

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL OCHRATOXIGÊNICO DE ESPÉCIES DE *Aspergillus* DA SEÇÃO *Circundati* E *Penicillium* spp. ASSOCIADOS A GRÃOS DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.) SEPARADOS EM PENEIRAS*

NASSER, P.P.¹; CHALFOUN, S.M.² e BATISTA, L.R.³

* Parte da dissertação de mestrado da primeira autora.

¹ Pós-Graduanda do DCA/UFLA; ² EPAMIG/CTSM/EcoCentro, Lavras-MG; ³ Bolsista CBP&D/Café.

RESUMO: O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar o potencial ocratoxigênico das espécies de *Aspergillus* da seção *Circundati* e *Penicillium* spp. isolados de grãos de café beneficiados foram separados por peneiras. Através deste estudo avaliaram-se, pela técnica de Plug Agar, cinquenta e cinco isolados de *Aspergillus* da seção *Circundati* e três isolados de *Penicillium* spp. quanto à capacidade de produzir ocratoxina A em meio YES, sendo testadas três espécies diferentes (*Aspergillus ochraceus*, *A. sulphureus* e *A. sclerotiorum*) da seção *Circundati* e uma espécie de *Penicillium* (*P. brevecompactum*). Destes, 29 isolados (50%) foram produtores de ocratoxina A. A seleção dos grãos em diferentes peneiras mostrou-se eficaz na redução do número de isolados ocratoxigênicos associados aos grãos.

Palavras-chave: *Aspergillus*, *Penicillium*, café, peneiras, ocratoxina.

OCHRATOXIGÊNIC POTENTIAL EVALUATION in *Aspergillus* SPECIES OF THE *Circundati* Section and *Penicillium* spp. ASSOCIATED to IN SIEVES SEPARATED COFFEE beans (*Coffea arabica* L.)

ABSTRACT: The present work was developed with the objective of evaluate the ochratoxigenic potential of *Aspergillus* species included in *Circundati* section and *Penicillium* spp. isolated from green coffee separated by sieves. During this work it was evaluated by Plug Agar technique, fifty five isolates of the *Circundati* section and three isolates of *Penicillium* spp. about the ochratoxin A production capacity in YES medium, and the tested isolates belongs to three different species (*Aspergillus ochraceus*, *A. sulphureus* and *A. sclerotiorum*) of *Circundati* section and one *Penicillium* specie (*P. brevecompactum*). Between them, twenty nine isolates (50%) were ochratoxin A producers. The beans screening in different sieves showed efficacy in decreasing the number of ochratoxigenic isolates associated to coffee beans.

Key words: *Aspergillus*, *Penicillium*, coffee, sieves, ochratoxin.

INTRODUÇÃO

Desde o século XVII, mais precisamente em 1830, o Brasil é o maior produtor de café do mundo. O produto já chegou a representar 80% das exportações mundiais, e sua participação média nos últimos cinco anos foi de apenas 22,2% (Floriani, 1999). Dos estados brasileiros, o maior produtor de café é Minas Gerais, com participação representando, segundo Floriani (1999), 51,40% da produção total brasileira ou 13,26% da produção mundial. É de conhecimento secular que a atividade de fungos ocasiona alterações na qualidade dos alimentos. Às vezes essas mudanças são desejáveis, mas em maior quantidade elas provocam alterações indesejáveis, como no caso do café, produzindo sabores e aromas desagradáveis causados por diferentes graus de deterioração, além de colocarem em risco potencial a saúde desses consumidores com a produção de micotoxinas. Entre as toxinas produzidas por fungos em grãos de café, a ocratoxina A (OTA) é a que tem gerado maior preocupação desde que foi associada com a nefropatologia dos Balcans, uma doença nos rins dos homens, podendo também atacar o fígado e intestino delgado (Krogh et al., 1997). Entretanto, dentro de uma mesma espécie fúngica considerada toxigênica, muitas linhagens não possuem essa propriedade. Entre esses isolados, a produção de toxina pode variar até 1.000 vezes (Bars e Bars, 1999); por isso, trabalhos vêm sendo realizados para melhorar o entendimento dos fatores e das condições que permitem o conhecimento das espécies colonizadoras e o potencial ocratoxigênico destas. O presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial ocratoxigênico de isolados identificados de *Aspergillus* da seção *Circundati* e *Penicillium* spp. associados a grãos de café beneficiados separados em peneiras.

MATERIAL E MÉTODOS

Visando à avaliação do potencial ocratoxigênico de fungos isolados e identificados associados a grãos de café beneficiados, foram utilizadas amostras obtidas de lotes previamente classificados em diferentes peneiras, através do processo de rebeneficiamento. Para isso foram coletadas amostras procedentes de diferentes regiões do Estado de Minas Gerais, a saber: Campanha (Região Sul de Minas Gerais); Blend do Sul de Minas (Oliveira, Três Pontas, Campanha e São Sebastião do Paraíso) e Blend da Zona da Mata (Matipó, Manhumirim, Manhuaçu e Caratinga). Lotes de 20 kg de café beneficiados foram rebeneficiados, obtendo-se as seguintes peneiras: peneira 17 acima; peneira 14/16; peneira 13 acima (Sul de Minas); Bica corrida (Campanha e Blend da Zona da Mata); e “Quebra”, dos quais se utilizou uma amostra de 500 g para se proceder às análises. Todos os isolados identificados foram inoculados em meio

YES e incubados por sete dias a 25 ± 1 °C. O tempo de incubação para detecção da produção de micotoxina pela técnica de Plug Agar é de cinco dias com temperatura a 25 °C (Filtenborg e Frisvad, 1980). Com o auxílio de uma ponteira de pipeta automática, foi feito um corte circular de aproximadamente 25 mm do micélio do fungo com ágar; este micélio foi colocado sobre uma placa de CCD (Merck – Sílica-Gel 60, 20 x 20) previamente ativada, junto com o micélio dos demais isolados, um ao lado do outro, com 1,5 cm de distância, como mostra a Figura 1.



Figura 1 - Placa de Cromatografia de Camada Delgada com micélio dos isolados antes da eluição.

Ao lado do último micélio é feita a aplicação do padrão da micotoxina (ocratoxina A). O micélio é retirado e, após 15 minutos, é feita a eluição em uma cuba de vidro contendo como fase móvel TEF - Tolueno, Acetato de Etila e Ácido fórmico 90% (50:40:10). Este método conta com o fato de que muitas micotoxinas são extracelulares, difundindo-se no substrato. Após a eluição, as placas são secas em capela pelo fluxo de ar. A confirmação é feita em luz ultravioleta com λ 366 nm, em cromatovisor CAMAG (UV-BETRACHTER). O isolado produtor da micotoxina (ocratoxina) apresenta um Rf (fator de retenção) e um spot de fluorescência semelhante ao do padrão da micotoxina testada.

RESULTADO E DISCUSSÃO

Tabela 4 - Resultados do potencial ocratoxigênico dos fungos *Aspergillus* da seção *Circundati* e *Penicillium* spp. isolados e identificados de grãos de café de diferentes procedências

Subgênero/espécie	Número de isolados	Isolados produtores de ocratoxina A	
		Com desinfecção	Sem desinfecção
<i>A. sulphureus</i>	34		12 (+), 22 (+)
<i>A. ochraceus</i>	18		14 (+), 4(ND)
<i>A. sclerotiorum</i>	3		3 (+)
<i>P.brevecompactum</i>	3	1(ND)	2(ND)

(+) isolado(s) produtor(es) de ocratoxina A, (ND) não-detectada

Os resultados referentes à distribuição do potencial toxigênico (DPT), apresentados na Tabela 4, indicam que, entre os fungos isolados e identificados, pertencentes à seção *Circundati* apresentaram percentual de isolados toxigênicos de 35%, 77,8% e 100%, respectivamente, os fungos *Aspergillus sulphureus*, *Aspergillus ochraceus* e *Aspergillus sclerotiorum*. Os isolados identificados do gênero *Penicillium* (*P. brevecompactum*) apresentaram resultado negativo quanto ao potencial ocratoxigênico, concordando com resultados anteriores obtidos por Urbano (2000) e Batista (2000). Considerando o total de isolados testados (58), verificou-se que 50% destes apresentaram resposta positiva para a produção de OTA, justificando assim a investigação das possibilidades de manifestação deste potencial toxigênico em grãos de café beneficiado. Observando os resultados representados na Tabela 5, verifica-se que houve tendência de redução na quantidade de isolados potencialmente toxigênicos à medida que os defeitos foram eliminados através da seleção de grãos em peneiras.

Tabela 5 - Resultados da presença de fungos potencialmente ocratoxigênicos confirmados através da técnica de Plug Agar, isolados e identificados de grãos de café beneficiado separados em peneiras de diferentes procedências

Amostra	Presença de fungos potencialmente ocratoxigênicos
Sul de Minas Quebra	07 (03 <i>Aspergillus sulphureus</i>) (04 <i>Aspergillus ochraceus</i>)
Sul de Minas 13 acima	03 (01 <i>Aspergillus sulphureus</i>) (02 <i>Aspergillus ochraceus</i>)
Sul de Minas 14/16	02 (02 <i>Aspergillus ochraceus</i>)
Sul de Minas 17 acima	01 (01 <i>Aspergillus ochraceus</i>)
Zona da Mata Quebra	04 (02 <i>Aspergillus sulphureus</i>) (02 <i>Aspergillus sclerotiorum</i>)
Zona da Mata BC	04 (03 <i>Aspergillus sulphureus</i>) (01 <i>Aspergillus sclerotiorum</i>)
Zona da Mata 14/16	01 (01 <i>Aspergillus sulphureus</i>)
Zona da Mata 17 acima	01 (01 <i>Aspergillus sulphureus</i>)
Campanha Quebra	03 (02 <i>Aspergillus ochraceus</i>) (01 <i>Aspergillus sulphureus</i>)
Campanha BC	01 (01 <i>Aspergillus ochraceus</i>)
Campanha 14/16	01 (01 <i>Aspergillus ochraceus</i>)
Campanha 17 acima	01 (01 <i>Aspergillus ochraceus</i>)

CONCLUSÕES

A seleção dos grãos em peneiras mostrou-se eficaz na redução do número de isolados com potencial ocratoxigênico positivo.

O percentual de isolados toxigênicos detectados entre os isolados identificados justifica investigações adicionais quanto à capacidade de expressão desse potencial em grãos de café.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARS, L.L.; BARS, P.L. Mycotoxigenic in Grains Application to Mycotoxic Prevention in Coffee. In: SEMINARIO INTERNACIONAL SOBRE BIOTECNOLOGIA NA AGROINDÚSTRIA CAFEIRA, 3., 1999, Londrina. **Anais...** Londrina: IAPAR/IRD, 1999. p.513.
- BATISTA, L. R. **Identificação, potencial toxigênico e produção de micotoxinas de fungos associados a grãos de café** (*Coffea arabica L.*). Lavras: UFLA, 2000. 188p. (Dissertação - Mestrado em Ciência dos Alimentos).
- FILTENBORG, O.; FRISVAD, J.C. A simple screening - method for toxigenic moulds in pure cultures. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, London, v.13, p.128-130, 1980.
- FLORIANI, C.G. Café - a certificação é o caminho. **Agro Técnico, Caderno Técnico – IMA**, n. 1, p.18, 1999.
- KROGH, P.; HALD, B.; PLESTINA, R.; CEOVIC, S. Balkan (endemic) nephropathy and foodborne ochratoxin A: preliminary results of a survey of foodstuffs. **Acta Pathologica et Microbiologia Scandinavica**, Section B: Microbiology, Copenhagen, v.85, p.238-240. 1997.
- URBANO, G. R.; TANIWAKI, M. H.; DE BONES, A; LEITÃO, M. F. F. Incidence of toxigenic fungi and ochratoxin a detection in coffee from three brasilian regions. In: INTERNATIONAL IUPAC SYMPOSIUM ON MYCOTOXINS AND PHYCOTOXINS, 10., 2000, Guarujá. Official program and abstract book.. Guarujá: Instituto Adolfo Lutz, 2000. p.164.