *A. ochraceus*. A espécie *Penicillium verrucosum* é reconhecida como produtora de OTA, entretanto, alguns trabalhos citam também *P. viridicatum* como responsável pela produção desta micotoxina (PITT; HOCKING, 1997).

Os fungos produtores de micotoxinas podem estar presentes nos ambientes das lavouras, no preparo e no armazenamento do café e sua relação com a qualidade e a segurança do produto final depende das condições ambientais, do manejo da cultura e do processamento pós-colheita (BATISTA et

al., 2003). A contaminação dos grãos de café pode ocorrer nas fases de processamento, principalmente durante a lavagem, a fermentação e a secagem (TANIWAKI et al., 2003; URBANO et al., 2001). O tipo de terreiro utilizado para a secagem do café assume importante papel na contaminação por espécies de *Aspergillus* ocratoxigênicos e, conseqüentemente, produção de OTA (BUCHELI; TANIWAKI, 2002); o terreiro de terra é o mais favorável para esta contaminação (MORAES; LUCHESE, 2003).

Conforme Silva (2008), as instalações e as condições de armazenamento das tulhas também precisam ser levadas em consideração, nas quais se observa grande acúmulo de poeira proveniente do processo de beneficiamento. Isso pode acarretar a disseminação de fungos ocratoxigênicos de uma safra para outra ou agravar as contaminações já ocorridas, dependendo do tempo de armazenamento. Além do risco de produzir OTA, fungos que crescem em grãos estocados podem reduzir a taxa de germinação ao longo do tempo, com perda de carboidratos, proteínas e óleo total, e induzem o aumento de umidade e a quantidade de ácidos graxos livres, e outras mudanças químicas (DUARTE; PENA; LINO, 2009).

De acordo com Suárez-Quiroz et al. (2004), os fungos ocratoxigênicos podem ser eliminados quando removido o mesocarpo, um importante substrato para o seu desenvolvimento. A colonização interna pelos fungos pode ser explicada por danos causados por insetos, ácaros ou condições climáticas adversas. Outra explicação é a ocorrência da ruptura de estruturas da parede celular por alterações na pectina, celulose, hemicelulose e lignina nos frutos. Estes compostos conferem uma estrutura mais rígida aos frutos do café e a degradação natural torna os frutos mais susceptíveis à ocorrência fúngica (BATISTA; CHALFOUN, 2007).

Batista et al. (2009) avaliaram a ocorrência de OTA em grãos de café processados por diferentes métodos e verificaram que as frações boia e varrição

apresentaram os maiores níveis de contaminação por fungos toxigênicos e OTA, quando secos em terreiro de terra. Nesse estudo ficou demonstrado que a colheita e as operações de pré-processamento geram produtos com características e riscos diferentes de exposição a esta contaminação. O maior risco de exposição à contaminação do café foi caracterizado, portanto, pelo contato do fruto com o solo, constituído pelo café de varrição e por manejo pós-colheita inadequado, durante a secagem em terreiro de terra. Campos et al. (2009) também verificaram que o café com permanência prolongada no solo apresentou elevada ocorrência de *A. ochraceus* e níveis muito elevados de OTA, no cerrado mineiro e baiano.

### **2.2.1 Gênero *Aspergillus* Seção *Nigri* e Seção *Circumdati***

Fungos do gênero *Aspergillus* Seção *Circumdati* e *Nigri* são os principais produtores de OTA em regiões de clima tropical e subtropical (GIL-SERNA et al., 2011). De acordo com Varga et al. (2011), espécies pertencentes ao gênero *Aspergillus* Seção *Nigri* (Figura 1) são de grande importância na micologia de alimentos, médica e biotecnológica.

Embora a principal fonte de contaminação seja o solo, estes fungos estão entre os mais comuns responsáveis pela deterioração dos alimentos e biodeterioração de muitos produtos agrícolas (SAMSON et al., 2004; VARGA; SAMSON, 2008). Os fungos dessa Seção têm conídios de coloração marrom-escura a negra, com estruturas dos conidióforos unisseriados ou bisseriados, vesículas esféricas e hifas hialinas ou levemente pigmentadas próximo ao ápice (BELLÍ et al., 2004).



Figura 1 Fungo do gênero *Aspergillus* Seção *Nigri*

Dentre as espécies de *Aspergillus* seção *Nigri*, *A. carbonarius* é reconhecido, principalmente, por ser um dos maiores produtores de OTA, sendo encontrado especialmente em uvas, vinhos e cafés (NOONIM et al., 2008; SERRA, 2005). Esta espécie desenvolve-se à temperatura entre 15 °C e 40 °C (temperatura ótima 25 °C a 30 °C) e atividade de água entre 0,95 e 0,99 (PERRONE et al., 2008). Entretanto, as condições ótimas para a produção de OTA por *A. carbonarius* diferem das condições ótimas para o crescimento do fungo e ocorrem entre 15 °C e 20°C, e a 0,95-0,99 de atividade de água (BELLI et al., 2006; LEONG et al., 2006; PASSAMANI et al., 2014).

No Brasil, estudos demonstram que *Aspergillus niger* também é responsável pela presença de OTA em grãos de café (MAGNANI et al., 2005), além de várias substâncias, entre elas ácido cítrico, ácido glucônico, ácido fumárico, citrato de ferro e enzimas extracelulares, como pectinases, proteases, amiluglicosidase, catalase,  $\alpha$ -amilase, celulase e lípase, as quais são de importância biotecnológica, úteis nas fermentações nas indústrias, incluindo a indústria de alimentos, e aplicação em bioprocessos (ASTORECA et al., 2009; BLUMENTHAL, 2004). *Aspergillus niger* desenvolve-se à temperatura entre

30 °C a 35 °C e atividade de água entre 0,93 e 0,98 (KLICH, 2002). As condições ótimas para a produção da toxina ocorrem a 20 °C e 25 °C e 0,95 e 0,98 de atividade de água (ESTEBAN et al., 2006). Apenas uma baixa porcentagem (5% a 10%) de cepas de *A. niger* é produtora de OTA (PERRONE et al., 2008).

*A. niger* é um fungo que tem o status de *generally recognized as safe* (GRAS), ou geralmente reconhecido como seguro, pelo *Food and Drug Administration* (EUA), no que se refere ao seu uso industrial (FRISVAD; THRANE; SAMSON, 2007; SAMSON et al., 2004; VARGA et al., 2011).

Fungos do gênero *Aspergillus* seção *Circumdati* (Figura 2) são importantes não só pela produção de micotoxinas, incluindo a OTA, mas pela sua utilização na indústria de biotecnologia, especialmente para biotransformações (MISKI; DAVIS, 1988).

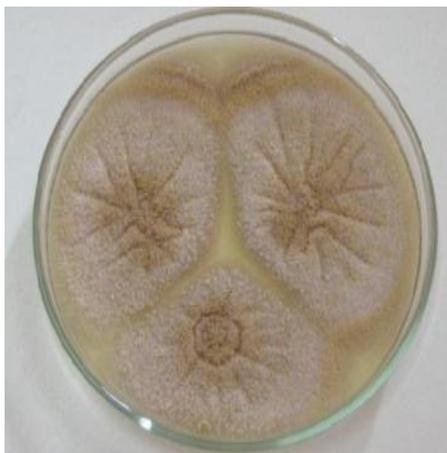


Figura 2 Fungo do gênero *Aspergillus* Seção *Circumdati*

São fungos que têm como habitat o solo, principalmente de áreas tropicais e subtropicais. Podem ser encontrados em frutos, grãos (cereais e sementes) e ambientes de secagem. As principais características fenotípicas são

as seguintes: coloração ocre das colônias, cabeça conidial bisseriada e capacidade de produzir esclerócio, em algumas espécies (CHALFON; BATISTA, 2003).

Pesquisas sugerem que, entre os fungos pertencentes ao gênero *Aspergillus* da Seção *Circumdati*, *A. ochraceus* é o maior produtor de OTA em café (BATISTA et al., 2009). *A. steynii* e *A. westerdijkiae* são consideradas as principais espécies da seção *Circumdati* produtoras de OTA em alimentos, devido à diversidade de alimentos que podem contaminar e à alta produção de OTA (GIL-SERNA et al., 2011).

*Aspergillus ochraceus* desenvolve-se em temperatura entre 8 °C e 37 °C (temperatura ótima 24-31 °C), atividade de água mínima de 0,76 (aw ótima 0,95-0,99) e pH entre 3-10 (PITT; HOCKING, 1997). Apesar de *Aspergillus ochraceus* desenvolver-se a partir de 0,76 de atividade de água, a OTA é produzida a 0,85 (sendo 0,97 a aw ótima). A temperatura em que ocorre produção da toxina situa-se entre 12 °C e 37 °C (ótima de 25 °C) e o pH ótimo de produção entre 5-6 (MOSS, 1991).

### **2.3 Principais micotoxinas encontradas em alimentos e riscos oferecidos à saúde do consumidor**

Algumas espécies de fungos filamentosos apresentam a capacidade de produzir, em condições naturais e laboratoriais, metabólitos secundários tóxicos. Esses metabólitos são compostos químicos sintetizados por meio de um conjunto de vias metabólicas e excretados para o meio, mas que não são essenciais para o crescimento e a sobrevivência do organismo. Como são produzidos por fungos, esses metabólitos são denominados micotoxinas e, se ingeridos com alimentos, causam alterações biológicas prejudiciais tanto ao homem como aos animais (BOZZA, 2010; SABBADINI et al., 2009).

Existem cerca de 300 micotoxinas diferentes identificadas, mas apenas 20 são mais comumente encontradas em determinados produtos agrícolas (SAMSON et al., 2010; SARTORI et al., 2006). As principais micotoxinas estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1 Principais micotoxinas encontradas em produtos agroalimentares

<b>Produtos agrícolas</b>	<b>Micotoxinas</b>
Amendoins	Aflatoxinas (B1, B2, G1 e G2), ácido clicopiazônico
Café	Ocratoxina A
Carnes e ovos	Patulina, citrinina, ocratoxina A, aflatoxina M1
Cereais	Desoxinivalenol, nivalenol, toxina T-2, zearalenona, fumonisinas, ocratoxina A, citrinina
Figos	Ocratoxina A
Frutos secos	Aflatoxinas (B1, B2, G1 e G2), ocratoxina A
Maçãs	Patulina
Milho	Aflatoxinas (B1, B2, G1 e G2), desoxinivalenol, nivalenol, zearalenona, fumanisinas, toxina T-2, citrinina, ocratoxina A
Produtos lácteos	Aflatoxina M1, ocratoxina A
Sementes oleaginosas	Aflatoxinas (B1, B2, G1 e G2)
Uvas passas	Ocratoxina A

Fonte: Abruñosa (2008)

Para Jarvis e Miller (2005), as micotoxinas de maior relevância para a saúde de animais e humanos são as aflatoxinas, produzidas por fungos do gênero *Aspergillus*, como *A. flavus* e *A. parasiticus*; as ocratoxinas, produzidas por espécies pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* e as fusariotoxinas, que têm como principais representantes os tricotecenos, a zearalenona e as fumonisinas, produzidas por diversas espécies do gênero *Fusarium*. Dentre as micotoxinas, a OTA é a que apresenta maior relevância para o café, por

apresentar limites máximos toleráveis de ocorrência (PIMENTA; VILELA, 2003).

Segundo Vasanthi e Bhat (1998), em todas as etapas de produção devem ser tomadas medidas preventivas para reduzir o risco de micotoxinas em produtos agrícolas, desde o plantio, a colheita, a secagem, o transporte e a estocagem da matéria-prima até o processamento do produto final.

### 2.3.1 Ocratoxina A: caracterização, ocorrência e limites máximos de ingestão

A OTA pode ser encontrada em muitos alimentos, como cereais (trigo, aveia, cevada, milho), vinho, suco de uva, cerveja, frutas secas (passas), soja, cacau, chá, temperos, café (verde, torrado e instantâneo) e produtos de origem animal (ALMEIDA et al., 2007; FUJII et al., 2007). Segundo Marin (2005), OTA é um grupo de sete derivados de isocumarina ligada a uma amina que, por sua vez, está unida a um grupo  $\beta$ -fenilalanina (Figura 3).

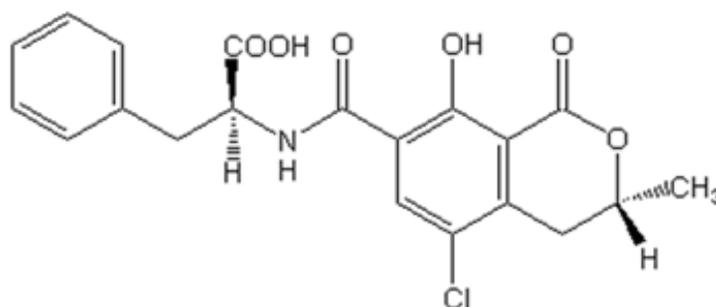


Figura 3 Estrutura química da ocratoxina A  
Fonte: Marin (2005)

A OTA é um metabólito secundário produzido por fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. As principais espécies de fungos do gênero *Aspergillus* produtores de OTA em café são *A. ochraceus*, *A. carbonarius*, *A.*

*niger* e *A. westerdijkiae* (GILBERT; ANKLAM, 2002; MORELLO et al., 2007). De acordo com Moss (1996), a principal espécie produtora de OTA em café é *A. ochraceus*.

A OTA caracteriza-se por apresentar fluorescência verde quando exposta à luz ultravioleta e tem uma molécula de cloro em sua estrutura, responsável pelo caráter tóxico (EDWARDS; O'CALLAGHAN; DOBSON, 2002). A fluorescência da OTA é utilizada para a revelação em cromatografia de camada delgada (CCD) e para a sua detecção por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (ABRUNHOSA, 2008).

Vários países estabeleceram limites máximos de OTA para diversos cereais e outros produtos, no entanto, poucos têm legislação para grãos de café. A União Europeia estabeleceu limites de 5 µg/kg para a concentração de OTA em café torrado e 10 µg/kg em café solúvel. Certos países impuseram limites também para café verde de 8-20 µg/kg (LEONG et al., 2007). No Brasil, a concentração de OTA em café torrado e solúvel é de 10 µg/kg, estabelecida pela Resolução- RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011 (BRASIL, 2011).

Segundo Gelli et al. (2001), a segurança do alimento é a maior preocupação que a indústria alimentícia enfrenta. O sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) é indicado pelo *Codex Alimentarius* para garantir a segurança de produtos alimentícios. Assim, a aplicação dos princípios da APPCC depende de base científica quanto aos fatores relacionados à produção de OTA em toda cadeia produtiva do café, até o armazenamento do grão beneficiado, para assim caracterizar como e quais medidas de controle de caráter preventivo poderão ser utilizadas.

No Brasil, a seleção tradicional de cafés de boa qualidade para atender às exportações inclui uma classificação sensorial que elimina qualquer material com significativa presença de fungos e OTA acima dos níveis admitidos. Assim, cafés contaminados são improváveis de serem aceitos e comercializados, uma

vez que odores e sabores indesejáveis os tornam inaceitáveis. Entretanto, cafés sem o mesmo rigor de seleção podem apresentar níveis significativos de OTA. A preocupação reside, portanto, no consumo interno do país, uma vez que se consome o excedente do produto exportável (CHALFOUN; PARIZZI, 2008).

### **2.3.2 Ocratoxina A: riscos à saúde do consumidor**

A OTA, quando ingerida, permanece no organismo por um longo período, tendo uma meia vida de 35 dias em humanos, de 72 a 120 horas em porcos e de 77 horas em animais ruminantes (AL-ANATI; PETZINGER, 2006).

Em humanos, a OTA é excretada lentamente, devido à sua grande afinidade com algumas proteínas plasmáticas, sua circulação entero e sua reabsorção da urina (LINO et al., 2008; RICHARD, 2007). A OTA acumula no tecido adiposo e este processo também auxilia na lenta eliminação pelo organismo (PITT, 2000). Após ser ingerida, a OTA é lentamente absorvida pelo trato gastrintestinal, entra na circulação, sendo distribuída, principalmente, para os rins, e as concentrações inferiores podem ser encontradas no fígado, no músculo e na gordura (FUNGARO; SARTORI, 2009; VARGA; SAMSON, 2008).

Os rins são o principal alvo da atividade tóxica da OTA, no entanto, o fígado também pode sofrer danos quando exposto a altos níveis da toxina (BUSBY JUNIOR; WOGAN, 1981). Estudos demonstram que a OTA está relacionada com a nefropatia endêmica dos Balcãs, doença degenerativa dos rins que afeta exclusivamente a população adulta rural (ESTEBAN et al., 2006; LOBEAU et al., 2005).

Para Zhang et al. (2009), pesquisas têm indicado que a OTA pode afetar também o sistema neural. Os mecanismos moleculares de sua neurotoxicidade

ainda não estão bem elucidados, embora o potencial neurotóxico da OTA seja conhecido.

Os efeitos tóxicos da OTA parecem estar relacionados à sua capacidade de inibir a síntese proteica, competindo com a fenilalanina na reação catalisada pela fenilalanil-tRNA sintetase e outros sistemas que exigem esse aminoácido, e aumenta a peroxidação lipídica, levando a um maior dano celular e mitocondrial (DIRHEIMER, 1996; TURNER; SUBRAHMANYAM, 2009). Esta micotoxina é, ainda, considerada nefrotóxica, citotóxica, carcinogênica, teratogênia e imunossupressora (ABRUNHOSA; SANTOS; VENÂNCIO, 2006; DACHOUPAKAN et al., 2009; LINO et al., 2008; SUÁREZ-QUIROZ et al., 2004). Tem sido investigada também como indutora de mutações gênicas por meio de mecanismos genotóxicos ainda não muito claros.

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

#### **2.4 Fatores que influenciam o desenvolvimento fúngico e a produção de ocratoxina A em café**

De acordo com Nogueira e Oliveira (2006), a colonização fúngica e a produção de toxina são favorecidas pelo contato prolongado com o solo durante a fase de colheita e secagem dos grãos. Outros fatores, como temperatura, atividade de água ( $a_w$ ), pH, umidade e tipo de substrato, afetam o crescimento e a produção de OTA pelo fungo (ESTEBAN et al., 2006; LASRAM et al., 2010, PASSAMANI et al., 2014).

O desenvolvimento e a biossíntese de OTA por fungos toxigênicos dependem de fatores climáticos, sendo a temperatura e a  $a_w$  os fatores que

desempenham o papel mais importante. Estes fatores estão relacionados ao crescimento microbiológico (PARK; BIN; BROD, 2001), além de ter a capacidade de influenciar a expressão dos genes envolvidos na biossíntese de micotoxinas (O'CALLAGHAN et al., 2006).

Existem temperaturas ótimas, mínimas e máximas para o crescimento de fungos toxigênicos, assim como uma temperatura ótima para a produção de toxinas. A maioria dos fungos toxigênicos desenvolve-se entre 5 e 60 °C, enquanto a faixa de temperatura para o crescimento e a produção de micotoxinas encontra-se, geralmente, entre 25 °C e 40 °C (MOSS, 1991; PITT; HOCKING, 2009).

## **2.5 Efeitos das mudanças climáticas sobre o desenvolvimento do cafeeiro**

Os fatores climáticos exercem papel fundamental nos processos fisiológicos do cafeeiro, influenciando o excesso ou o déficit hídrico do sistema água-solo-planta, a absorção de nutrientes pela planta, bem como outras características relacionadas com distúrbios fisiológicos e bioquímicos (AGRIOS, 2005). A produtividade e a qualidade do café estão diretamente relacionadas às condições climáticas, uma vez que interferem nas fases de crescimento e frutificação do cafeeiro, podendo alterar o zoneamento da cultura, as práticas de manejo e os distúrbios fisiológicos, bem como o favorecimento de doenças e pragas que incidem na cultura.

O cultivo do café arábica (*Coffea arabica* L.) requer temperaturas médias anuais amenas, entre 18 °C e 23 °C. Por sua vez, o café conilon (*Coffea canephora*) é menos sensível às mudanças de clima, se adaptando a temperaturas bem mais elevadas, com médias anuais entre 22 °C e 26 °C (CAMARGO, 2010; PEZZOPANE, 2008). Portanto, é importante ressaltar que as mudanças

climáticas afetarão estas espécies de formas diferentes, dadas as suas distintas características ecofisiológicas.

O cafeeiro, de modo geral, é pouco tolerante ao frio. Assim, temperaturas próximas a 0,7 °C, no abrigo meteorológico (FAGNANI, 1985) e a -2,0 °C, próximo às folhas (CAMARGO; SALATI, 1966) podem indicar início de um processo de danos aos tecidos das plantas. Temperaturas foliares entre -3,0 °C e -4,0 °C provocam danos graves e morte dos tecidos (CARAMORI; MANETTI FILHO, 1993; SENTELHAS; FAZUOLI; PEZZOPANE, 1995). Regiões com temperaturas médias anuais inferiores a 18 °C, a ocorrência de geadas, mesmo que esporádicas, e ventos frios podem limitar a exploração econômica da cultura (CAMARGO; FRANCO, 1985).

Segundo Camargo e Franco (1985), temperaturas médias acima de 30 °C podem provocar danos à folhagem; temperaturas elevadas na fase de florescimento poderão culminar no abortamento dos botões florais, não produzindo frutos. Além disso, se temperaturas altas no florescimento forem associadas a extensos períodos secos, a probabilidade de abortamento das flores aumenta. Exposições contínuas acima de 30 °C resultam não apenas no menor crescimento, mas também em anormalidades, como amarelecimento das folhas e tumores na base do caule (DAMATTA, 2004).

Conforme Fioravanti (2012), pesquisas apontam que, no noroeste paulista e no sul de Minas Gerais, as áreas plantadas com café reduziram drasticamente ou até mesmo desapareceram. Em resposta ao aumento da temperatura, estudos indicam que, até 2020, ocorrerá uma redução próxima a 90% nas áreas favoráveis ao plantio em Goiás, Minas e São Paulo e de 75% no Paraná (ASSAD et al., 2008). Temperaturas elevadas favorecem o desenvolvimento e a maturação precoce dos frutos, provocando, assim, perdas no rendimento e na qualidade dos grãos, uma vez que a colheita e a secagem dos frutos coincidirão com o período chuvoso. Caso a colheita, a secagem e o

beneficiamento do cafeeiro coincidam com a época chuvosa, poderá haver maior incidência de fungos produtores de toxinas.

Qualquer fator que reduza a taxa fotossintética, tais como estresse hídrico e/ou extremos de temperatura, pode diminuir e até inviabilizar a produção cafeeira do ano seguinte (CHAVES FILHO; OLIVEIRA, 2008). Entretanto, estes impactos poderão ser atenuados, caso haja disponibilidade hídrica ao cafeeiro, pois a transpiração atua como regulador térmico das plantas, reduzindo, assim, a temperatura das folhas, o que permite a manutenção da atividade fotossintética do cafeeiro, mesmo em condições de alta temperatura (ALVES, 2010).

A precipitação é fator limitante que pode comprometer a produtividade das lavouras cafeeiras. Regiões onde a precipitação é maior que 150 mm por mês no período de floração, formação e maturação dos frutos, são consideradas com condições hídricas favoráveis para produção de café. Este período coincide também com a época de renovação da lavoura, quando ela está emitindo ramos e folhas e, portanto, o cafeeiro necessita de maior umidade no solo. Na fase de colheita, que coincide com o repouso, quando o crescimento da planta é reduzido, a necessidade de umidade no solo é pequena (MARTINEZ; TOMAZ; SAKIYAMA, 2007).

Estudos sobre mudanças climáticas preveem maiores irregularidades na distribuição e na intensidade das chuvas, podendo ocasionar sérios danos ao cafeeiro, pois a ocorrência de chuvas excessivas no inverno pode contribuir para que o cafeeiro se mantenha em estado de vegetação ativa. Nesta época, ele deveria estar em repouso. Nestas condições, toda a parte aérea do cafeeiro pode manifestar sintomas de clorose em folhas novas, queda das folhas, queima das margens das folhas e dos brotos terminais, bem como manchas escuras em diversos pontos da extremidade dos ramos (BITANCOURT; PINHEIRO, 1956). Com o possível aumento do cultivo do cafeeiro em altas altitudes (como

estratégia de mitigação aos impactos das mudanças climáticas), a ocorrência de ventos frios e constantes nas partes mais expostas dos cafezais agravará a ocorrência de tais sintomas. Portanto, nessas regiões devem ser adotadas práticas de manejo, como a construção de quebra-ventos, de modo a minimizar tais problemas.

As previsões do *Intergovernmental Panel on Climate Change* indicam um aumento da concentração de CO<sub>2</sub> na atmosfera com o passar dos anos (INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE - IPCC, 2007), entretanto, ainda existe escassez de informações conclusivas sobre o efeito que o CO<sub>2</sub> pode ter no desenvolvimento de muitas culturas agrícolas. Alterações na concentração de CO<sub>2</sub> podem causar mudanças na assimilação de carbono, na produção e na alocação de biomassa, na atividade estomática e na transpiração de diversas espécies vegetais, mas o volume de informações científicas acerca desses fenômenos na cultura do café ainda é reduzido.

Pimentel (2011) cita os principais efeitos do aumento de CO<sub>2</sub> no metabolismo vegetal, como aumento da assimilação de CO<sub>2</sub> e da produção de biomassa, aumento da eficiência de uso de nitrogênio, devido à menor produção de Rubisco, menor condutância estomática, com conseqüente maior eficiência de uso de água, estímulo da taxa de respiração mitocondrial e aumento da produtividade agrícola.

Não se deve, no entanto, avaliar o impacto de alterações na concentração de CO<sub>2</sub> atmosférica apenas sobre o metabolismo vegetal. Mudanças na composição atmosférica podem provocar modificação de etapas do ciclo de pragas, influenciar a taxa de desenvolvimento de patógenos e, até mesmo, modificar a resistência das plantas a eles, causando alterações no agroecossistema. Essas alterações atmosféricas podem modificar a eficiência das estratégias atualmente utilizadas no manejo fitossanitário (COAKLEY; SCHERM; CHAKRABORTY, 1999).

## 2.6 Efeitos das mudanças climáticas sobre a produção de micotoxinas

As concentrações de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), monóxido de carbono (CO) e metano ( $\text{CH}_4$ ), gases do chamado efeito estufa, estão aumentando cada vez mais e este fenômeno resulta em um superaquecimento ambiental (SANT'ANA, 2010). Nos próximos 20 anos, o aquecimento global poderá aumentar a severidade de doenças em plantas em todo o mundo (MIRAGLIA et al., 2009).

Segundo o Painel IPCC (2007), a temperatura aumentará cerca de 4 °C, em 100 anos. Ainda há grande incerteza sobre como essa mudança influenciará a produtividade de cada região e como isso irá afetar a ocorrência e a concentração de micotoxinas.

De acordo com Paterson e Lima (2011), em regiões que, atualmente, são mais frias haverá maior produtividade de alimentos, o que levará a um provável aumento na concentração de micotoxinas, devido ao maior número de culturas em uma determinada área. O desenvolvimento de fungos produtores de micotoxinas em temperaturas mais elevadas poderá dominar regiões que, atualmente, têm climas mais frios. Em contrapartida, em regiões que, atualmente, são mais quentes haverá menor produtividade de alimentos e, com isso, menor concentração de micotoxinas, devido ao menor número de culturas em uma determinada área. Nestas regiões as temperaturas se tornarão muito altas para o desenvolvimento de alguns fungos e a produção de micotoxinas.

Conforme Ingram (1999) e Miraglia et al. (2009), os fatores climáticos com maior probabilidade de alterações futuras são temperatura e precipitação, proporcionando um grande impacto sobre planta, patógeno e micotoxina. O aquecimento global não influenciará apenas os patossistemas já presentes em certas regiões, mas também influenciará o surgimento de novas doenças, assim como o desaparecimento de alguns fungos toxigênicos (DESPREZ-LOUSTAU

et al., 2007). A chave para considerar o impacto que as mudanças climáticas causam em um determinado microrganismo é a sua capacidade à mutação.

Os efeitos das mudanças climáticas sobre a produção de micotoxinas são compreendidos mais facilmente quando ocorrem o agrupamento de dados e o tempo exato de contaminação junto com o desenvolvimento de modelos que simulem cenários do clima futuro, proporcionando estratégias de adaptação (FELS-KLERX et al., 2009; MIRAGLIA et al., 2009).

## REFERÊNCIAS

- ABRUNHOSA, L. J. **Estratégias para o controle de ocratoxina A em alimentos**. 2008. 236 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química e Biológica) - Universidade do Minho, Minho, 2008.
- ABRUNHOSA, L. J.; SANTOS, L.; VENÂNCIO, A. Degradation of ochratoxin A by proteases and by a crude enzyme of *Aspergillus niger*. **Food Biotechnology**, New York, v. 20, n. 3, p. 231-242, Dec. 2006.
- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. Burlington: Elsevier Academic, 2005. 922 p.
- AL-ANATI, L.; PETZINGER, E. Immunotoxic activity of ochratoxin A. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, Oxford, v. 29, n. 1, p. 79-90, Jan. 2006.
- ALMEIDA, A. P. et al. Ochratoxin A in Brazilian instant coffee. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 38, n. 2, p. 300-303, Apr./June 2007.
- ALVES, H. M. R.; VOLPATO, M. M. L.; VIEIRA, T. G. C. Características ambientais e qualidade da bebida dos cafés do Estado de Minas Gerais. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 32, n. 261, p. 18-29, abr. 2011.
- ALVES, J. D. Água na produção de café: sua importância no desenvolvimento da planta. In: SEMINÁRIO PARA A SUSTENTABILIDADE DA CAFEICULTURA, 2., 2010, Alegre. **Anais...** Alegre: CCA-UFES-ES, 2010. 1 CD-ROM.
- ASSAD, E. D. et al. **Aquecimento global e a nova geografia da produção agrícola no Brasil**. Brasília: Embaixada Britânica, 2008. v. 1, 82 p.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ. **Estatísticas**: indicadores da indústria de café do Brasil. Disponível em: <<http://www.abic.com.br/exportação>>. Acesso em: 24 ago. 2015.
- ASTORECA, A. et al. Ecophysiological factor effect on growth rate, lag phase and ochratoxin A production by *Aspergillus niger* Aggregate strains on irradiated peanut seeds. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 129, n. 2, p. 131-135, Feb. 2009.

- BATISTA, L. R.; CHALFOUN, S. M. Incidência de ochratoxina A em diferentes frações do café (*Coffea arabica* L.): bóia, mistura e varrição após secagem em terreiros de terra, asfalto e cimento. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 3, p. 804-813, maio/jun. 2007.
- BATISTA, L. R. et al. Ochratoxin A in coffee beans (*Coffea arabica* L.) processed by dry and wet methods. **Food Control**, Guildford, v. 20, n. 9, p. 784-790, Sept. 2009.
- BATISTA, L. R. et al. Toxigenic fungi associated with processed (green) coffee beans (*Coffea arabica* L.). **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 85, n. 3, p. 293-300, Sept. 2003.
- BELLÍ, N. et al. Mycobiota and ochratoxin A producing fungi from Spanish wine grapes. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 111, p. 40-45, Sept. 2006. Supplement 1.
- BELLÍ, N. et al. Ochratoxin A in wines, musts and grape juices from Spain. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Oxford, v. 84, n. 6, p. 591-594, Apr. 2004.
- BITANCOURT, A. A.; PINHEIRO, E. D. A seca dos ponteiros do cafeeiro na presente estação. **O Biológico**, São Paulo, v. 39, p. 140-142, 1956.
- BLUMENTHAL, C. Z. Production of toxic metabolites in *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* and *Thichoderma reesei*: justification of mycotoxin testing in food grade enzyme preparations derived from the three fungi. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, New York, v. 39, n. 3, p. 214-228, June 2004.
- BOZZA, A. **Detecção e quantificação de ocratoxina a produzida por espécies de *Aspergillus* isoladas de grãos de café**. 2010. 144 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 7**, de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre Limites Máximos Tolerados (LMT) para micotoxinas em Alimentos. Brasília, 2011. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 29 nov. 2011.

BUCHELI, P.; TANIWAKI, M. H. Research on the origin, and the impact of post-harvest handling and manufacturing on the presence of ochratoxin A in coffee: review. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 19, n. 7, p. 655-665, July 2002.

BUSBY JUNIOR, W. F.; WOGAN, G. N. Ochratoxins. In: SHANK, R. C. (Ed.). **Mycotoxins and N nitroso compounds: environmental risks**. Boca Raton: CRC, 1981. v. 2, p. 129-136.

CAMARGO, A. P.; FRANCO, C. F. Clima e fenologia do cafeeiro. In: \_\_\_\_\_. **Cultura de café no Brasil: manual de recomendações**. 5. ed. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro do Café, Ministério da Indústria e Comércio, 1985. p. 19-50.

CAMARGO, A. P.; SALATI, E. Determinação da temperatura letal de folhagem de cafeeiro em noite de geada. **Bragantia**, Campinas, v. 25, p. 61-63, 1966.

CAMARGO, M. B. P. The impact of climatic variability and climate change on arabic coffee crop in Brazil. **Bragantia**, Campinas, v. 69, p. 239-247, 2010.

CAMPOS, R. da S. et al. Fungos micotoxigênicos e ocratoxina A em cafés com permanência prolongada na planta e no solo, colhidos nas regiões do cerrado mineiro e baiano. **Coffee Science**, Lavras, v. 4, n. 2, p. 136-148, abr./jun. 2009.

CARAMORI, P. H.; MANETTI FILHO, J. **Proteção dos cafeeiros contra geadas**. Curitiba: IAPAR, 1993. 27 p. (Circular Técnico, 79).

CHALFOUN, S. M.; BATISTA, L. R. **Fungos associados a frutos e grãos do café *Aspergillus & Penicillium***. Brasília: EMBRAPA Informação Tecnológica, 2003. 69 p.

CHALFOUN, S. M.; BATISTA, L. R. Incidência de Ocratoxina A em diferentes frações de grãos de café (*Coffea arabica* L.). **Coffee Science**, Lavras, v. 1, n. 1, p. 28-35, jan./mar. 2006.

CHALFOUN, S. M.; PARIZZI, F. C. Fungos toxigênicos e micotoxinas em café. In: BORÉM, F. M. (Ed.). **Pós-colheita do café**. Lavras: UFLA, 2008. p. 512-543.

CHAVES FILHO, J. T.; OLIVEIRA, R. F. Variação sazonal do amido armazenado em ramos plagiotrópicos do cafeeiro. **Estudos**, Goiânia, v. 35, n. 1/2, p. 85-102, 2008.

COAKLEY, S. M.; SCHERM, H.; CHAKRABORTY, S. Climate change and plant disease management. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 37, p. 399-426, 1999.

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

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Primeiro levantamento café safra 2015**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 24 ago. 2015.

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

DACHOUPAKAN, C. et al. Study of the phenotypic and genotypic biodiversity of potentially ochratoxigenic black aspergilli isolated from grapes. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 132, n. 1, p. 14-23, Jan. 2009.

DAMATTA, F. M. Ecophysiological constraints on the production of shaded and unshaded coffee: a review. **Field Crops Research**, Wageningen, v. 86, n. 1/2, p. 99-114, Mar. 2004.

DESPREZ-LOUSTAU, M. L. et al. Simulating the effects of a climate-change scenario on the geographical range and activity of forest-pathogenic fungi. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v. 29, n. 2, p. 101-120, Apr. 2007.

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

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

EDWARDS, S. G.; O'CALLAGHAN, J.; DOBSON, A. D. W. PCR-based detection and quantification of mycotoxigenic fungi. **Mycological Research**, London, v. 106, n. 9, p. 1005-1025, Sept. 2002.

ESTEBAN, A. et al. Effect of water activity on ochratoxin A production by *Aspergillus niger* aggregate species. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 108, n. 2, p. 188-195, Apr. 2006.

ESTEBAN, A. et al. Study of the effect of water activity and temperature on ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius*. **Food Microbiology**, London, v. 23, n. 7, p. 634- 640, Oct. 2006.

FAGNANI, M. A. **Características micrometeorológicas observadas em cafeeiros em noites sujeitas a geada de irradiação**. 1985. 113 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1985.

FELS-KLERX, H. J. van der et al. Development of a European system for identification of emerging mycotoxins in wheat supply chains. **World Mycotoxin Journal**, Wageningen, v. 2, n. 2, p. 119-127, Apr. 2009.

FIORAVANTI, C. Especialistas prevêem queda na produção e emergência de novas doenças e pragas em consequência das mudanças do clima. **Revista FAPESP**, São Paulo, v. 198, n. 8, p. 41-44, 2012.

FRISVAD, J. C.; THRANE, U.; SAMSON, R. A. Mycotoxin producers. In: DIJKSTERHUIS, J.; SAMSON, R. A. (Ed.). **Food mycology: a multifaceted approach to fungi and food**. Boca Raton: CRC, 2007. p. 135-159. (Mycology Series, 25).

FUJII, S. et al. A comparison between enzyme immunoassay and HPLC for Ochratoxin A detection in green, roasted and instant coffee. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 50, n. 2, p. 349-359, Mar. 2007.

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

GELLI, D. S. et al. Aplicação dos princípios do sistema HACCP/APPCC para identificação e controle de fatores que favorecem a produção de ocratoxina em café das regiões Sul e Sudeste do Brasil, São Paulo, Rio de Janeiro e Paraná. In: **SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL**, 2., 2001, Vitória. **Anais...** Brasília: EMBRAPA Café, 2001. p. 724-730.

GILBERT, J.; ANKLAM, E. Validation of analytical methods for determining mycotoxins in foodstuffs. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 21, n. 6, p. 468-469, 2002.

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

GHALI, R. et al. CLAE determination of ochratoxin A in high consumption Tunisian foods. **Food Control**, Guildford, v. 20, n. 8, p. 716-720, Aug. 2009.

INGRAM, D. S. Biodiversity, plant pathogens and conservation. **Plant Pathology**, Honolulu, v. 48, n. 4, p. 433-442, Aug. 1999.

INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE. **Climate change 2007**: synthesis report. 2007. Disponível em: <<http://www.ipcc.ch/ipccreports/ar4-syr.htm>>. Acesso em: 10 mar. 2015.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Ochratoxin A**: some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and micotoxins. Lyon, 1993. 452 p. (Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans, 56).

JARVIS, B. B.; MILLER, J. D. Mycotoxins as harmful indoor air contaminants. **Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 66, n. 4, p. 367-372, Nov. 2005.

KLICH, M. A. **Identification of common *Aspergillus* species**. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2002. 116 p.

LASRAM, S. et al. Water activity and temperature effects on fungal growth and Ochratoxin A production by ochratoxigenic *Aspergillus carbonarius* isolated from Tunisian grapes. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 75, n. 2, p. M89-M97, Apr. 2010.

LEONG, S. L. et al. Australian research on ochratoxigenic fungi and ochratoxin A. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 111, p. 10-17, Sept. 2006. Supplement 1.

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

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

LOBEAU, M. et al. Development of a new clean-up tandem assay column for the detection of ochratoxin A in roasted coffee. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 538, n. 1/2, p. 57-61, May 2005.

MAGNANI, M. et al. Molecular Identification of *Aspergillus* spp. isolated from coffee beans. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 62, n. 1, p. 45-49, Jan. 2005.

MARIN, F. Z. La ocratoxina A: un problema emergente. **Enólogos**, Madrid, v. 34, p. 21-24, 2005.

MARTINEZ, H. E. P.; TOMAZ, M. A.; SAKIYAMA, N. S. **Guia de acompanhamento das aulas de cafeicultura**. 2. ed. Viçosa, MG: UFV, 2007. 152 p.

MIRAGLIA, M. et al. Climate change and food safety: an emerging issue with special focus on Europe. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 47, n. 5, p. 1009-1021, May 2009.

MISKI, M.; DAVIS, P. J. Microbiologically catalyzed enantio- and diastereoselective oxidation of chrysanthemol stereoisomers to chrysanthemic acid. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 54, p. 2268-2272, Sept. 1988.

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

MORELLO, L. G. et al. Detection and quantification of *Aspergillus westerdijkiae* in coffee 102 beans based on selective amplification of beta-tubulin gene by using real-time PCR. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 119, n. 3, p. 270-276, Nov. 2007.

MOSS, M. O. The environmental factors controlling mycotoxin formation. In: SMITH, J. F.; HENDERSON, R. S. (Ed.). **Mycotoxins and animal foods**. Boca Raton: CRC, 1991. p. 37-56.

MOSS, M. O. Mode of formation of ochratoxin A. **Food Additives and Contaminantes**, London, v. 13, p. 5-9, 1996. Supplement.

NOGUEIRA, S.; OLIVEIRA, M. B. P. P. Prevalência de Ocratoxina A em alimentos e consequentes problemas de segurança alimentar. **Alimentação Humana**, Porto, v. 12, n. 2, p. 69-75, 2006.

NOONIM, P. et al. Two new species of *Aspergillus* section *Nigri* from Thai coffee beans. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 58, p. 1727-1734, July 2008.

O'CALLAGHAN, J.; STAPLETON, P. C.; DOBSON, A. D. W. Ochratoxin A biosynthetic genes in *Aspergillus ochraceus* are differentially regulated by pH and nutritional stimuli. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 43, n. 4, p. 213-221, Mar. 2006.

ORGANIZAÇÃO INTERNACIONAL DO CAFÉ. **Gestão estratégica**. Disponível em: <[http:// www.embrapa.br](http://www.embrapa.br)>. Acesso em: 24 ago. 2015.

PARK, K. J.; BIN, A.; BROD, F. P. R. Obtenção das isotermas de sorção e modelagem matemática para a pêra bartlett com ou sem desidratação osmótica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 21, n. 1, p. 73-77, jan./abr. 2001.

PASSAMANI, F. R. et al. Effect of temperature, water activity, and pH on growth and production of ochratoxin A by *Aspergillus niger* and *Aspergillus carbonarius* from Brazilian Grapes. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 77, n. 11, p. 1947-1952, Nov. 2014.

PATERSON, R. R. M.; LIMA, N. Further mycotoxin effects from climate change. **Food Research International**, Barking, v. 44, n. 9, p. 2555-2566, May 2011.

PERRONE, G. et al. *Aspergillus* in grapes: ecology, biodiversity and genomics. In: VARGA, J.; SAMSOM, R. (Ed.). **Aspergillus in the genomic era**. Wageningen: Wageningen Academic, 2008. p. 179-203.

PEZZOPANE, J. R. M. Consorciação-associação de culturas com o cafeeiro. In: TOMAZ, M. A. et al. **Seminário para a sustentabilidade da cafeicultura**. Alegre: UFES, 2008. p. 81-96.

PIMENTA, C. J.; VILELA, E. R. Composição microbiana ocratoxina A no café (*Coffea arabica* L.) submetido diferentes tempos de espera antes da secagem. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 6, p. 1315-1320, nov./dez. 2003.

PIMENTEL, C. Metabolismo de carbono de plantas cultivadas e o aumento de CO<sub>2</sub> e de O<sub>3</sub> atmosférico: situação e previsões. **Bragantia**, Campinas, v. 70, n. 1, p. 1-12, 2011.

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

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. 2<sup>nd</sup> ed. London: Blackie Academic & Professional, 1997. 593 p.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. 3<sup>rd</sup> ed. New York: Springer, 2009. 471 p.

RICHARD, J. L. Some major mycotoxins and their mycotoxicoses an overview. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 119, n. 1/2, p. 3-10, Oct. 2007.

SABBADINI, A. M. et al. Ocorrência de fungos toxicológicos em grãos coletados no município de campo mourão e a relação destes com o desenvolvimento de doenças. In: ENCONTRO INTERNACIONAL DE PRODUÇÃO CIENTÍFICA CESUMAR, 6., 2009, Maringá. **Anais...** Maringá: CESUMAR, 2009. Disponível em: <<http://www.cesumar.br/epcc2009/trabalhos.php>>. Acesso em: 10 fev. 2010.

SAMSON, R. A. et al. **Food and indoor Fungi**. Utrecht: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, 2010. 390 p.

SAMSON, R. A. et al. New Ochratoxin A or sclerotium producing species of *Aspergillus* section *Nigri*. **Studies in Mycology**, Berlin, v. 50, n. 1, p. 45-61, Jan. 2004.

SANT'ANA, A. S. Special issue on climate change and food science. **Food Research International**, Barking, v. 43, n. 7, p. 1727-1728, 2010.

SARTORI, D. et al. PCR methods for the detection of ochratoxin producing fungal species in coffee beans. **Research in Microbiology**, Paris, v. 157, n. 4, p. 350-354, May 2006.

SEGGES, J. H. **Focalizando o café e a qualidade**. Seropédica: UFRRJ, 2001. 126 p.

SENTELHAS, P. C.; FAZUOLI, L. C.; PEZZOPANE, J. R. M. Temperatura Letal de diferentes espécies e derivados híbridos interespecífico de café. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 21., 1995, Araxá. **Anais...** Rio de Janeiro: MARA, 1995. p. 156-157.

SERRA, R. M. A. **Micoflora das uvas portuguesas e seu potencial para a contaminação das uvas com micotoxinas, com destaque para a ocratoxina A**. 2005. 330 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química e Biológica) - Escola de Engenharia da Universidade do Minho, Lisboa, 2005.

SILVA, A. B. **Identificação de riscos e perigos no processo de torra e moagem de café visando a obtenção de produtos seguros e de qualidade**. 2008. 76 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

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

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

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

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

VARGA, J. et al. New and revisited species in *Aspergillus* section *Nigri*. **Studies in Mycology**, Berlin, v. 69, p. 1-17, June 2011.

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

VASANTHI, S.; BHAT, R. V. Mycotoxins in foods: occurrence, health & economic significance & food control measures. **Indian Journal Medical Research**, New Delhi, v. 108, n. 5, p. 212-224, Nov. 1998.

ZHANG, X. et al. Ochratoxin A induces apoptosis in neuronal cells. **Genes and Nutrition**, New York, v. 4, n. 1, p. 41-48, Jan. 2009.

## CAPÍTULO 2

### **Incidência de fungos do gênero *Aspergillus* Seção *Circumdati* e *Nigri* em grãos de café cultivados em duas regiões produtoras do estado de Minas Gerais**

#### **RESUMO**

A ocratoxina A (OTA) é considerada a principal micotoxina associada ao café, produzida, principalmente, por fungos do gênero *Aspergillus* Seções *Circumdati* e *Nigri*. Este estudo foi realizado com o objetivo de avaliar a incidência de fungos produtores de OTA pertencentes ao gênero *Aspergillus* Seção *Circumdati* e *Nigri* em grãos de café cultivados em duas regiões produtoras do estado de Minas Gerais. Foram analisadas 14 amostras de grãos de café arábica (*Coffea arabica* L.), sendo sete do sul de Minas e sete do Cerrado de Minas. O isolamento dos fungos *Aspergillus* Seção *Circumdati* e *Nigri* foi realizado pela técnica de plaqueamento direto em meio dicloran rosa de bengala cloranfenicol (DRBC). A identificação foi realizada com base nas características morfológicas. A quantificação de OTA dos isolados foi realizada por CLAE. Foram isolados e identificados 90 fungos do gênero *Aspergillus* Seção *Circumdati* e *Nigri*, dos quais 82% eram pertencentes à Seção *Nigri* e 18% pertencentes à Seção *Circumdati*. A porcentagem de contaminação dos grãos de café cultivados na região Sul de Minas foi de 65,5%. As amostras do Cerrado Mineiro não apresentaram elevada contaminação fúngica, tendo a porcentagem de contaminação dos grãos de café nesta região sido de 34,5%, todos da Seção *Nigri*. A espécie encontrada com maior frequência nas duas regiões avaliadas foi *A. niger*. Neste estudo, 43,24% dos isolados pertencentes à Seção *Nigri* foram produtores de OTA e, destes, 84% foram *A. niger* e 16%, *A. carbonarius*. Dos isolados pertencentes ao gênero *Aspergillus* Seção *Circumdati*, 81,25% foram produtores de OTA, sendo 69% *A. ochraceus* e 31% *A. ostianus*. Embora, neste estudo, os isolados de *A. niger* tenham sido encontrados com maior frequência, a média da concentração de OTA produzida por estes fungos (0,72 µg OTA/g) foi bem menor, quando comparada com a média da concentração de OTA produzida por *A. ochraceus* (31,2 µg OTA/g). A presença de fungos toxigênicos não indica, necessariamente, a presença de OTA, mas indica um risco em potencial. O conhecimento das espécies toxigênicas é essencial para a adoção de medidas de controle e a garantia de um produto seguro.

Palavras-chave: Fungos ocratoxigênicos. Grãos de café. Sul e Cerrado de Minas.

## ABSTRACT

Ochratoxin A (OTA) is considered the main mycotoxin associated with coffee, produced mainly by fungi of the genus *Aspergillus*, sections *Circumdati* and *Nigri*. This study was conducted to evaluate the fungi incidence of the genus *Aspergillus*, section *Circumdati* and *Nigri*, in coffee beans grown in two producing regions of Minas Gerais. It was analyzed 14 samples of Arabica coffee beans (*Coffea arabica* L.), seven of them being of the South of Minas and seven in the Cerrado region of Minas. The isolation of the fungi *Aspergillus*, Section *Circumdati* and *Nigri*, was carried out by plating technique straight amid dichloran rose bengal chloramphenicol (DRBC). The identification was based on morphological characteristics. The OTA quantification of the isolates was performed by HPLC. Ninety (90) fungi of the genus *Aspergillus* Section *Nigri* and *Circumdati* were isolated and identified, of which 82% were owned by section *Nigri* and 18% belonging to Section *Circumdati*. The percentage of coffee beans contamination grown in the South of Minas was 65.5%. Samples of the Cerrado Mineiro have not elevated fungal contamination, and the percentage of coffee beans contamination in this region was 34.5%, all in Section *Nigri*. The species that were evaluated, the most often found in the two regions was *A. niger*. In this study, 43.24% of the isolates belonging to Section *Nigri* were OTA producers and, of these, 84% were *A. niger* and 16%, *A. carbonarius*. The isolates that were belonging to the genus *Aspergillus*, Section *Circumdati*, 81.25% were producers of OTA, of which 69% *A. ochraceus* and 31% *A. ostianus*. Although in this study, isolated from *A. niger* have been found most frequently, the average concentration of OTA produced by these fungi (0.72 µg OTA/g) was much lower compared with the average concentration of OTA produced by *A. ochraceus* (31.2 µg OTA/g). The presence of fungi toxigenic not necessarily indicate the presence of OTA, but indicates a potential risk. The knowledge of toxigenic species is essential for adopting measures to control and guarantee a safe product.

Keywords: Fungi ocratoxigenic. Coffee beans. South and Cerrado of Minas Gerais State - Brazil.

## 1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de infecções microbianas nos grãos de café pode comprometer tanto o seu aspecto visual quanto o sabor e o aroma (BATISTA et al., 2003). Entre os microrganismos associados aos frutos e aos grãos de café, os fungos filamentosos representam o grupo causador de maior dano, pois são produtores de micotoxinas.

Dentre essas toxinas, a que apresenta maior relevância para o café é a OTA. Este metabólito secundário tem ação nefrotóxica, teratogênica, carcinogênica, imunossupressora e está relacionado com a nefropatia endêmica dos Bálcãs, sendo classificada pela International Agency for Research on Cancer - (IARC, 1993), como possível carcinogênico renal humano (grupo 2B).

As principais espécies de fungos produtores de OTA em café são *A. ochraceus*, *A. carbonarius* e *A. niger* (GILBERT; ANKLAM, 2002; MORELLO et al., 2007).

Associada às condições ambientais, a produção de OTA pode acontecer no processamento pós-colheita, durante o transporte ou no armazenamento dos grãos. Os parâmetros macroclimáticos podem aumentar a umidade do ambiente afetando a composição química da mucilagem do café e, assim, influenciar a atividade microbiana (ALVES; VOLPATO; VIEIRA, 2011).

O café tem sido alvo de pesquisas que buscam verificar o potencial toxigênico de fungos e, principalmente, detectar a presença de OTA nos grãos. O conhecimento da distribuição de fungos toxigênicos na região de maior relevância para a produção de café do país é uma ferramenta importante para fornecer parâmetros de controle e prevenção contra a produção de micotoxinas. Nesse sentido, este estudo foi realizado com o objetivo de avaliar a incidência de fungos produtores de OTA pertencentes ao gênero *Aspergillus* Seção *Circumdati*

e *Nigri* em grãos de café cultivados em duas regiões produtoras do estado de Minas Gerais, Sul e Cerrado.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Área de estudo e amostragem**

As amostras de grãos de café utilizadas neste estudo foram obtidas em duas regiões produtoras do estado de Minas Gerais, Sul e Cerrado. Na região Sul foram coletadas amostras nos municípios de Lavras, Luminárias, Cana Verde, Itumirim, Varginha, Santo Antônio do Amparo e Perdões, e, na região do Cerrado, nos municípios de Araxá, Ibiá, Coromandel, Presidente Olegário, Patrocínio, Patos de Minas e Monte Carmelo.

Foram utilizados grãos de café (*Coffea arabica* L.) da safra 2014/2015, classificados como bebida dura, obtidos por meio de cooperativas agrícolas localizadas no Sul de Minas e Cerrado de Minas. Em cada região foram coletadas sete amostras, totalizando 14. Após a coleta, as amostras foram transportadas para o Laboratório de Micologia e Micotoxinas do Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras, para posteriores análises.

### **2.2 Avaliação do percentual de contaminação por fungos do gênero *Aspergillus* Seção *Circumdati* e *Nigri* em grãos de café cultivados em duas regiões de Minas Gerais**

De cada amostra de café foram selecionados 100 grãos, desinfetados superficialmente com álcool a 70% (1 minuto) e hipoclorito de sódio a 1% (30 segundos) e lavados com água destilada estéril por três vezes consecutivas, para a identificação dos fungos presentes no interior dos grãos, conforme descrito por Samson et al. (2000). Após a desinfecção, os grãos de café foram plaqueados em meio de cultura dicloran rosa bengal cloranfenicol (DRBC). As placas foram

incubadas, a 25 °C, por 7 dias, e os resultados foram expressos em porcentagem de grãos contaminados por fungos filamentosos, conforme Pitt e Hocking (1997). Somente as colônias com características morfológicas de *Aspergillus* Seção *Circumdati* e *Nigri* foram transferidas para meio de cultura ágar extrato de malte (MA), incubadas a 25 °C, por um período de sete dias.

### **2.3 Isolamento e identificação dos fungos**

A partir das culturas puras, os fungos foram incubados em meio ágar czapeck levedura (CYA), à temperatura de 25 °C e 37 °C, por sete dias e ágar extrato de malte (MEA), a 25 °C, por sete dias. Após o crescimento, foram observadas as características macroscópicas e microscópicas, descritas conforme Klich (2002) e Varga et al. (2011).

### **2.4 Avaliação da produção de OTA pelos *Aspergillus* Seção *Circumdati* e *Nigri***

Para a extração da OTA foi utilizado o método de Bragulat, Abarca e Cabanes (2001) modificado. De maneira sucinta, três plugs da colônia foram removidos da área interna, meio e borda de cada colônia no décimo dia do período de incubação. Esses plugs foram pesados e, depois, adicionado ao tubo 1 ml de metanol. Os tubos foram homogeneizados vigorosamente por 5 segundos e mantidos, a 25 °C, por 60 minutos. Os extratos foram filtrados em unidades filtrantes de PTFE (0.22 µm) (Millipore) e, então, analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), no Laboratório de Análises Físico-Químicas de Aguardente de Cana, no Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras.

O equipamento utilizado foi um cromatógrafo Shimadzu, equipado com duas bombas de alta pressão modelo SPD-M20A, degaseificador modelo DGU 20A3, interface modelo CBM-20<sup>a</sup>, injetor automático modelo SIL-10AF e detector de fluorescência RF-10 AXL ( $\lambda_{exc}$  330 nm;  $\lambda_{em}$  460 nm). Foram utilizadas as colunas Agilent-Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,6 x 250 mm, 5  $\mu$ m) conectadas a uma pré-coluna Agilent-Zorbax Eclipse XDB-C18 4-Pack (4,6 x 12,5 mm, 5  $\mu$ m). A eluição foi realizada em sistema isocrático de 35:35:29:1 (metanol:acetonitrila:água:ácido acético), com fluxo de 0,8 mL min<sup>-1</sup>. O volume injetado das amostras e do padrão foi de 20  $\mu$ L. O tempo de retenção médio foi de 11 $\pm$ 0,1 minutos. A quantificação da OTA nas amostras foi realizada por meio da construção de uma curva analítica obtida por regressão linear ( $y = 1,11756 \times 10^7 x + 2592,1485$ , em que  $y$  = área do pico e  $x$  = concentração de OTA), correlacionando a área do pico *versus* a concentração da respectiva solução padrão, tendo o coeficiente de determinação ( $r^2$ ) obtido sido de 0,9999. Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram de 0,0004 e 0,0016  $\mu$ g/g, respectivamente. A recuperação da OTA em meio de cultura CYA foi, em média, de 87% ( $n = 3$ ). Todas as amostras foram analisadas em duplicata, enquanto as soluções padrão de OTA foram injetadas em triplicata.

## 2.5 Análises estatísticas

As análises estatísticas para a incidência de fungos do gênero *Aspergillus* Seção *Circumdatti* e *Nigri*, em relação às regiões e aos municípios estudados, foram realizadas por meio de análise de variância (ANAVA). Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e comparados pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Percentual de contaminação por *Aspergillus* Seção *Circumdati* e *Nigri* em grãos de café cultivados em duas regiões de Minas Gerais

O percentual de contaminação dos grãos de café dos municípios que representam o Sul de Minas pode ser observado na Figura 1.

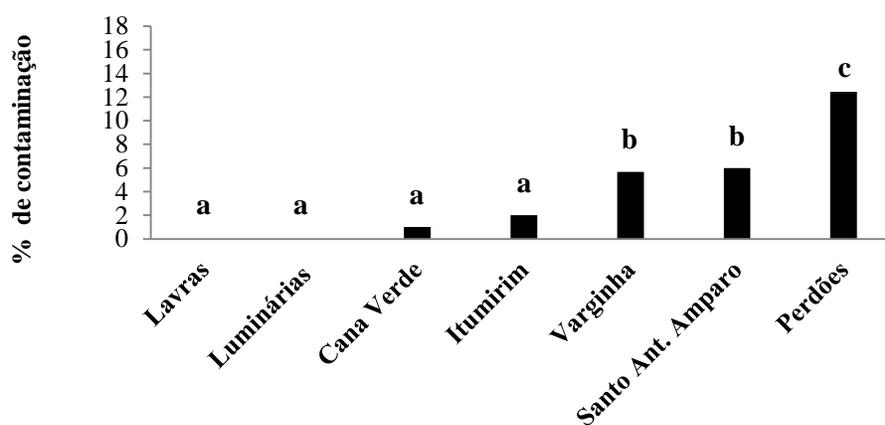


Figura 1 Porcentagem de contaminação por *Aspergillus* em grãos de café nas diferentes municípios do Sul de Minas. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade

Comparando-se os percentuais médios de contaminação por fungos nos grãos de café dos diferentes municípios do Sul de Minas, observa-se que Perdões foi o que apresentou maior percentual de contaminação (16%), seguido de Santo Antônio do Amparo (6%), Varginha (5,7%), Itumirim (2%) e Cana Verde (1%). Os grãos de café obtidos dos municípios de Lavras e Luminárias não apresentaram contaminação fúngica. Os municípios de Itumirim, Cana Verde, Luminárias e Lavras não apresentaram diferença estatística significativa

entre os percentuais de contaminação. Os municípios de Varginha e Santo Antônio do Amparo apresentaram valores de contaminação estatisticamente semelhantes.

Comparando-se os valores médios de contaminação por fungos nos grãos de café dos diferentes municípios do Cerrado de Minas (Figura 2), observa-se que Monte Carmelo foi o que apresentou maior percentual de contaminação (6,3%), seguido por Ibiá e Coromandel (1,3%), Presidente Olegário (1,0%), Patrocínio (0,67%) e Araxá (0,33%). Os municípios de Araxá, Ibiá, Coromandel, Presidente Olegário, Patrocínio e Patos de Minas não apresentaram diferença estatística significativa entre si. As amostras obtidas de Patos de Minas não apresentaram contaminação fúngica.

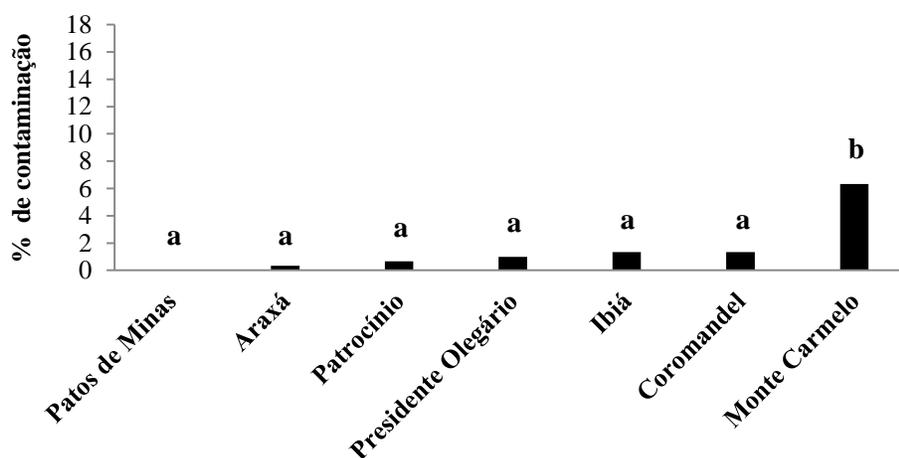


Figura 2 Porcentagem de contaminação por *Aspergillus* em grãos de café nos diferentes municípios do Cerrado de Minas. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade

Para Paterson e Lima (2010), a contaminação por fungos ocratoxigênicos em grãos de café ocorre na presença de condições específicas, como clima, susceptibilidade da planta, fatores intrínsecos e extrínsecos, o cultivo do produto, o manuseio, os nutrientes do substrato e a genética dos microrganismos. A maior incidência de contaminação em Perdões, provavelmente, não está associada a condições climáticas, uma vez que a cidade encontra-se na mesma localização que as demais estudadas do Sul de Minas e, assim, têm climas semelhantes. O mesmo pode-se dizer para a cidade de Monte Carmelo, na região do Cerrado de Minas.

Das amostras analisadas, foram isolados e identificados 90 fungos do gênero *Aspergillus* Seção *Circumdati* e *Nigri*, dos quais 82% pertencem à Seção *Nigri* e 18% à Seção *Circumdati*. Rezende et al. (2013), ao estudarem fungos ocratoxigênicos associados a grãos de café verde (*Coffea arabica* L.) em cultivo convencional e orgânico no Brasil, encontraram, no sistema de cultivo convencional, 31,87% dos grãos contaminados por fungos pertencentes à Seção *Nigri* e 28,10% pertencentes à Seção *Circumdati*. Pardo et al. (2004) encontraram 67,40% de grãos contaminados por *Aspergillus* Seção *Nigri*, os quais são mais resistentes aos raios solares por apresentarem esporos com pigmentação escura. Essa característica favorece sua permanência no ambiente e oferece vantagens para frente a seus competidores (NIELSEN et al., 2009; PITT; HOCKING, 2009). Em contrapartida, alguns autores, estudando fungos contaminantes em café, encontraram maior porcentagem de fungos contaminantes em grãos de café pertencentes à Seção *Circumdati* (BATISTA et al., 2009; REZENDE et al., 2013).

Os fungos isolados dos grãos de café do Sul de Minas foram identificados como *A. niger* (54%), *A. ochraceus* (20%), *A. ostianus* (7%), *A. tubingensis* (7%), *A. carbonarius* (7%), *A. foetidus* (3%) e *A. aculeatus* (2%)

(Figura 3). A espécie encontrada com maior frequência foi *A. niger*, seguida por *A. ochraceus*.

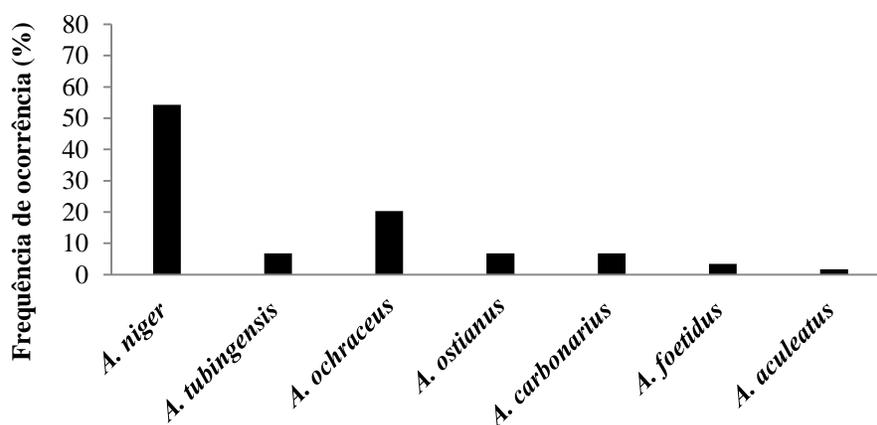


Figura 3 Frequência de ocorrência das espécies em relação ao total de *Aspergillus* Seção *Circumdati* e *Nigri* isolados de grãos de café no Sul de Minas

A porcentagem de contaminação dos grãos de café encontrada na região Sul de Minas foi de 65,5%, dos quais 73% eram pertencentes à Seção *Nigri* e 27% à Seção *Circumdati*. Resultados semelhantes foram encontrados por Chalfoun e Batista (2006) que, estudando a região do Sul de Minas, encontraram 33,33% dos grãos com pergaminho contaminados por fungos do gênero *Aspergillus* Seção *Circumdati* e 72,73% e 64,71% dos frutos das amostras de varrição e boia, respectivamente, contaminados por fungos da Seção *Nigri*. Os fungos isolados dos grãos de café do Cerrado de Minas foram identificados como *A. niger* (71%), *A. tubingensis* (13%), *A. foetidus* (10%), *A. aculeatus* (3%) e *A. carbonarius* (3%) (Figura 4). A espécie mais comum nesta região também foi *A. niger*, seguida por *A. tubingensis*. As amostras do Cerrado Mineiro não apresentaram elevada contaminação fúngica, sendo a porcentagem de contaminação dos grãos de café nesta região de 34,5%. Em estudos realizados

por Taniwaki et al. (2003), em amostras provenientes do Cerrado Mineiro, esta baixa contaminação fúngica também foi verificada. Os autores, estudando a incidência de isolados de *Aspergillus* spp. potencialmente ocratoxigênicos em diferentes regiões produtoras no Brasil (Alta Paulista, Sorocabana, Alta Mogiana e Cerrado Mineiro), encontraram baixos valores de contaminação fúngica (< 4%) para os cafés do Cerrado Mineiro.

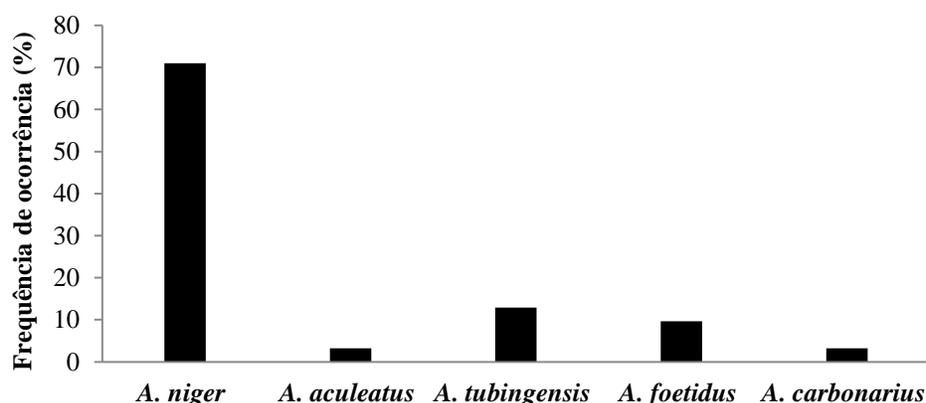


Figura 4 Frequência de ocorrência das espécies em relação ao total de *Aspergillus* Seção *Nigri* isolados de grãos de café no Cerrado de Minas

Todos os fungos isolados dos grãos de café do Cerrado de Minas foram da Seção *Nigri*. A região do Cerrado de Minas caracteriza-se por áreas de altiplano, com altitude que varia de 800 m a 1.250 m e temperatura entre 18 °C e 23 °C (INDICAÇÃO..., 2013); fungos da Seção *Circumdati* desenvolvem-se em temperatura entre 24-31 °C (PITT; HOCKING, 1997). Dessa forma, a região do Cerrado Mineiro tem ambiente menos favorável para o desenvolvimento de fungos da Seção *Circumdati*.

Por meio do teste Tukey, observou-se diferença significativa entre a incidência dos fungos do gênero *Aspergillus* Seção *Circumdati* e o número total

de isolados das regiões. Isto já era esperado, uma vez que no Cerrado de Minas não ocorreu contaminação por nenhum fungo pertencente à Seção *Circumdatti*. Para os fungos do gênero *Aspergillus* Seção *Nigri* não existe diferença significativa entre sua incidência e o número total de isolados das regiões (Tabela 1).

Tabela 1 Valores médios de isolados *A.circumdatti* e *A. nigri* em grãos de café de duas regiões de Minas Gerais

Regiões	<i>A. circumdatti</i>	<i>A. nigri</i>
Sul de Minas	6b	14,33a
Cerrado de Minas	0a	10,33a

\* Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si na coluna, pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade

A espécie encontrada com maior frequência nas duas regiões estudadas foi *A. niger*. Em alguns estudos há relatos de que *A. niger* é a espécie predominante em grãos de café contaminados (BOKHARI, 2007; ILIC et al., 2007; LEONG et al., 2007; TANIWAKI et al., 2003). *A. niger* é amplamente distribuído no ambiente, sendo contaminante de vários alimentos, não apenas de grãos de café (MAGNOLI et al., 2003; PERRONE et al., 2007; URBANO et al., 2001).

### 3.2 Potencial ocratoxigênico das espécies

Do total de fungos isolados (90), das duas regiões analisadas, 45 foram considerados produtores de OTA (Tabela 2). No Sul de Minas, 22 produtores pertencem à Seção *Nigri* e 13 à Seção *Circumdatti*. No Cerrado de Minas, 10

fungos da Seção *Nigri* foram considerados produtores de OTA; nesta região não foram isolados fungos da Seção *Circumdati*.

Neste estudo, 43,24% dos isolados pertencentes à Seção *Nigri* foram produtores de OTA. Outros autores encontraram proporções diferentes. Pardo et al. (2004), ao estudarem a ocorrência de fungos ocratoxigenicos em café verde, encontraram 7,3% dos isolados da Seção *Nigri* como produtores de OTA. Em estudos semelhantes realizados por Urbano et al. (2001), os autores encontraram 11,5% dos isolados da Seção *Nigri* como produtores de OTA.

Dos isolados produtores de OTA pertencentes à Seção *Nigri*, 84% foram *A. niger* e 16%, *A. carbonarius*. Estes resultados diferem dos relatados por Noonim et al. (2008) que encontraram apenas 13% dos isolados de *A. niger* como produtores de OTA. A maior contaminação por OTA e a alta porcentagem de *A. niger* produtor da toxina, quando comparadas aos dados de outros trabalhos, sugerem que ocorreram condições favoráveis para a produção da OTA (ASTORECA et al., 2009; BATISTA et al., 2009). Neste estudo ocorreu baixa contaminação por *A. carbonarius*, no entanto, todos os isolados foram produtores de OTA. Dentre as espécies de fungos do gênero *Aspergillus* seção *Nigri*, *A. carbonarius* é considerado um dos maiores produtores de OTA (NOOMIN et al., 2008; SERRA, 2005).

Dos isolados pertencentes ao gênero *Aspergillus* Seção *Circumdati*, 81,25% foram produtores de OTA, sendo 69% *A. ochraceus* e 31%, *A. ostianus*. A porcentagem de *A. ochraceus* produtores de OTA encontrada neste estudo foi semelhante à encontrada por Taniwaki et al. (2003), em cujo estudo 75% de *Aspergillus ochraceus* foram produtores de OTA. Rezende et al. (2013), encontraram 89,55% de *Aspergillus ochraceus* com capacidade de produzir OTA.

Embora, neste estudo, os isolados de *A. niger* tenham sido encontrados com maior frequência, a média da concentração de OTA produzida por estes

fungos (0,72 µg OTA/g) foi bem menor quando comparada com a média da concentração de OTA produzida por *A. ochraceus* (31,2 µg OTA/g). Entre os fungos do gênero *Aspergillus* da Seção *Circumdati*, *A. ochraceus* é o maior produtor de OTA em café (BATISTA et al., 2009; ESPADALÉ; LAMPURLANÉS; AUBERT, 2008).

A produção de OTA por fungos do gênero *Aspergillus* é dependente da interação de vários fatores ambientais. A incapacidade de produzir OTA em uma determinada condição não justifica qualquer conclusão sobre a habilidade geral para a produção da micotoxina (MÜHLENCOERT et al., 2004).

Tabela 2 Valores médios das concentrações de OTA dos isolados

Espécies	Nº de isolados Sul de Minas	Média da concentração de OTA (µg/g)	Nº de isolados Cerrado de Minas	Média da concentração de OTA (µg/g)
<b>Seção Nigri</b>				
<i>A. niger</i>	32 (18)	0,03	22 (9)	0,69
<i>A. tubingensis</i>	04 (0)	ND	04 (0)	ND
<i>A. carbonarius</i>	04 (4)	7,62	01 (1)	5,75
<i>A. foetidus</i>	02 (0)	ND	03 (0)	ND
<i>A. aculeatus</i>	01 (0)	ND	01 (0)	ND
Nº total de isolados	43 (22)		31 (10)	
<b>Seção Circumdati</b>				
<i>A. ochraceus</i>	12 (9)	31,20	A	-
<i>A. ostianus</i>	04 (4)	4,42	A	-
Nº total de isolados	16 (13)			

( ) Nº de isolados produtores de OTA

ND - Não detectável

A - Ausência

#### 4 CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo demonstraram que os cafés cultivados nas duas regiões estudadas (Sul de Minas e Cerrado de Minas) apresentaram baixa contaminação fúngica, o que pode estar associado às boas práticas aplicadas durante a colheita e o processamento do café.

As amostras da região do Sul de Minas apresentaram maior porcentagem de contaminação, quanto comparadas com as amostras do Cerrado de Minas. Os valores médios de contaminação dos grãos de café dos diferentes municípios do Sul de Minas indicaram que Perdões foi a cidade com maior incidência de contaminação por fungos do gênero *Aspergillus*. Na região do Cerrado de Minas o município com maior contaminação por fungos do gênero *Aspergillus* foi Monte Carmelo.

Os isolados de *A. niger* foram os maiores produtores de OTA, embora a média da concentração de OTA produzida por estes fungos tenha sido bem menor quando comparada com a média da concentração de OTA produzida por *A. ochraceus*.

Assim, este estudo demonstra-se que as características climáticas de uma determinada região influencia a presença de fungos do gênero *Aspergillus*. A presença de fungos toxigênicos não indica, necessariamente, a presença de OTA, mas indica um risco em potencial. O conhecimento das espécies toxigênicas é essencial para a adoção de medidas de controle e garantir um produto seguro.

## REFERÊNCIAS

ALVES, H. M. R.; VOLPATO, M. M. L.; VIEIRA, T. G. C. Características ambientais e qualidade da bebida dos cafés do Estado de Minas Gerais. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 32, n. 261, p. 18-29, abr. 2011.

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

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

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

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

BRAGULAT, R.; ABARCA, L.; CABANES, J. An easy screening method for fungi producing ochratoxin A in pure culture. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 71, n. 2/3, p. 139-144, Dec. 2001.

CHALFOUN, S. M.; BATISTA, L. R. Incidência de Ocratoxina A em diferentes frações de grãos de café (*Coffea arabica* L.). **Coffee Science**, Lavras, v. 1, n. 1, p. 28-35, jan./mar. 2006.

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

GILBERT, J.; ANKLAM, E. Validation of analytical methods for determining mycotoxins in foodstuffs. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 21, n. 6, p. 468-469, 2002.

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

INDICAÇÃO geográfica café da região do cerrado mineiro. **Revista A Lavoura**, Rio de Janeiro, n. 699, 2013. Disponível em: <<http://sna.agr.br>>. Acesso em: 15 out. 2015.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Ochratoxin A**: some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and micotoxins. Lyon, 1993. 452 p. (Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans, 56).

KLICH, M. A. **Identification of common *Aspergillus* species**. Wageningen: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2002. 116 p.

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

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

MORELLO, L. G. et al. Detection and quantification of *Aspergillus westerdijkiae* in coffee 102 beans based on selective amplification of beta-tubulin gene by using real-time PCR. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 119, n. 3, p. 270-276, Nov. 2007.

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

NIELSEN, K. F. et al. Review of secondary metabolites and mycotoxins from the *Aspergillus niger* group. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 395, n. 5, p. 1225-1242, Nov. 2009.

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

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

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

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

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. 2<sup>nd</sup> ed. London: Blackie Academic & Professional, 1997. 593 p.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. 3<sup>rd</sup> ed. Dordrecht: Springer, 2009. 503 p.

REZENDE, E. F. et al. Fungos ocratoxigênicas associados com grãos de café verde (*Coffea arabica* L.) em cultivo convencional e orgânica no Brasil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 44, n. 2, p. 1517-8382, 2013.

SAMSON, R. A. et al. **Introduction to food and airborne fungi**. 4<sup>th</sup> ed. Wageningen: Centraalbureau Voor Schimmelcultures Baarn Delft, 2000. 260 p.

SERRA, R. M. A. **Micoflora das uvas portuguesas e seu potencial para a contaminação das uvas com micotoxinas, com destaque para a ocratoxina A**. 2005. 330 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química e Biológica) - Escola de Engenharia da Universidade do Minho, Lisboa, 2005.

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

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

VARGA, J. et al. New and revisited species in *Aspergillus* section *Nigri*. **Studies in Mycology**, Berlin, v. 69, n. 1, p. 1-17, June 2011.

### CAPÍTULO 3

#### **Influência *in vitro* de fatores abióticos no crescimento e na biossíntese de Ocratoxina A por *Aspergillus carbonarius* e *Aspergillus ochraceus* em meio de cultura sintético à base de café no estado de Minas Gerais**

#### **RESUMO**

O desenvolvimento e a biossíntese de OTA por fungos toxigênicos dependem de fatores climáticos, sendo a temperatura e a aw os que desempenham o papel mais importante. Estes fatores estão relacionados ao crescimento microbiológico, além de terem a capacidade de influenciar a expressão dos genes envolvidos na biossíntese de micotoxinas. Este estudo foi realizado com o objetivo de avaliar a influência *in vitro* da temperatura e aw no crescimento e na biossíntese de OTA por *Aspergillus carbonarius* e *Aspergillus ochraceus* em meio de cultura sintético à base de café. Para avaliar o efeito de fatores abióticos no crescimento desses fungos e na biossíntese da OTA, em condições *in vitro*, foi utilizado, como ferramenta, um delineamento central composto. Os isolados produtores de OTA foram cultivados em meio de cultura sintético à base de café com diferentes atividades de água (0,99, 0,98; 0,95; 0,92 e 0,91) e incubados em diferentes temperaturas (17 °C, 20 °C, 27,5 °C, 35 °C e 38 °C). Os isolados de *A. carbonarius* CCDCA10288 e CCDCA10293 apresentaram o maior crescimento nos intervalos de aw entre 0,935 a 0,965 e temperatura entre 25 °C a 32 °C. Do mesmo modo, as condições ótimas de crescimento para os isolados de *A. ochraceus* CCDCA10211 e CCDCA10212 ocorreram nos intervalos de aw entre 0,940 a 0,990 e temperatura entre 21 °C a 30 °C. A maior quantidade de OTA produzida por *A. carbonarius* CCDCA10288 e CCDCA10293 (19,7 e 15,7 µg/g respectivamente) foi obtida em aw de 0,99 e temperatura entre 15 °C a 25 °C. Verificou-se uma tendência para maior produção de OTA por *A. ochraceus* CCDCA10211 e CCDCA10212 (8, 9 e 7,9 µg/g respectivamente) em aw entre 0,98 a 0,99 e temperatura entre 25 °C a 35 °C e 22 °C a 32 °C, respectivamente. O efeito da temperatura e da aw sobre a produção de OTA é compreendido mais facilmente quando ocorrem o agrupamento de dados e o desenvolvimento de modelos que simulam cenários climáticos, proporcionando estratégias de adaptação.

Palavras-chave: Temperatura. Atividade de água. Fungos toxigênicos. Ocratoxina A.

## ABSTRACT

The OTA development and biosynthesis by toxigenic fungi depend on climatic factors, the temperature and  $a_w$  those who play the most important role. These factors are relate to microbiological growth, and have the ability to influence the expression of genes involved in the biosynthesis of mycotoxins. This study was conducted to evaluate the *in vitro* influence of temperature and  $a_w$  growth and OTA biosynthesis by *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus ochraceus* in synthetic culture coffee base. To evaluate the effect of abiotic factors in the growth of these fungi and in the OTA biosynthesis *in vitro* conditions, it was used as a tool, a central composite design. The isolates producers of OTA were cultivated on synthetic culture coffee base with different water activity (0.99, 0.98, 0.95, 0.92 and 0.91) and incubated at different temperatures (17 ° C 20 ° C, 27.5 ° C, 35 ° C and 38 ° C). The isolates of *A. carbonarius* CCDCA10288 and CCDCA10293 showed the largest increase in  $a_w$  ranges from 0.935 to 0.965, and temperatures between 25 ° C to 32 ° C. Similarly, the optimum growth conditions for the isolates of *A. ochraceus* CCDCA10211 and CCDCA10212 occurred in the  $a_w$  intervals between 0.940 to 0.990, and temperatures between 21 ° C to 30 ° C. The biggest amount of OTA produced by *A. carbonarius* CCDCA10288 and CCDCA10293 (19.7 and 15.7 µg/g, respectively) was obtained at  $a_w$  0.99 and temperature of 15 ° C to 25 ° C. There was a trend for increased OTA production by *A. ochraceus* CCDCA10211 and CCDCA10212 (8.9-7,9 µg/ g, respectively) in  $a_w$  of 0.98 to 0.99, and temperatures between 25 ° C to 35 ° C and 22 ° C to 32 ° C, respectively. The temperature and  $a_w$  affect on the production of OTA is understood more easily when occur the information grouping and the development of models that simulate weather scenarios, providing adaptation strategies.

Keywords: Temperature. Water activity. Toxigenic fungi. Ochratoxin A.

## 1 INTRODUÇÃO

As micotoxinas são compostos químicos tóxicos produzidos por fungos filamentosos, prejudiciais aos seres humanos e animais. Os efeitos tóxicos da OTA parecem estar relacionados à sua capacidade de inibir a síntese proteica, competindo com a fenilalanina na reação catalisada pela fenilalanil-tRNA sintetase e outros sistemas que exigem esse aminoácido, e aumenta a peroxidação lipídica, levando a um maior dano celular e mitocondrial (DIRHEIMER, 1996; TURNER; SUBRAHMANYAM, 2009). Esse metabólito secundário pode ter efeito teratogênico, nefrotóxico, imunossupressor e possível carcinogênico, classificado no grupo 2B (DACHOUPAKAN et al., 2009; INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER - IARC, 1993).

A OTA pode ser encontrada em muitos alimentos, como cereais (trigo, aveia, cevada, milho), vinho, suco de uva, cerveja, frutas secas (passas), soja, cacau, chá, temperos, café (verde, torrado e instantâneo) e produtos de origem animal (ALMEIDA et al., 2007; FUJII et al., 2007). A União Europeia estabeleceu limites de 5 µg/kg para a concentração de OTA em café torrado e 10 µg/kg em café solúvel. Certos países impuseram limites também para café verde de 8-20 µg/kg (LEONG et al., 2006). No Brasil, a concentração de OTA em café torrado e solúvel é de 10 µg/kg, estabelecida pela Resolução- RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011 (BRASIL, 2011).

O desenvolvimento e a biossíntese de OTA por fungos toxigênicos dependem de fatores climáticos, sendo a temperatura e a aw os que desempenham o papel mais importante. Estes fatores estão relacionados ao crescimento microbiológico (PARK; BIN; BROD, 2001), além de terem a capacidade de influenciar a expressão dos genes envolvidos na biossíntese de micotoxinas (O'CALLAGHAN; STAPLETON; DOBSON, 2006). O efeito

desses fatores sobre a produção de micotoxinas é compreendido mais facilmente quando ocorre o agrupamento de dados e desenvolvem-se modelos que simulem cenários climáticos, proporcionando estratégias de adaptação (FELS-KLERX et al., 2009; MIRAGLIA et al., 2009).

Nesse sentido, este estudo foi realizado com o objetivo de avaliar a influência *in vitro* da temperatura e da atividade de água no crescimento e na biossíntese de OTA por *Aspergillus carbonarius* e *Aspergillus ochraceus* em meio de cultura sintético à base de café.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Obtenção dos isolados

Foram selecionados quatro isolados produtores de OTA, obtidos de amostras de café proveniente de regiões cafeeiras de Minas Gerais. Foram utilizados dois *Aspergillus carbonarius* CCDCA10288 e CCDCA10293 e dois *Aspergillus ochraceus* CCDCA10211 e CCDCA10212, pertencentes à coleção de cultura de microrganismos do Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras.

### 2.2 Reativação dos isolados e avaliação do potencial ocratoxigênico

Os isolados foram reativados em meio malt ágar (MA) (extrato de malte) e incubados, a 25 °C, por sete dias. Para a avaliação do potencial ocratoxigênico, os isolados da Seção *Circumdati* foram inoculados em meio ágar sacarose extrato de levedura (YES) e os da Seção *Nigri*, em meio ágar czapeck levedura (CYA), a 25 °C, por sete dias, conforme Filtenborg e Frisvad (1980). Em seguida, um disco da colônia pura de cada isolado foi colocado em pontos equidistantes da placa de cromatografia de camada delgada. Foram utilizados 10 µL de solução padrão de OTA (Sigma-Aldrich), adicionados em um ponto pré-determinado da placa de cromatografia. A fase móvel foi composta por tolueno, acetato de etila e ácido fórmico 90% (60:30:10). Após a eluição, a placa foi colocada para secar em capela de fluxo laminar. A confirmação quanto à produção das micotoxinas foi feita sob luz ultravioleta de  $\lambda$  366 nm em cromatovisor Camag (UF-Betrachter). Os isolados considerados produtores de OTA apresentaram um fator de retenção (RF) e um spot de fluorescência semelhantes ao do padrão da micotoxina.

### 2.3 Delineamento experimental

Foi utilizado o delineamento central composto rotacional (DCCR) como ferramenta para avaliar o efeito dos fatores abióticos no crescimento e na biossíntese de OTA dos isolados. Os resultados foram analisados por meio de superfície de resposta. Foram estudadas duas variáveis em cinco níveis (Tabela 1). As variáveis independentes avaliadas foram temperatura e atividade de água. Como variável resposta ou dependente foram determinados o crescimento do fungo (mm) e a produção de OTA ( $\mu\text{g/g}$ ).

Tabela 1 Variáveis experimentais com valores reais e codificados.

Variáveis		-1,68	-1	0	1	1,68
Temperatura	X1	17	20	27,5	35	38
aw	X2	0,91	0,92	0,95	0,98	0,99

Tabela 2 Matriz do delineamento experimental

Ensaio	Temperatura	a <sub>w</sub>
T1	20	0,92
T2	20	0,98
T3	35	0,92
T4	35	0,98
T5	17	0,95
T6	38	0,95
T7	27,5	0,91
T8	27,5	0,99
T9	27,5	0,95
T10	27,5	0,95
T11	27,5	0,95

Esse planejamento constituiu-se de 11 ensaios (Tabela 2), sendo três repetições no ponto central (T9, T10, T11). Cada ensaio foi conduzido em triplicata para a variável resposta crescimento e em duplicata para a produção de OTA. A análise estatística dos resultados foi realizada por meio do programa computacional Chemoface versão 1.5.

#### **2.4 Preparo do meio de cultura à base de café**

O meio de cultura à base de café foi preparado seguindo a metodologia de Pardo et al. (2005). Colocaram-se 175 g de café verde moído em um pano limpo em forma de saco, mergulhando-se em 1 L de água destilada fervente e cozido em fogo brando por 60 minutos, sempre completando o volume de água quando necessário. O líquido foi filtrado em gaze hidrofílica e adicionados 20 g de ágar (Merck).

A atividade de água do meio sintético de café foi de 0,99, sendo ajustada para 0,98; 0,95; 0,92 e 0,91, adicionando-se diferentes quantidades de glicerol conforme Bellí et al. (2004). A atividade de água do meio de cultura foi verificada com o auxílio de um Aqua-lab CX-2 (DECAGON DEVICES, inc.).

#### **2.5 Inoculação dos esporos**

A suspensão de esporos foi preparada em água destilada estéril contendo 0,5% de Tween 80. A câmara de Neubauer foi utilizada para a determinação da concentração final de esporos de  $10^6$  esporos/mL. O cálculo do fator de conversão para conídios/mL foi realizado segundo Alves e Moraes (1998).

Foram vertidos 20 mL do meio de café em placas de Petri. Em seguida, foi inoculada uma alíquota de 0,1mL de suspensão de esporos do isolado no

centro das placas, sendo incubadas nas temperaturas de 17 °C, 20 °C, 27,5 °C, 35 °C e 38 °C, segundo o delineamento experimental utilizado.

## **2.6 Avaliação do crescimento de *Aspergillus carbonarius* e *Aspergillus ochraceus***

As placas de Petri foram examinadas no 10° dia de incubação e o diâmetro da colônia foi medido em duas direções perpendiculares, com o auxílio de um paquímetro digital.

## **2.7 Extração e quantificação de OTA**

A OTA foi extraída de acordo com o método de Bragulat, Abarca e Cabanes (2001) modificado. De maneira sucinta, três plugs da colônia foram removidos da área interna, meio e borda de cada colônia, no 10° dia do período de incubação. Esses plugs foram pesados e, depois, foi adicionado ao tubo 1 ml de metanol. Os tubos foram homogeneizados vigorosamente por 5 segundos e mantidos, a 25 °C, por 60 minutos. Os extratos foram filtrados em unidades filtrantes de PTFE (0,22 µm) (Millipore) e, então, analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) no Laboratório de Análises Físico-Químicas de Aguardente de Cana, no Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras.

O equipamento utilizado foi um CLAE Shimadzu, equipado com duas bombas de alta pressão modelo SPD-M20A, degaseificador modelo DGU 20A3, interface modelo CBM-20<sup>a</sup>, injetor automático modelo SIL-10AF e detector de fluorescência RF-10 AXL ( $\lambda_{exc}$  330 nm;  $\lambda_{em}$  460 nm). Foram utilizadas as colunas Agilent-Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,6 x 250 mm, 5 µm) conectadas a uma pré-coluna Agilent-Zorbax Eclipse XDB-C18 4-Pack (4,6 x 12,5 mm, 5

$\mu\text{m}$ ). A eluição foi realizada em sistema isocrático de 35:35:29:1 (metanol:acetonitrila:água:ácido acético), com fluxo de  $0,8 \text{ mL min}^{-1}$ . O volume injetado das amostras e do padrão foi de  $20 \mu\text{L}$ . O tempo de retenção médio foi de  $11 \pm 0,1$  minutos. A quantificação da OTA nas amostras foi realizada por meio da construção de uma curva analítica obtida por regressão linear ( $y = 1,11756 \times 10^7 x + 2592,1485$ , em que  $y = \text{área do pico}$  e  $x = \text{concentração de OTA}$ ), correlacionando a área do pico *versus* a concentração da respectiva solução padrão, tendo o coeficiente de determinação ( $r^2$ ) obtido sido de 0,9999. Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram de 0,0004 e 0,0016  $\mu\text{g/g}$ , respectivamente. A recuperação da OTA em meio de cultura CYA foi, em média, de 87% ( $n = 3$ ). Todas as amostras foram analisadas em duplicata, enquanto as soluções padrão de OTA foram injetadas em triplicata.

### **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1 Avaliação do crescimento de *Aspergillus carbonarius* e *Aspergillus ochraceus* em diferentes temperaturas e atividades de água**

Nas Tabelas 3 e 4 estão descritos as matrizes do delineamento e os valores obtidos nos ensaios de avaliação do crescimento de *Aspergillus carbonarius* CCDCA10288 e CCDCA10293 e *Aspergillus ochraceus* CCDCA10211 e CCDCA10212, após 10 dias de crescimento. Foram observadas diferenças no nível de crescimento dos isolados nos diferentes tratamentos, devido às alterações das variáveis independentes avaliadas, temperatura e atividade de água.

Por meio dos resultados obtidos foi possível determinar os coeficientes de regressão e ajustar um modelo quadrático que relaciona a temperatura e a atividade de água do meio de cultura sintético à base de café, com o crescimento dos isolados estudados.

Tabela 3 Matriz do delineamento e valores obtidos nos ensaios de avaliação do crescimento de *Aspergillus carbonarius* CCDCA10288 e CCDCA10293

Ensaio	Temperatura (°C)	Aw	Crescimento CCDCA10288 (mm)	Crescimento CCDCA10293 (mm)
T1	20	0,92	9,64	9,95
T2	20	0,98	31,78	32,60
T3	35	0,92	34,95	36,54
T4	35	0,98	40,00	39,92
T5	17	0,95	25,00	26,11
T6	38	0,95	53,70	50,08
T7	27,5	0,91	51,44	50,65
T8	27,5	0,99	49,98	47,68
T9	27,5	0,95	87,50	87,37
T10	27,5	0,95	87,67	87,50
T11	27,5	0,95	87,40	87,73

Tabela 4 Matriz do delineamento e valores obtidos nos ensaios de avaliação do crescimento de *Aspergillus ochraceus* CCDCA10211 e CCDCA10212

Ensaio	Temperatura (°C)	Aw	Crescimento CCDCA10211 (mm)	Crescimento CCDCA10212 (mm)
T1	20	0,92	25,19	24,82
T2	20	0,98	75,08	72,77
T3	35	0,92	26,80	19,78
T4	35	0,98	38,89	36,98
T5	17	0,95	32,15	36,68
T6	38	0,95	0,00	0,00
T7	27,5	0,91	43,24	40,17
T8	27,5	0,99	65,34	64,32
T9	27,5	0,95	87,40	87,42
T10	27,5	0,95	87,59	87,60
T11	27,5	0,95	87,76	87,75

Na Tabela 5 encontram-se os modelos obtidos e o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) para o crescimento dos isolados. A porcentagem de variância explicada ( $R^2$ ) pelos modelos foi satisfatória para todas as respostas estudadas. A

partir destes modelos foram construídas as curvas de contorno para a visualização das condições mais adequadas de temperatura e atividade de água, que resultaram em um melhor crescimento dos isolados.

Tabela 5 Modelos preditos para o crescimento dos isolados avaliados (mm)

Fungos	Modelo Predito	R <sup>2</sup>
<i>A. carbonarius</i> CCDCA10288 (mm)	Cres = $-1,90 + 47,23T - 0,51T^2 + 3,89aw - 2,02aw^2 - 18,98Taw$	0,84
<i>A. carbonarius</i> CCDCA10293 (mm)	Cres = $-1,94 + 49,55T - 0,51T^2 + 3,96aw - 2,05aw^2 - 24,41Taw$	0,86
<i>A. ochraceus</i> CCDCA10211 (mm)	Cres = $-1,36 + 72,71T - 0,62T^2 + 2,65aw - 1,32aw^2 - 42,00Taw$	0,96
<i>A. ochraceus</i> CCDCA10212 (mm)	Cres = $-1,49 + 64,71T - 0,61T^2 + 2,93aw - 1,48aw^2 - 34,16Taw$	0,96

Os diagramas de Pareto (Figura 1) foram utilizados para avaliar a significância e o tipo de efeitos (sinérgico ou antagônico) sobre o crescimento dos isolados de *Aspergillus carbonarius* CCDCA10288 e CCDCA10293.

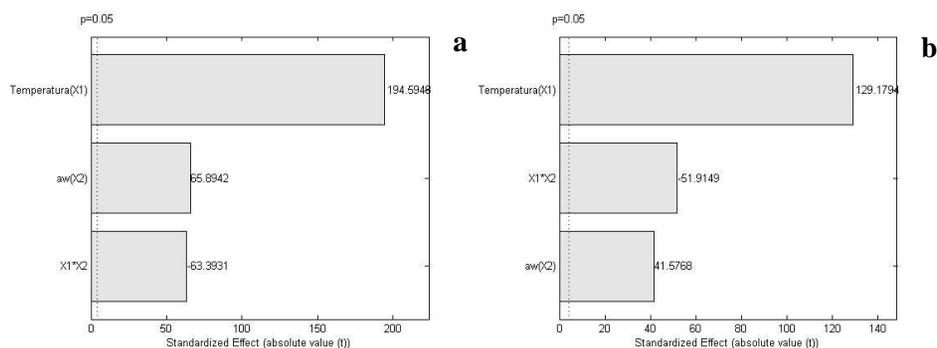


Figura 1 Diagrama de Pareto com efeito da temperatura (X1) e atividade de água (X2) sobre *Aspergillus carbonarius* CCDCA10288 (a) e *Aspergillus carbonarius* CCDCA10293 (b)

De acordo com as Figuras 1a e 1b, todas as variáveis e também suas interações foram significativas ( $p>0,05$ ) para o crescimento dos isolados. A variável que mais influenciou o crescimento dos isolados foi a temperatura, seguida da atividade de água, ambas com efeito sinérgico (positivo). Uma melhor interpretação das condições ótimas de crescimento é apresentada por meio das curvas de contorno (Figura 2).

De acordo com as curvas de contorno (Figuras 2a e 2b), observa-se que os isolados de *Aspergillus carbonarius* CCDCA10288 e CCDCA10293 apresentaram o maior crescimento (78 mm) nos mesmos intervalos de atividade de água entre 0,935 a 0,965 e temperatura entre 25 °C a 32 °C.

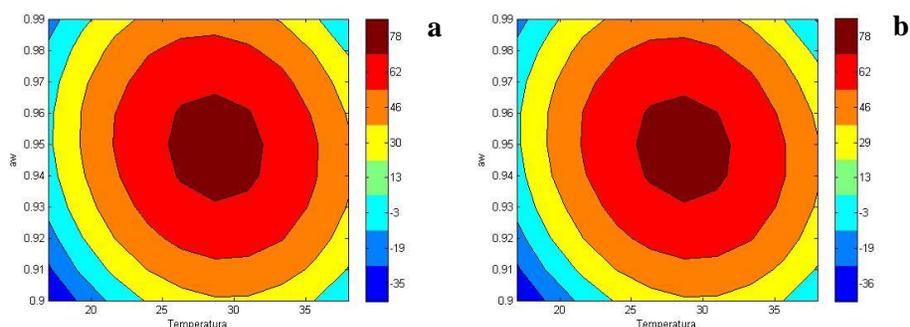


Figura 2 Curva de contorno para crescimento, em função das interações entre temperatura e atividade de água sobre *Aspergillus carbonarius* CCDCA10288 (a) e *Aspergillus carbonarius* CCDCA10293 (b)

Estes resultados demonstram a influência significativa da temperatura e da atividade de água sobre o crescimento dos isolados de *Aspergillus carbonarius*. Em geral, esses isolados crescem em temperaturas entre 15 °C e 42 °C, sendo a temperatura ótima para seu crescimento de 25 °C a 30 °C (LEONG; HOCKING; PITT, 2004; PERRONE et al., 2008) ou entre 25 °C e 35 °C, dependendo do isolado e do substrato utilizado para o crescimento (MITCHELL; ALDRED; MAGAN, 2003). Em relação à atividade de água, o intervalo ótimo de crescimento para *Aspergillus carbonarius*, geralmente,

encontra-se entre 0,95 e 0,99 (ALBORCH et al., 2011; BELLÍ et al., 2005; ROMERO et al., 2007).

Astoreca et al. (2007) avaliaram o efeito da atividade de água e da temperatura sobre o crescimento de *Aspergillus carbonarius* isolados de diferentes substratos na Argentina. O crescimento ótimo observado para o isolado foi à temperatura de 30 °C e atividade de água de 0,97. Passamani et al. (2014), estudando a influência da temperatura, da atividade de água e do pH no desenvolvimento e produção de OTA por *Aspergillus carbonarius* em meio de cultura semissintético de uva, verificaram que seu maior crescimento ocorreu à temperatura entre 20 °C a 33 °C e atividade de água entre 0,95 e 0,98. Chiotta et al. (2015) demonstraram que as condições ótimas para o crescimento de *Aspergillus carbonarius* foram 28 °C de temperatura e 0,98 de atividade de água. Souza et al. (2016), analisando o crescimento de *Aspergillus carbonarius* em meio sintético de café, observaram que o maior crescimento foi a 25 °C de temperatura. Os resultados encontrados por estes autores estão dentro da faixa ótima de temperatura obtida neste trabalho para o crescimento dos isolados de *Aspergillus carbonarius* (25 °C a 32 °C).

Em alguns estudos (ALBORCH et al., 2011; BELLÍ et al., 2005; ROMERO et al., 2007) há relatos de que o intervalo ótimo de crescimento para *Aspergillus carbonarius*, geralmente, encontra-se em atividade de água entre 0,95 e 0,99. Mitchell et al. (2004), estudando os efeitos da atividade de água e temperatura no crescimento e na produção de OTA por *Aspergillus carbonarius*, a partir de uvas na Europa e em Israel, verificaram que o intervalo ótimo de crescimento para os isolados ocorreu entre 0,93-0,987 de atividade de água. Esteban et al. (2006) demonstraram que o crescimento desta espécie em meio YES ocorre em atividade de água entre 0,82-0,99. Resultados semelhantes em relação ao ótimo de atividade de água para o crescimento de *Aspergillus carbonarius* foram encontrados neste trabalho (0,92-0,98).

Vale ressaltar que as variações das condições ótimas de crescimento em relação às duas variáveis (temperatura e atividade de água) encontradas nos vários estudos podem estar relacionadas à composição do meio de cultura ou, ainda, ao isolado utilizado.

Os diagramas de Pareto (Figura 3) foram utilizados para avaliar a significância e o tipo de efeitos (sinérgico ou antagônico) sobre o crescimento dos isolados de *Aspergillus ochraceus* CCDCA10211 e CCDCA10212. De acordo com as Figuras 3a e 3b, todas as variáveis, e também sua interação, foram significativas ( $p > 0,05$ ) para o crescimento dos isolados.

A variável que mais influenciou o crescimento dos isolados foi atividade de água, tendo um efeito sinérgico (positivo). A temperatura apresentou efeito antagônico (negativo). Uma melhor interpretação das condições ótimas de crescimento é apresentada por meio das curvas de contorno (Figura 4).

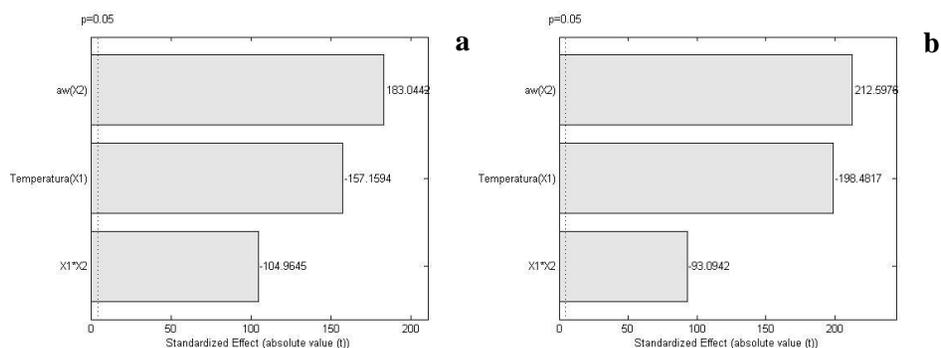


Figura 3 Diagrama de Pareto com efeito da temperatura (X1) e atividade de água (X2) sobre *Aspergillus ochraceus* CCDCA10211 (a); *Aspergillus ochraceus* CCDCA10212 (b)

De acordo com as curvas de contorno (Figuras 4a e 4b), observa-se que os isolados de *Aspergillus ochraceus* CCDCA10211 e CCDCA10212 apresentaram o maior crescimento (81 mm), nos mesmos intervalos de atividade de água entre 0,94 a 0,99 e temperatura entre 21 °C a 30 °C.

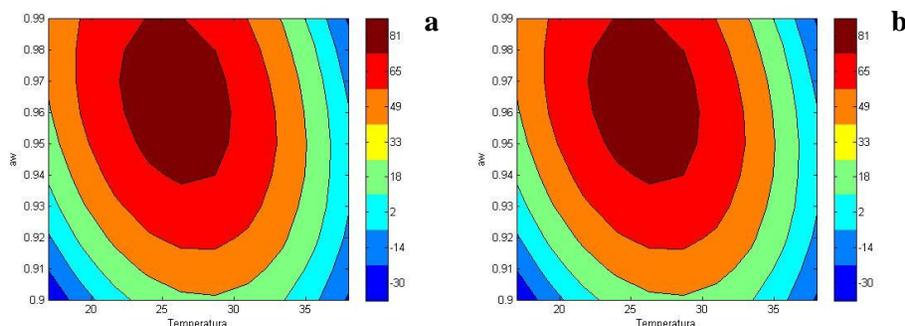


Figura 4 Curva de contorno para crescimento em função das interações entre temperatura e atividade de água sobre *Aspergillus ochraceus* CCDCA10211 (a); *Aspergillus ochraceus* CCDCA10212 (b)

Em geral, *Aspergillus ochraceus* crescem em temperaturas entre 8 °C e 37 °C, sendo a temperatura ótima para seu crescimento de 24 °C a 31 °C. Em geral, 0,76 é a atividade mínima de água para seu crescimento, sendo o ótimo 0,95-0,99 (PITT; HOCKING, 1997).

Pardo et al. (2005), estudando o crescimento de *Aspergillus ochraceus* em meio de cultura à base de café verde, observaram intervalo ótimo de crescimento à temperatura entre 20 °C a 30 °C e atividade de água de 0,95-0,99. Kouadio et al. (2007) demonstraram que as condições ótimas para o crescimento de *Aspergillus ochraceus* em meio de cultura à base de café foram 30 °C de temperatura e 0,99 de atividade de água. Resultados semelhantes foram encontrados neste trabalho em relação aos intervalos ótimos de temperatura e atividade de água para o crescimento de *Aspergillus ochraceus* (21 °C a 30 °C e 0,94 a 0,99).

### 3.2 Avaliação da produção de ocratoxina A por *Aspergillus carbonarius* e *Aspergillus ochraceus* em diferentes temperaturas e atividades de água

Nas Tabelas 6 e 7 estão descritos as matrizes do delineamento e os valores obtidos nos ensaios de avaliação de produção de OTA por *Aspergillus carbonarius* CCDCA10288 e CCDCA10293 e *Aspergillus ochraceus* CCDCA10211 e CCDCA10212, após 10 dias de crescimento. Foram observadas diferenças no nível de produção de OTA pelos isolados nos diferentes tratamentos, devido às alterações das variáveis independentes avaliadas: temperatura e atividade de água.

Por meio dos resultados obtidos foi possível determinar os coeficientes de regressão e ajustar um modelo quadrático que relaciona a temperatura e a atividade água do meio de cultura à base de café com a produção de OTA pelos isolados estudados.

Tabela 6 Matriz do delineamento e valores obtidos nos ensaios de avaliação de produção de OTA por *Aspergillus carbonarius* CCDCA10288 e CCDCA10293

Ensaio	Temperatura (°C)	Aw	Produção de OTA CCDCA10288 (ng/g)	Produção de OTA CCDCA10293 (ng/g)
T1	20	0,92	0	0
T2	20	0,98	16	13
T3	35	0,92	0	0
T4	35	0,98	60	0
T5	17	0,95	30	20
T6	38	0,95	0	10
T7	27,5	0,91	15	10
T8	27,5	0,99	200	155
T9	27,5	0,95	65	55
T10	27,5	0,95	70	60
T11	27,5	0,95	65	60

Tabela 7 Matriz do delineamento e valores obtidos nos ensaios de avaliação de produção de OTA por *Aspergillus ochraceus* CCDCA10211 e CCDCA10212

Ensaio	Temperatura (°C)	Aw	Produção de OTA CCDCA10211 (ng/g)	Produção de OTA CCDCA10212 (ng/g)
T1	20	0,92	1,5	2
T2	20	0,98	4	4
T3	35	0,92	3	2
T4	35	0,98	8	3
T5	17	0,95	0	0
T6	38	0,95	0	0
T7	27,5	0,91	2	3
T8	27,5	0,99	9	10
T9	27,5	0,95	3,5	6
T10	27,5	0,95	3	6,5
T11	27,5	0,95	7	3

Na Tabela 8 encontram-se os modelos obtidos e o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) para a produção de OTA pelos isolados. A porcentagem de variância explicada ( $R^2$ ) pelos modelos foi satisfatória para todas as respostas estudadas. A partir destes modelos foram construídas as curvas de contorno para a visualização das condições mais adequadas de temperatura e atividade de água, que resultaram em uma melhor produção de OTA pelos isolados.

Tabela 8 Modelos preditos para produção de OTA pelos isolados avaliados ( $\mu\text{g/g}$ )

Fungos	Modelo predito	R <sup>2</sup>
<i>A. carbonarius</i> CCDCA10288 ( $\mu\text{g/g}$ )	OTA = 1,29 + 12,97T - 0,05T <sup>2</sup> - 3,27aw + 1,99aw <sup>2</sup> - 11,11Taw	0,94
<i>A. carbonarius</i> CCDCA10293 ( $\mu\text{g/g}$ )	OTA= 272 + 16,00T - 0,04T <sup>2</sup> - 1156aw + 891aw <sup>2</sup> - 14,44Taw	0,89
<i>A. ochraceus</i> CCDCA10211 ( $\mu\text{g/g}$ )	OTA= 826 - 0,68T - 0,03T <sup>2</sup> - 1,78aw + 937aw <sup>2</sup> + 2,78Taw	0,79
<i>A. ochraceus</i> CCDCA10212 ( $\mu\text{g/g}$ )	OTA= 432 + 3,69T - 0,05T <sup>2</sup> - 1,06aw + 601aw <sup>2</sup> - 1,11Taw	0,81

Os diagramas de Pareto (Figura 5) foram utilizados para avaliar a significância e o tipo de efeitos (sinérgico ou antagônico) sobre a produção de OTA pelos isolados de *Aspergillus carbonarius* CCDCA10288 e CCDCA10293. De acordo com as Figuras 5a e 5b, todas as variáveis, e também sua interação, foram significativas ( $p > 0,05$ ) para a produção de OTA. A variável que mais influenciou a produção de OTA foi a atividade de água, tendo um efeito sinérgico (positivo). A temperatura apresentou efeito antagônico (negativo). Uma melhor interpretação das condições ótimas de produção de OTA pode ser observada por meio das curvas de contorno (Figura 6).

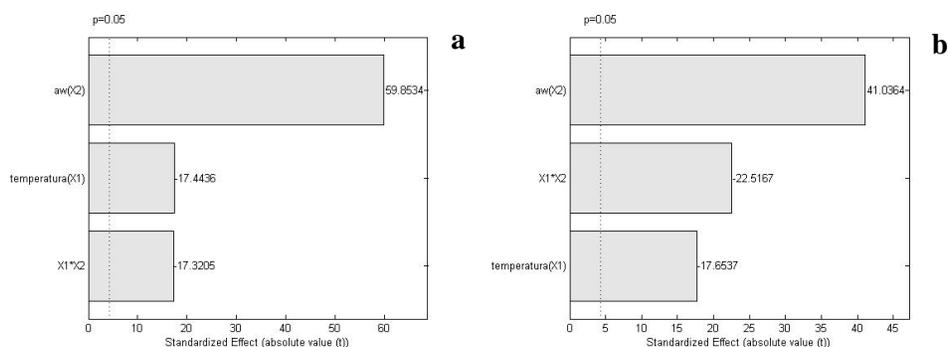


Figura 5 Diagrama de Pareto com efeito da temperatura (X1) e atividade de água (X2) sobre *Aspergillus carbonarius* CCDCA10288 (a); *Aspergillus carbonarius* CCDCA10293 (b)

De acordo com as curvas de contorno (Figura 6a e 6b), a maior quantidade de OTA produzida por *Aspergillus carbonarius* CCDCA10288 e CCDCA10293 (19,7-15,7  $\mu\text{g/g}$ , respectivamente) foi obtida em atividade de água de 0,99 e temperatura entre 15 °C a 25 °C.

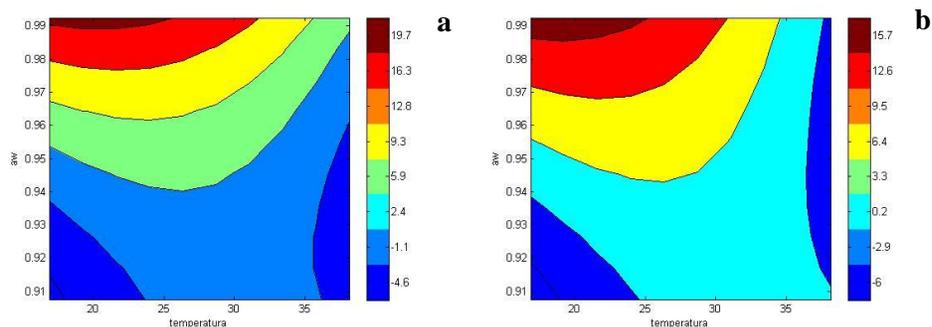


Figura 6 Curva de contorno para produção de ocratoxina A, em função das interações entre temperatura e atividade de água sobre *Aspergillus carbonarius* CCDCA10288 (a); *Aspergillus carbonarius* CCDCA10293 (b)

As condições ótimas para a produção de OTA por *A. carbonarius* diferem das condições ótimas para o crescimento do fungo e ocorrem, geralmente, à temperatura de 15 °C a 20 °C, e atividade de água de 0,95 a 0,99 (MITCHELL et al., 2004; PATERSON; LIMA, 2011). Souza et al. (2016),

avaliando a produção de OTA em meio de café, observaram que a maior produção de OTA por *Aspergillus carbonarius* foi a 15 °C de temperatura e 0,99 de atividade de água.

Em alguns estudos há relatos de que a produção de OTA por *Aspergillus carbonarius* em diferentes substratos apresenta maior concentração na faixa de 15-25 °C de temperatura e 0,95 e 0,98 de atividade de água (ALBORCH et al., 2011; KAPETANAKOU et al., 2009; ROMERO et al., 2010), resultados semelhantes ao encontrado neste trabalho (15 °C a 25 °C e 0,99 aw). A curva de contorno indica uma redução na produção de OTA com aumento da temperatura e redução da atividade de água.

A concentração de OTA produzida por fungos micotoxigênicos é totalmente dependente do substrato (KOKKONEN; JESTOI; RIZZO, 2005; MOUNJOUENPOU et al., 2012). Sendo assim, a produção de OTA por *Aspergillus carbonarius* é influenciada pelo substrato, a temperatura e a atividade de água.

Os diagramas de Pareto para os isolados de *Aspergillus ochraceus* (Figuras 7a e 7b) indicam que nenhuma das variáveis e sua interação foram significativas ( $p > 0,05$ ) na produção de OTA. Uma melhor interpretação das condições ótimas de produção de OTA é apresentada por meio das curvas de contorno (Figura 8).

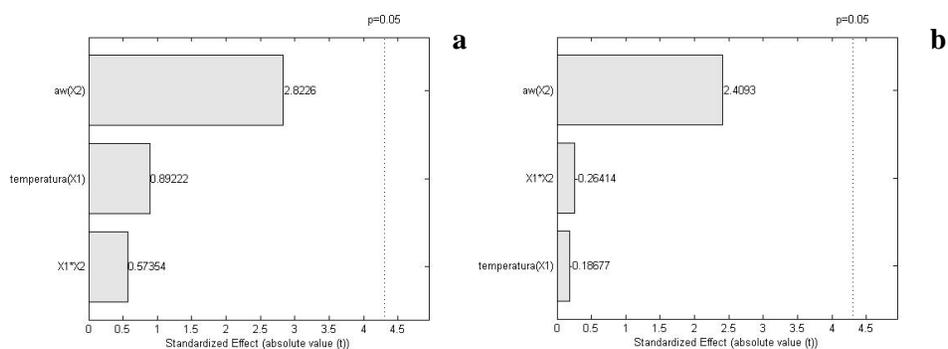


Figura 7 Diagrama de Pareto com efeito da temperatura (X1) e atividade de água (X2) sobre *Aspergillus ochraceus* CCDCA10211 (a); *Aspergillus ochraceus* CCDCA10212 (b)

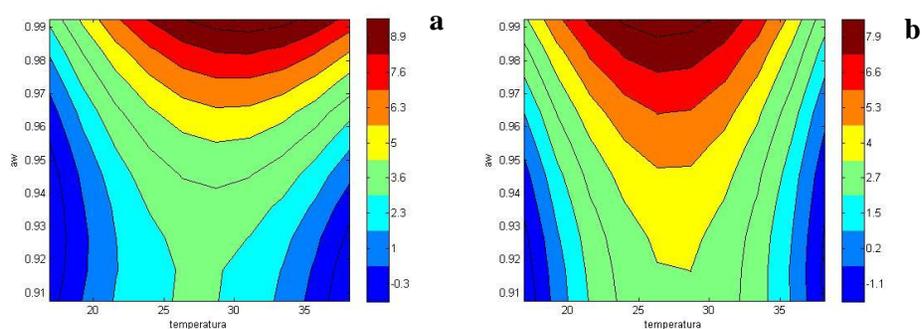


Figura 8 Curva de contorno para produção de ocratoxina A, em função das interações entre temperatura e atividade de água sobre *Aspergillus ochraceus* CCDCA10211 (a); *Aspergillus ochraceus* CCDCA10212 (b)

Apesar de o efeito das variáveis não ter sido significativo, as curvas de contorno (Figuras 8a e 8b) indicam uma tendência para melhor produção de OTA. Sendo assim, a maior quantidade de OTA produzida pelos isolados foi obtida em atividade de água entre 0,98 a 0,99. Em relação à temperatura, a maior quantidade de OTA produzida por *Aspergillus ochraceus* CCDCA10211(8,9 µg/g) foi entre 25 °C a 35 °C e, por *Aspergillus ochraceus* CCDCA10212 (7,9 µg/g), entre 22 °C a 32 °C.

As condições ótimas para a produção de OTA por *Aspergillus ochraceus* ocorrem, geralmente, à temperatura entre 12 °C a 37 °C (ótima de 25 °C) e a partir de 0,85 de atividade de água (sendo 0,97 a aw ótima) (MOSS, 1991).

Ramos et al. (1998), estudando o efeito da atividade de água e temperatura sobre o crescimento e a produção de OTA por três cepas de *Aspergillus ochraceus* em meio de extrato de cevada, observaram maior produção de OTA à temperatura entre 25 °C a 30 °C e atividade de água de 0,98. Souza et al. (2016), avaliando a produção de OTA em meio de cultura sintético de café, observaram que dois isolados de *Aspergillus ochraceus* tiveram maior produção de OTA a 25 °C de temperatura e 0,99 de atividade de água. Os resultados encontrados por estes autores estão dentro da faixa ótima de temperatura e atividade de água obtida neste trabalho para maior produção de OTA por *Aspergillus ochraceus*. As variações, provavelmente, ocorreram devido à composição do meio de cultura ou, ainda, ao isolado utilizado.

Kouadio et al. (2007), avaliando o efeito da temperatura e da atividade de água sobre o crescimento e a produção de OTA por *Aspergillus ochraceus* em meio de cultura à base de café, observaram que a produção da toxina é inibida em baixa atividade de água e altas temperaturas.

Embora *Aspergillus ochraceu* seja o maior produtor de OTA em café (BATISTA et al., 2009; ESPADALÉ; LAMPURLANÉS; AUBERT, 2008; PITT; HOCKING, 1997; TANIWAKI et al., 2003), neste estudo *Aspergillus carbonarius* produziu maior quantidade de OTA em meio de cultura à base de café. Este resultado é semelhante ao encontrado por Souza et al. (2016), no qual os isolados de *Aspergillus ochraceus* produziram quantidades bem menores de OTA em meio de cultura à base de café, não ultrapassando 0,3 µg/g, quando comparados com *Aspergillus carbonarius*.

Dessa forma, observa-se que o crescimento e a produção de OTA por *Aspergillus carbonarius* e *Aspergillus ochraceus* em meio de cultura à base de

café estão diretamente relacionados com a atividade de água e a temperatura. Sendo assim, é possível desenvolver um modelo predito para quantificar o efeito da combinação de temperatura e atividade de água sobre a produção de OTA pelos isolados.

### **3.3 Uso do modelo predito para estimar a produção de OTA por *Aspergillus carbonarius* em quatro regiões cafeeiras de Minas Gerais: Sul, Cerrado, Zona da Mata e Chapada de Minas**

Na Figura 9 apresentam-se os resultados obtidos pelo uso do modelo predito para estimar a produção de OTA, considerando a temperatura máxima e a mínima anual da região do Sul de Minas, assim como a projeção otimista e pessimista, segundo o sexto relatório do IPCC sobre mudanças climáticas (INTERNATIONAL PAINEL CLIMATIC CHANGE - IPCC 2015).

De acordo com os resultados obtidos, estima-se que, em todos os meses do ano, as condições são favoráveis para a produção de OTA pelo fungo *Aspergillus carbonarius* (Figura 9). Em relação à temperatura máxima anual (Figura 9a), a maior produção de OTA ocorre nos meses de junho, julho e agosto. Tanto no cenário otimista (+1,0 °C) quanto no pessimista (3,7 °C), propostos pelo IPCC, pode-se observar que a produção de OTA pelo fungo diminui, demonstrando que o aumento de temperatura não afetará a qualidade sanitária dos cafés produzidos nesta região.

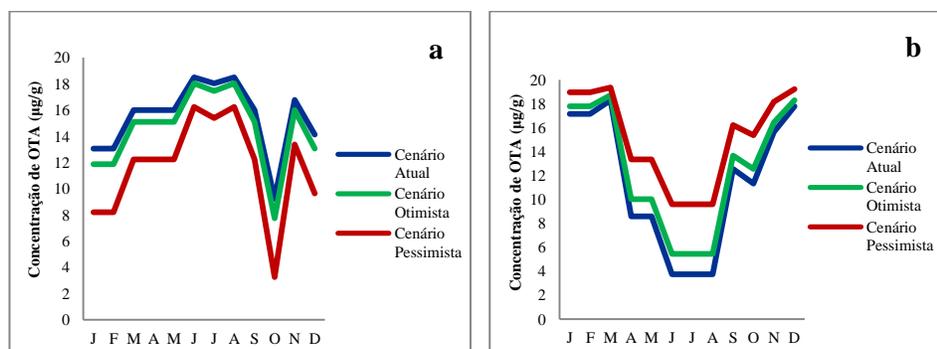


Figura 9 Concentração de OTA ( $\mu\text{g/g}$ ) com projeção atual, otimista (aumento da temperatura em  $1,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) e pessimista (aumento da temperatura em  $3,7\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) em relação à temperatura máxima (a) e mínima (b) anual da região do Sul de Minas.

Em relação à temperatura mínima anual (Figura 9b), um cenário oposto é estimado, sendo dezembro, janeiro, fevereiro e março os meses de maior produção de OTA. Com o aumento da temperatura de acordo com as projeções do IPCC, a produção de OTA aumenta, colocando em risco o café produzido nessa região. No entanto, vale ressaltar que, nos meses de maior produção de OTA, o fruto do café estará em estágio de chumbinho, não sendo favorável para a colonização e o desenvolvimento fúngico.

As regiões do Cerrado, Zona da Mata e Chapada de Minas apresentaram o mesmo comportamento da região do Sul de Minas (Figura 10, 11 e 12), em relação às temperaturas máxima e mínima anual. No entanto, a produção de OTA nos meses de junho, julho e agosto na região do sul de Minas foi menor, pois ela tem as menores temperaturas anuais, quando comparadas com as outras regiões avaliadas.

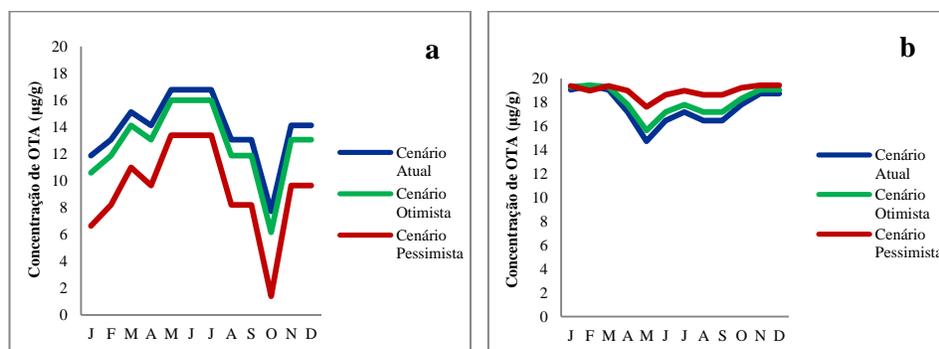


Figura 10 Concentração de OTA ( $\mu\text{g/g}$ ) com projeção atual, otimista (aumento da temperatura em  $1,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) e pessimista (aumento da temperatura em  $3,7\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) em relação à temperatura máxima (a) e mínima (b) anual da região do Cerrado de Minas

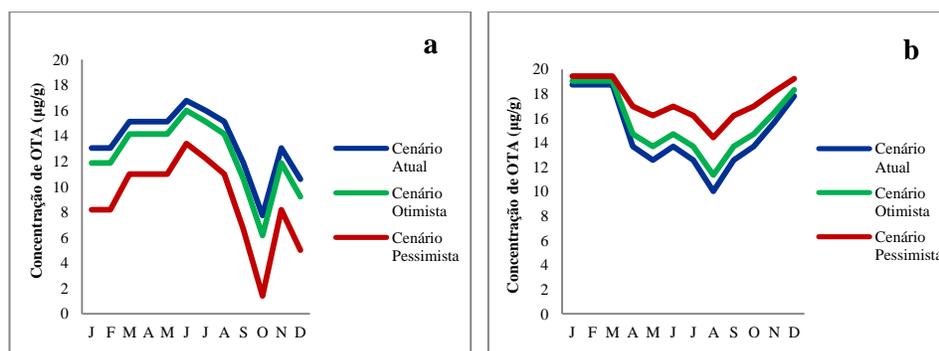


Figura 11 Concentração de OTA ( $\mu\text{g/g}$ ) com projeção atual, otimista (aumento da temperatura em  $1,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) e pessimista (aumento da temperatura em  $3,7\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) em relação à temperatura máxima (a) e mínima (b) anual da região da Zona da Mata de Minas

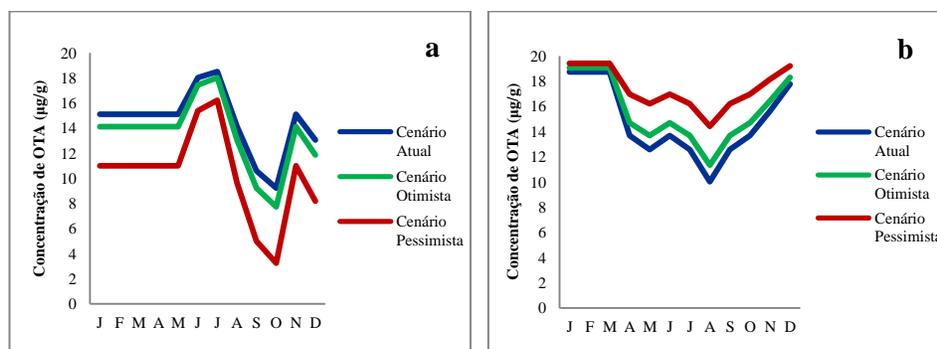


Figura 12 Concentração de OTA ( $\mu\text{g/g}$ ) com projeção atual, otimista (aumento da temperatura em  $1,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) e pessimista (aumento da temperatura em  $3,7\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) em relação à temperatura máxima (a) e mínima (b) anual da região da Chapada de Minas

Os efeitos das mudanças climáticas podem interferir na quantidade e na qualidade dos alimentos produzidos, principalmente em relação à segurança alimentar. Essas mudanças climáticas terão um elevado impacto na presença e produção de metabólitos tóxicos por alguns fungos filamentosos, mas ainda são poucos os estudos realizados (PATERSON; LIMA, 2010). O uso do modelo matemático auxilia na projeção de cenários, proporcionando estratégias de adaptação, com a adoção de boas práticas agrícolas e, se necessário, propondo alterações no processamento do café.

#### 4 CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo demonstram que, em condições *in vitro*, o crescimento e a produção de OTA por *Aspergillus carbonarius* e *Aspergillus ochraceus* em meio de cultura à base de café estão diretamente relacionados com a atividade de água e temperatura.

O estudo *in vitro* foi adequado para quantificar o efeito da combinação de temperatura e atividade de água sobre a produção de OTA pelos isolados testados. A obtenção do modelo permite prever a concentração de OTA em regiões produtoras de café, considerando as temperaturas da região. De acordo com os resultados obtidos observou-se um mesmo comportamento para as quatro regiões produtoras de café.

Os modelos preditos demonstram que os níveis de produção de OTA podem aumentar sob o efeito da elevação das temperaturas mínimas anuais.

## REFERÊNCIAS

- ALBORCH, L. et al. Effect of water activity, temperature and incubation time on growth and ochratoxin A production by *Aspergillus niger* and *Aspergillus carbonarius* on maize kernels. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 147, n. 1, p. 53-7, 2011.
- ALMEIDA, A. P. et al. Ochratoxin A in Brazilian instant coffee. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 38, n. 2, p. 300-303, Apr./June 2007.
- ALVES, S. B.; MORAES, S. A. Quantificação de inóculo de patógenos de insetos. In: ALVES, S. B. (Ed). **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. cap. 23, p. 765-778.
- ASTORECA, A. et al. Water activity and temperature effects on growth of *Aspergillus niger*, *A. awamori* and *A. carbonarius* isolated from different substrates in Argentina. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 119, n. 3, p. 314-318, Nov. 2007.
- BATISTA, L. R. et al. Ochratoxin A in coffee beans (*Coffea arabica* L.) processed by dry and wet methods. **Food Control**, Guildford, v. 20, n. 9, p. 784-790, Sept. 2009.
- BELLI, N. et al. *Aspergillus carbonarius* growth and ochratoxin A production on a syntetic grape medium in relation to environmental factors. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 98, n. 4, p. 839-844, 2005.
- BELLI, N. et al. Ochratoxin A in wines, musts and grape juices from Spain. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Oxford, v. 84, n. 6, p. 591-594, Apr. 2004.
- BRAGULAT, R.; ABARCA, L.; CABANES, J. An easy screening method for fungi producing ochratoxin A in pure culture. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 71, n. 2/3, p. 139-144, Dec. 2001.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 7**, de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre Limites Máximos Tolerados (LMT) para micotoxinas em Alimentos. Brasília, 2011. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 29 nov. 2011.

CHIOTTA, M. L. et al. Effect of water activity and temperature on growth of *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus tubingensis* and their interactions on ochratoxin A production. **World Mycotoxin Journal**, Wageningen, v. 8, n. 1, p. 99-105, 2015.

DACHOUPAKAN, C. et al. Study of the phenotypic and genotypic biodiversity of potentially ochratoxigenic black aspergilli isolated from grapes. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 132, n. 1, p. 14-23, Jan. 2009.

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

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

ESTEBAN, A. et al. Study of the effect of water activity and temperature on ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius*. **Food Microbiology**, London, v. 23, n. 7, p. 634- 640, 2006.

FELS-KLERX, H. J. van der et al. Development of a European system for identification of emerging mycotoxins in wheat supply chains. **World Mycotoxin Journal**, Wageningen, v. 2, n. 2, p. 119-127, Apr. 2009.

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

FUJII, S. et al. A comparison between enzyme immunoassay and HPLC for Ochratoxin A detection in green, roasted and instant coffee. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 50, n. 2, p. 349-359, Mar. 2007.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Ochratoxin A: some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and micotoxins**. Lyon, 1993. 452 p. (Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans, 56).

INTERNATIONAL PAINEL CLIMATIC CHANGE. **Climate change 2012: the physical science**. Geneva, 2015. Disponível em: <<http://www.ipcc.ch>>. Acesso em: 10 nov. 2015.

KAPETANAKOU, A. E. et al. Evaluating the combined effect of water activity, pH and temperature on ochratoxin A production by *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus carbonarius* on culture medium and Corinth raisins. **Food Control**, Guildford, v. 20, n. 8, p. 725-732, 2009.

KOKKONEN, M.; JESTOI, M.; RIZZO, A. The effect of substrate on mycotoxin production of selected *Penicillium* strains. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 99, n. 2, p. 207-214, 2005.

KOUADIO, A. I. et al. Influence de l'interaction de la température et de l'activité de l'eau sur la croissance et la production de l'ochratoxine A par *Aspergillus niger*, *Aspergillus carbonarius* et *Aspergillus ochraceus* sur un milieu de base café. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 53, n. 7, p. 852-859, Aug. 2007.

LEONG, S. L. et al. Australian research on ochratoxigenic fungi and ochratoxin A. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 111, p. 10-17, Sept. 2006. Supplement 1.

LEONG, S. L.; HOCKING, A. D.; PITT, J. I. Occurrence of fruit rot fungi (*Aspergillus* section *Nigri*) on some drying varieties of irrigated grapes. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, Adelaide, v. 10, n. 1, p. 83-88, 2004.

MIRAGLIA, M. et al. Climate change and food safety: an emerging issue with special focus on Europe. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 47, n. 5, p. 1009-1021, May 2009.

MITCHELL, D.; ALDRED, D.; MAGAN, N. Impact of ecological factors on the growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* from different regions of Europe. **Aspects of Applied Biology**, Amsterdam, v. 68, p. 109-116, 2003.

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

MOSS, M. O. The environmental factors controlling mycotoxin formation. In: SMITH, J. F.; HENDERSON, R. S. (Ed.). **Mycotoxins and animal foods**. Boca Raton: CRC, 1991. p. 37-56.

MOUNJOUENPOU, P. et al. Incidence of pod integrity on the fungal microflora and Ochratoxina: a production in cocoa. **Journal of Biology and Life Science**, New York, v. 3, n. 1, p. 254-265, 2012.

O'CALLAGHAN, J.; STAPLETON, P. C.; DOBSON, A. D. W. Ochratoxin A biosynthetic genes in *Aspergillus ochraceus* are differentially regulated by pH and nutritional stimuli. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 43, n. 4, p. 213-221, Mar. 2006.

PARDO, E. et al. Effect of water activity and temperature on mycelial growth and Ochratoxin A production by isolates of *Aspergillus ochraceus* on irradiated green coffee beans. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 68, n. 1, p. 133-138, Jan. 2005.

PARDO, E. et al. Modelling of effects of water activity and temperature on germination and growth of ochratoxigenic isolates of *Aspergillus ochraceus* on a green coffee-based medium. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 98, n. 1, p. 1-9, Jan. 2005.

PARK, K. J.; BIN, A.; BROD, F. P. R. Obtenção das isotermas de sorção e modelagem matemática para a pêra bartlett com ou sem desidratação osmótica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 21, n. 1, p. 73-77, jan./abr. 2001.

PASSAMANI, F. R. et al. Effect of temperature, water activity, and pH on growth and production of ochratoxin A by *Aspergillus niger* and *Aspergillus carbonarius* from Brazilian Grapes. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 77, n. 11, p. 1947-1952, Nov. 2014.

PATERSON, R. R. M.; LIMA, N. Further mycotoxin effects from climate change. **Food Research International**, Barking, v. 44, n. 9, p. 2555-2566, Nov. 2011.

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

PERRONE, G. et al. *Aspergillus* in grapes: ecology, biodiversity and genomics. In: VARGA, J.; SAMSOM, R. (Ed.). **Aspergillus in the genomic era**. Wageningen: Wageningen Academic, 2008. p. 179-203.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. 2<sup>nd</sup> ed. London: Blackie Academic & Professional, 1997. 593 p.

RAMOS, A. J. et al. Effect of water activity and temperature on growth and ochratoxin production by three strains of *Aspergillus ochraceus* a barley extract medium and on barley grains. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 44, p. 133-144, Oct. 1998.

ROMERO, S. M. et al. Effect os water activity and temperaturw on growth of ochratoxigenic strains of *Aspergillus carbonarius* isolated from Argentinean dried vine fruits. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 115, n. 2/3, p. 140-143, 2007.

ROMERO, S. M. et al. Ochratoxin A production by a mixed inoculum of *Aspergillus carbonarius* at different conditions of water activity and temperature. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 140, n. 2/3, p. 277-281, 2010.

SOUZA, S. C. et al. Effects of temperature and incubation time on growth and ochratoxin a biosynthesis by *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus ochraceus* in grain-based media. **African Journal of Microbiology Research**, Nairobi, 2016. In press.

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

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