

**MARCIA REGINA BEUX**

**CAFÉ - ESTUDO DA BIODIVERSIDADE MICROBIANA DE FRUTOS  
DE CAFÉ DO BRASIL, SELEÇÃO DE CEPAS DE LEVEDURAS  
E BACTÉRIAS LÁCTICAS COM AÇÃO FUNGISTÁTICA CONTRA  
*Aspergillus ochraceus* PRODUTOR DE OCRATOXINA A**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Setor de Tecnologia, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Carlos R. Soccol.

Curitiba  
2004

## **TERMO DE APROVAÇÃO**

MARCIA REGINA BEUX

**CAFÉ - ESTUDO DA BIODIVERSIDADE MICROBIANA DE FRUTOS  
DE CAFÉ DO BRASIL E SELEÇÃO DE CEPAS DE LEVEDURAS  
E BACTÉRIAS LÁCTICAS COM AÇÃO FUNGISTÁTICA CONTRA  
*Aspergillus ochraceus* PRODUTOR DE OCRATOXINA A**

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Setor de Tecnologia, da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:

Orientador: Prof. Dr. Carlos R. Soccol  
Departamento de Biotecnologia, UFPR.

## DEDICATÓRIA

À meus filhos Vitor e Felipe, pelo tempo precioso cedido;  
Ao meu marido Robson, por haver me ensinado a ousar;  
À minha mãe, Cleonice, por haver me ensinado a persistir;  
À Carla e Rejâne, pelos conselhos e amizade;  
Ao meu pai Aldemar, “in memoriam”, pelos exemplos e ensinamentos.

## AGRADECIMENTOS

- Ao professor Dr. Carlos Ricardo Soccol, pela orientação;
- Aos professores Dr. Jose Angel Rodrigues-Leon, Dra. Elza Louko Ida, Dra. Maria Beatriz Abreu Glória, Dra. Nery Nishimura de Lima e Dra. Ida Chapaval Pimentel por terem aceito participar da Comissão Examinadora, com valiosas contribuições na avaliação da tese;
- À Universidade Federal do Paraná, em particular, à Coordenação do Curso de Pós-Graduação, Professora Maria Lúcia Masson, Professora Nina Waszczyński, Professor Renato de Freitas e ao Paulo, pela compreensão;
- À Pontifícia Universidade Católica do Paraná, em especial ao Professor Antônio Carlos Mira, pelo apoio;
- Ao Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos, em especial ao Professor Gabriel Guimarães, “in memoriam”, pelo incentivo e ao Professor Carlos Yamamoto pelo estímulo.
- Aos colegas e amigos do CEPPA, especialmente à Cristina, Anelise, Fabiana, Daniele, Togarma, Janaína, Vanusa, Ariene, Mari, Jorge, Luís Gustavo, Eliel, Wilton, Fabiana, Yeda, Sílvia e Elayne, pela colaboração, conselhos e disposição.
- À Ana Paula, Laurentino, Débora, Cleusa, Célia e Andréia pela boa vontade;
- Ao professor Agnaldo pelo suporte estatístico;
- A todos que direta ou indiretamente participaram da elaboração deste trabalho e principalmente a Deus, que permitiu a concretização de mais uma etapa ...

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE QUADROS</b> .....	xi
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	xiv
<b>LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS</b> .....	xvii
<b>RESUMO</b> .....	xiii
<b>ABSTRACT</b> .....	xiv
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1 OBJETIVO GERAL.....	2
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	2
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	3
2.1 CAFÉ.....	3
2.1.1 A cafeicultura no mundo.....	4
2.1.2 A cafeicultura no Brasil.....	5
2.1.3 Cultivo e processamento do café.....	6
2.2 FUNGOS.....	9
2.2.1 Fungos filamentos.....	10
2.2.1.1 Fungos toxigênicos e micotoxinas.....	10
2.2.2 Leveduras.....	12
2.3 BACTÉRIAS LÁCTICAS.....	13
2.4 MICRORGANISMOS ASSOCIADOS AO CAFÉ NAS FASES DE PRÉ E PÓS-COLHEITA DOS GRÃOS.....	14
2.4.1 <i>Aspergillus ochraceus</i> K. Wilh.....	16
2.4.2 Ocratoxina A.....	19
2.4.3 Grãos contaminados com micotoxinas – alternativas de descontaminação.....	24

2.4.4	Microrganismos com ação fungistática contra fungos toxigênicos..	24
2.5	FERMENTAÇÃO.....	25
2.5.1	Fermentação submersa.....	27
2.5.2	Fermentação no estado sólido.....	27
2.5.3	Crescimento microbiano.....	28
2.5.3.1	Biomassa.....	29
2.5.3.2	Contagem de microrganismos viáveis.....	29
2.5.3.3	Cinética de processos fermentativos .....	30
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>31</b>
3.1	FRUTOS DE CAFÉ.....	31
3.1.1	Características físico-químicas do café.....	31
3.1.1.1	pH.....	31
3.1.1.2	Açúcares totais.....	31
3.1.1.3	Composição centesimal.....	31
3.1.1.3.1	Proteínas.....	32
3.1.1.3.2	Lipídios.....	32
3.1.1.3.3	Resíduo mineral fixo (cinzas) .....	32
3.1.1.3.4	Umidade.....	32
3.1.1.3.5	Carboidratos.....	32
3.1.1.3.6	Atividade de água.....	32
3.2	ISOLAMENTO DA MICROBIOTA (LEVEDURAS) NATURALMENTE PRESENTES NAS CEREJAS DE CAFÉ.....	32
3.2.1	Preparo do caldo de fermentação.....	33
3.2.2	Preparo dos meios de cultura.....	33
3.2.3	Semeadura.....	34
3.2.4	Incubação.....	34

3.2.5 Triagem e seleção das colônias.....	34
3.2.6 Manutenção das cepas selecionadas.....	34
3.3 IDENTIFICAÇÃO DAS CEPAS DE LEVEDURAS SELECIONADAS....	35
3.4 CEPAS DE BACTÉRIAS LÁCTICAS.....	36
3.4.1 Manutenção das cepas de bactérias lácticas.....	36
3.5 CEPA DE <i>Aspergillus ochraceus</i> PRODUTOR DE OCRATOXINA A...	36
3.5.1 Ativação da cepa.....	37
3.5.2 Suspensão de esporos.....	37
3.6 AVALIAÇÃO DA AÇÃO FUNGISTÁTICA EM MEIO SÓLIDO - SELEÇÃO DAS CEPAS ISOLADAS CONTRA <i>Aspergillus ochraceus</i> OCRATOXIGÊNICO MEDIANTE MEDIDA DE CRESCIMENTO RADIAL.....	38
3.6.1 Seleção das cepas de leveduras.....	38
3.6.2 Seleção das cepas de bactérias lácticas.....	38
3.7 AVALIAÇÃO FUNGISTÁTICA EM MEIO SÓLIDO (PLACA DE ÁGAR COM ORIFÍCIO) - SELEÇÃO DAS CEPAS ISOLADAS CONTRA <i>Aspergillus ochraceus</i> OCRATOXIGÊNICO MEDIANTE MEDIDA DO HALO DE INIBIÇÃO SOB DIFERENTES pH.....	39
3.7.1 Leveduras .....	39
3.7.2 Bactéria láctica.....	39
3.8 CULTURA SUBMERSA - AVALIAÇÃO VISUAL DO DESENVOLVIMENTO DO <i>Aspergillus ochraceus</i> INOCULADO EM CALDO CONTENDO AS CEPAS SELECIONADAS.....	40
3.8.1 Levedura .....	40
3.8.2 Bactéria láctica .....	41
3.9 CULTURA SUBMERSA - AVALIAÇÃO DA AÇÃO FUNGISTÁTICA DAS CEPAS SELECIONADAS MEDIANTE QUANTIFICAÇÃO DA BIOMASSA E OCRATOXINA PRODUZIDAS PELA CEPA DE <i>Aspergillus ochraceus</i> EM CALDO EXTRATO DE CAFÉ.VERDE.....	41
3.9.1 Biomassa.....	42

3.9.2	Ocratoxina.....	42
3.10	AVALIAÇÃO DA AÇÃO FUNGISTÁTICA DAS CEPAS DE LEVEDURAS E BACTÉRIAS LÁCTICAS SELECIONADAS MEDIANTE QUANTIFICAÇÃO DA OCRATOXINA PRODUZIDA PELO <i>Aspergillus ochraceus</i> EM GRÃOS DE CAFÉ VERDES.....	45
3.11	AVALIAÇÃO DA VARIAÇÃO DA AÇÃO FUNGISTÁTICA DA CEPA SELECIONADA DE LEVEDURA MEDIANTE QUANTIFICAÇÃO DA OCRATOXINA PRODUZIDA PELO <i>Aspergillus ochraceus</i> EM GRÃOS DE CAFÉ VERDES.....	47
3.12	CARACTERIZAÇÃO DOS METABÓLITOS FORMADOS PELA CEPA DE LEVEDURA SELECIONADA, POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	47
3.13	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	48
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>49</b>
4.1	CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DAS CEREJAS DE CAFÉ...	49
4.1.1	pH.....	49
4.1.2	Açúcares totais.....	50
4.1.3	Composição centesimal.....	51
4.2	TRIAGEM E IDENTIFICAÇÃO DAS CEPAS DE LEVEDURAS SELECIONADAS.....	52
4.2.1	Triagem das colônias.....	52
4.2.2	Identificação das colônias de leveduras.....	60
4.3	AVALIAÇÃO DA AÇÃO FUNGISTÁTICA EM MEIO SÓLIDO - SELEÇÃO DAS CEPAS DE LEVEDURAS E BACTÉRIAS LÁCTICAS ISOLADAS CONTRA <i>Aspergillus ochraceus</i> OCRATOXIGÊNICO MEDIANTE MEDIDA DE CRESCIMENTO RADIAL.....	61
4.3.1	Seleção das cepas de leveduras.....	61
4.3.2	Seleção das cepas de bactérias lácticas.....	67
4.4	AVALIAÇÃO DA AÇÃO FUNGISTÁTICA EM MEIO SÓLIDO ( ÁGAR COM ORIFÍCIO) - SELEÇÃO DAS CEPAS ISOLADAS CONTRA <i>Aspergillus ochraceus</i> OCRATOXIGÊNICO MEDIANTE MEDIDA DO HALO DE INIBIÇÃO SOB DIFERENTES pH.....	70

4.4.1 Leveduras.....	70
4.4.2 Bactéria láctica .....	73
4.5 CULTURA SUBMERSA - AVALIAÇÃO VISUAL DA AÇÃO FUNGISTÁTICA DA CEPAS DE <i>C.lambica</i> 13b E <i>L.brevis</i> LPB03 INOCULADAS EM CALDO CONTENDO SUSPENSÃO DE ESPOROS DE <i>Aspergillus ochraceus</i> .....	74
4.5.1 Cultura submersa em Caldo YM inoculado com cepa de <i>C.lambica</i> 13b e esporos de <i>Aspergillus ochraceus</i> .....	75
4.5.2 Cultura submersa em Caldo Enriquecido inoculado com <i>L.brevis</i> LPB03 e esporos de <i>Aspergillus ochraceus</i> .....	76
4.6 CULTURA SUBMERSA - AVALIAÇÃO DA AÇÃO FUNGISTÁTICA DA CEPA <i>C.lambica</i> 13b E <i>L.brevis</i> LPB03 MEDIANTE QUANTIFICAÇÃO DA BIOMASSA E OCRATOXINA PRODUZIDAS PELA CEPA DE <i>Aspergillus ochraceus</i> EM CALDO EXTRATO DE CAFÉ VERDE.....	78
4.6.1 Biomassa.....	78
4.6.2 Ocratoxina .....	80
4.7 AVALIAÇÃO DA AÇÃO FUNGISTÁTICA DA CEPA DE <i>C.lambica</i> 13b E <i>L.brevis</i> LPB03 MEDIANTE AVALIAÇÃO VISUAL DO CRESCIMENTO DO <i>Aspergillus ochraceus</i> E QUANTIFICAÇÃO DA OCRATOXINA EM GRÃOS DE CAFÉ VERDES.....	80
4.7.1 Avaliação visual.....	82
4.7.2 Ocratoxina.....	83
4.8 AVALIAÇÃO DA AÇÃO FUNGISTÁTICA DA CEPA DE <i>C.lambica</i> 13b MEDIANTE QUANTIFICAÇÃO DA OCRATOXINA PRODUZIDA PELO <i>Aspergillus ochraceus</i> EM GRÃOS DE CAFÉ VERDES.....	85
4.9 CARACTERIZAÇÃO DOS METABÓLITOS FORMADOS PELA CEPA DE LEVEDURA SELECIONADA.....	87

<b>5 CONCLUSÃO .....</b>	<b>94</b>
<b>6 SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS.....</b>	<b>95</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>96</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>104</b>
<b>ANEXO 1 – CONTAGEM DE COLÔNIAS (UFC/mL) DA SUSPENSÃO DE ESPOROS DE <i>Aspergillus ochraceus</i>.....</b>	<b>105</b>
<b>ANEXO 2 – CONTAGEM DE COLÔNIAS (UFC/mL) DO INÓCULO DAS CEPAS DE LEVEDURAS 7e, 11b e 13b.....</b>	<b>106</b>
<b>ANEXO 3 – CONTAGEM DE COLÔNIAS (UFC/mL) DO INÓCULO DA CEPA DE BACTÉRIA LÁCTICA LPB03.....</b>	<b>107</b>
<b>ANEXO 4 - CURVA DE CALIBRAÇÃO DO ESPECTROFOTÔMETRO....</b>	<b>108</b>
<b>ANEXO 5 - CURVA PADRÃO DA OCRATOXINA .....</b>	<b>109</b>
<b>ANEXO 6 – CROMATOGRAMAS DA QUANTIFICAÇÃO DE OCRATOXINA A NOS FRASCOS SUBMETIDOS À CULTURA SUBMERSA CONTENDO ESPOROS DE <i>Aspergillus ochraceus</i>, <i>Candida lambica</i> 13b E <i>Lactobacillus brevis</i> LPB03.....</b>	<b>111</b>
<b>ANEXO 7 – CROMATOGRAMAS DA QUANTIFICAÇÃO DE OCRATOXINA (ng/g) OBTIDA APÓS 10 DIAS DE INCUBAÇÃO DOS GRÃOS DE CAFÉ VERDE ARTIFICIALMENTE CONTAMINADOS COM <i>Aspergillus ochraceus</i> E <i>Candida lambica</i> 13b.....</b>	<b>115</b>
<b>ANEXO 8 – CROMATOGRAMAS DA QUANTIFICAÇÃO DE OCRATOXINA (ng/g) OBTIDA APÓS 10 DIAS DE INCUBAÇÃO DOS GRÃOS DE CAFÉ VERDE ARTIFICIALMENTE CONTAMINADOS <i>Aspergillus ochraceus</i> E DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE <i>Candida lambica</i> 13b.....</b>	<b>121</b>

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – CAFÉ – PRINCIPAIS PAÍSES PRODUTORES – EVOLUÇÃO DA PRODUÇÃO EM MILHÕES DE SACAS (60 Kg – 1997-1998 a 2001-2002 .....	4
QUADRO 2 - PRINCIPAIS GRUPOS DE MICOTOXINAS E ESPÉCIES PRODUTORAS.....	12
QUADRO 3 - CONTAMINAÇÃO DE GRÃOS DE CAFÉ VERDE POR <i>Aspergillus ochraceus</i> EM AMOSTRAS PROVENIENTES DE 26 PAÍSES.....	16
QUADRO 4 - CONTAMINAÇÃO POR OCRATOXINA A EM AMOSTRAS DE CAFÉ VERDE PROVENIENTES DO PARANÁ, SÃO PAULO, MINAS GERAIS, ESPÍRITO SANTO, RORAIMA E BAHIA.....	21
QUADRO 5 - PRODUTOS COM INTERESSE INDUSTRIAL PRODUZIDOS POR MICROORGANISMOS.....	26
QUADRO 6 - MATÉRIAS-PRIMAS EMPREGADAS EM FERMENTAÇÃO E PRODUTOS FINAIS.....	28
QUADRO 7 - COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS PARA ISOLAMENTO DAS CEPAS DE LEVEDURAS.....	33
QUADRO 8 – CARACTERÍSTICAS DAS CEPAS DE BACTÉRIAS LÁCTICAS.....	36
QUADRO 9 - CONDIÇÕES DE ANÁLISE NO SISTEMA HPLC.....	45
QUADRO 10 - CONDIÇÕES DE ANÁLISE NO SISTEMA GC/MS.....	48
QUADRO 11 - pH DAS AMOSTRAS DE CEREJAS DE CAFÉ PROVENIENTES DOS ESTADOS DE MINAS GERAIS, BAHIA, SÃO PAULO E PARANÁ.....	49
QUADRO 12 - AÇÚCARES TOTAIS (g/100 g) DAS AMOSTRAS DE CEREJAS DE CAFÉ PROVENIENTES DOS ESTADOS DE MINAS GERAIS, BAHIA, SÃO PAULO E PARANÁ.....	50
QUADRO 13 - COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DAS AMOSTRAS DE CEREJAS DE CAFÉ PROVENIENTES DOS ESTADOS DE MINAS GERAIS, BAHIA, SÃO PAULO E PARANÁ.....	51
QUADRO 14 - CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DIFERENCIAIS DAS CEPAS ISOLADAS.....	53

<b>QUADRO 15 - IDENTIFICAÇÃO DAS 35 CEPAS DE LEVEDURAS ISOLADAS.....</b>	<b>60</b>
<b>QUADRO 16- CRESCIMENTO RADIAL (cm) DA CEPA DE <i>Aspergillus ochraceus</i> INOCULADA EM PLACAS DE PETRI CONTENDO AS CEPAS E LEVEDURAS.....</b>	<b>61</b>
<b>QUADRO 17- ANÁLISE DE VARIÂNCIA, MODELO BLOCO AO ACASO DO CRESCIMENTO RADIAL (cm) DA CEPA DE <i>Aspergillus ochraceus</i> INOCULADO EM PLACAS DE PETRI CONTENDO AS CEPAS E LEVEDURAS.....</b>	<b>64</b>
<b>QUADRO 18-MÉDIAS ORDENADAS DO CRESCIMENTO RADIAL (cm) DA CEPA DE <i>Aspergillus ochraceus</i> INOCULADO EM PLACAS DE PETRI CONTENDO AS CEPAS E LEVEDURAS.....</b>	<b>65</b>
<b>QUADRO 19- CRESCIMENTO RADIAL (cm) DA CEPA DE <i>Aspergillus ochraceus</i> INOCULADA EM PLACAS DE PETRI CONTENDO AS CEPAS DE LEVEDURAS.....</b>	<b>67</b>
<b>QUADRO 20- ANÁLISE DE VARIÂNCIA, MODELO BLOCO AO ACASO, DO CRESCIMENTO RADIAL (cm) DA CEPA DE <i>Aspergillus ochraceus</i> INOCULADO EM PLACAS DE PETRI CONTENDO AS CEPAS DE BACTÉRIAS LÁCTICAS.....</b>	<b>69</b>
<b>QUADRO 21- MÉDIAS ORDENADAS DO CRESCIMENTO RADIAL (cm) DA CEPA DE <i>Aspergillus ochraceus</i> INOCULADO EM PLACAS CONTENDO CEPAS DE BACTÉRIAS LÁCTICAS.....</b>	<b>69</b>
<b>QUADRO 22- MEDIDA DO HALO DE INIBIÇÃO (cm) DAS CEPAS DE LEVEDURAS (7e, 11b e13b) INOCULADA EM PLACAS DE PETRI CONTENDO <i>Aspergillus ochraceus</i>.....</b>	<b>71</b>
<b>QUADRO 23- MEDIDAS DO HALO DE INIBIÇÃO (cm) DA CEPA DE BACTÉRIA LÁCTICA INOCULADA EM PLACAS DE PETRI CONTENDO <i>Aspergillus ochraceus</i>.....</b>	<b>73</b>
<b>QUADRO 24- BIOMASSA (g/1000 mL) PRODUZIDA PELO <i>Aspergillus ochraceus</i> EM CALDO EXTRATO DE CAFÉ.....</b>	<b>78</b>
<b>QUADRO 25- TESTE DE TUKEY APLICADO AOS RESULTADOS DA BIOMASSA (g/1000 mL) OBTIDOS NOS FRASCOS TESTE E CONTROLES.....</b>	<b>79</b>
<b>QUADRO 26-RESULTADOS DA ANÁLISE DE UMIDADE (g/100 g) E ATIVIDADE ÁGUA DOS GRÃOS DE CAFÉ VERDE ANTES DA INOCULAÇÃO E APÓS 05 DIAS DE INCUBAÇÃO.....</b>	<b>81</b>
<b>QUADRO 27- RESULTADOS DA QUANTIFICAÇÃO DE OCRATOXINA</b>	

(ng/g) OBTIDOS APÓS 10 DIAS DE INCUBAÇÃO DOS GRÃOS DE CAFÉ VERDE ARTIFICIALMENTE CONTAMINADOS.....	80
QUADRO 28- RESULTADOS DA QUANTIFICAÇÃO DE OCRATOXINA (ng/g) OBTIDOS APÓS 10 DIAS DE INCUBAÇÃO DOS GRÃOS DE CAFÉ VERDE ARTIFICIALMENTE CONTAMINADOS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE INÓCULO DA CEPA 13b.....	85
QUADRO 29- ESPECTRO DE MASSA E IDENTIFICAÇÃO SUGERIDA DO COMPOSTO ALCÓLICO OBTIDO.....	87
QUADRO 30-ESPECTRO DE MASSA E IDENTIFICAÇÃO SUGERIDA.DO COMPOSTO FENÓLICO OBTIDO .....	90

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	FRUTOS MADUROS DE CAFÉ.....	6
FIGURA 2 -	OPERAÇÕES PARA OBTENÇÃO DOS GRÃOS DE CAFÉ: VIA SECA E ÚMIDA.....	8
FIGURA 3 -	ASPECTO MORFOLÓGICO DA COLÔNIA DE <i>Aspergillus ochraceus</i> EM ÁGAR DICLORAN ROSA DE BENGALA CLORANFENICOL.....	17
FIGURA 4 -	ASPECTO MORFOLÓGICO DO MICÉLIO REPRODUTIVO DE <i>Aspergillus</i> sp.....	18
FIGURA 5 -	FÓRMULA ESTRUTURAL DA OCRATOXINA A.....	19
FIGURA 6 -	GABARITOS CONTENDO AS PROVAS BIOQUÍMICAS PRESENTES NO SISTEMA DE IDENTIFICAÇÃO API 20 C AUX – BIOMÉRIEUX.....	35
FIGURA 7 -	PREPARO DA SUSPENSÃO DE ESPOROS DE <i>Aspergillus ochraceus</i> .....	37
FIGURA 8 -	PREPARO DAS PLACAS DE PETRI (MÉTODO DA PLACA DE ÁGAR COM ORIFÍCIO).....	40
FIGURA 9 -	ASPECTO DO CALDO EXTRATO DE CAFÉ ANTES DA INOCULAÇÃO.....	42
FIGURA 10 -	COLUNA DE IMUNOAFINIDADE OCHRATEST.....	44
FIGURA 11 -	SISTEMA DE ELUIÇÃO Á VÁCUO.....	44
FIGURA 12 -	CROMATÓGRAFO LÍQUIDO DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC), COM FLUORESCÊNCIA.....	45
FIGURA 13 -	UMIDIFICADOR TESTE.....	46
FIGURA 14 -	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DAS COLÔNIAS DE LEVEDURAS.....	54
FIGURA 15 -	MÉDIA DO CRESCIMENTO RADIAL (cm) DA CEPA DE <i>Aspergillus ochraceus</i> EM PLACAS DE PETRI CONTENDO AS CEPAS E LEVEDURAS...	64
FIGURA 16 -	CRESCIMENTO RADIAL (cm) DA CEPA DE <i>Aspergillus ochraceus</i> INOCULADA EM PLACAS DE PETRI CONTENDO	

AS CEPAS DE LEVEDURAS QUE APRESENTARAM MAIOR AÇÃO FUNGISTÁTICA (7e, 11b e 13b).....	66
FIGURA 17 - MÉDIA DO CRESCIMENTO RADIAL (cm) DA CEPA DE <i>Aspergillus ochraceus</i> EM PLACAS DE PETRI CONTENDO AS CEPAS DE BACTÉRIAS LÁCTICAS.....	68
FIGURA 18 - CRESCIMENTO RADIAL (cm) DA CEPA DE <i>Aspergillus ochraceus</i> INOCULADA EM PLACAS DE PETRI CONTENDO A CEPA DE BACTÉRIA LÁCTICA QUE APRESENTOU MAIOR AÇÃO FUNGISTÁTICA (LPB03).....	70
FIGURA 19 - MEDIDA DO HALO DE INIBIÇÃO DA CEPA DE <i>C.lambica</i> 13b, SOB DIFERENTES pH, INOCULADA EM PLACA DE PETRI CONTENDO <i>Aspergillus ochraceus</i> .....	72
FIGURA 20 - MEDIDA DO HALO DE INIBIÇÃO DA CEPA DE <i>L.brevis</i> LPB03, SOB DIFERENTES pH, INOCULADA EM PLACA DE PETRI CONTENDO <i>Aspergillus ochraceus</i> .....	74
FIGURA 21 - AVALIAÇÃO VISUAL DA AÇÃO FUNGISTÁTICA DA CEPA DE <i>C.lambica</i> 13b INOCULADA EM CALDO CONTENDO SUSPENSÃO DE ESPOROS DE <i>Aspergillus ochraceus</i> .....	75
FIGURA 22 - AVALIAÇÃO VISUAL DA AÇÃO FUNGISTÁTICA DA CEPA DE <i>L.brevis</i> LPB03 INOCULADA EM CALDO CONTENDO SUSPENSÃO DE ESPOROS DE <i>Aspergillus ochraceus</i> .....	76
FIGURA 23 - COMPARAÇÃO VISUAL DO DESENVOLVIMENTO DO MICÉLIO DE <i>Aspergillus ochraceus</i> INOCULADO EM CALDO CONTENDO <i>C.lambica</i> 13b E <i>L.brevis</i> LPB03.....	77
FIGURA 24 - BIOMASSA (g/1000 mL) FORMADA POR <i>Aspergillus ochraceus</i> APÓS FERMENTAÇÃO SUBMERSA.....	79
FIGURA 25 - ASPECTO DOS GRÃOS DE CAFÉ VERDES, ANTES DA INOCULAÇÃO.....	81
FIGURA 26 - ASPECTO DOS GRÃOS DE CAFÉ VERDE ANTES E APÓS 10 DIAS DE INCUBAÇÃO.....	82
FIGURA 27 - QUANTIFICAÇÃO DE OCRATOXINA (ng/g) OBTIDA APÓS 10 DIAS DE INCUBAÇÃO DOS GRÃOS DE CAFÉ VERDE ARTIFICIALMENTE CONTAMINADOS.....	84
FIGURA 28 - VARIAÇÃO DA QUANTIFICAÇÃO DE OCRATOXINA (ng/g) OBTIDA APÓS 10 DIAS DE INCUBAÇÃO DOS GRÃOS DE CAFÉ VERDE ARTIFICIALMENTE CONTAMINADOS.....	86

<b>FIGURA 29 - CROMATOGRAMA E ESPECTROGRAMA DO COMPOSTO ALCOÓLICO OBTIDO.....</b>	<b>88</b>
<b>FIGURA 30 - COMPARAÇÃO DO ESPECTROGRAMA DO COMPOSTO ALCOÓLICO OBTIDO COM O SUGERIDO.....</b>	<b>89</b>
<b>FIGURA 31 - FÓRMULA ESTRUTURAL DOS COMPOSTOS ALCÓÓLICOS FORMADOS.....</b>	<b>90</b>
<b>FIGURA 32 - CROMATOGRAMA E ESPECTROGRAMA DO COMPOSTO FENÓLICO OBTIDO.....</b>	<b>91</b>
<b>FIGURA 33- COMPARAÇÃO DO ESPECTROGRAMA DO COMPOSTO FENÓLICO OBTIDO COM O SUGERIDO.....</b>	<b>92</b>
<b>FIGURA 34 - FÓRMULA ESTRUTURAL DOS COMPOSTOS FENÓLICOS FORMADOS.....</b>	<b>92</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

<b>aw</b>	Atividade de água
<b>INCQS</b>	Instituto Nacional de Controle de Qualidade e Saúde
<b>kg</b>	Kilo
<b>LPB</b>	Laboratório de Processos Biotecnológicos
<b>ng</b>	Nanograma
<b>rpm</b>	Rotações por minuto
<b>sp</b>	Espécie
<b>UFC</b>	Unidade Formadora de colônia
<b>YM</b>	Yeast Medium

## RESUMO

Avaliou-se a ação fungistática de leveduras e bactérias lácticas, isoladas de cerejas de café provenientes de várias regiões do Brasil, contra *Aspergillus ochraceus* produtor de ocratoxina A. Quando testadas em placas de ágar, vinte e três, das trinta e cinco cepas de leveduras e seis das vinte cepas de bactérias lácticas revelaram diferentes graus de inibição do micélio. Dessas *Candida lambica* 13b e *Lactobacillus brevis* LPB03, apresentaram maior potencial antagônico. Inoculada em cultura submersa, *Candida lambica* 13b reduziu em 95,87% a biomassa fúngica. Inoculada em grãos de café verde artificialmente contaminados com esporos de *Aspergillus ochraceus*, reduziu em 88,37% a formação de ocratoxina A, quantificada por cromatografia líquida de alta eficiência com fluorescência.

A caracterização dos metabólitos por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas revelou a formação de dois compostos, um alcoólico (composto 1): 2-2 ditiobis-etanol(CAS Nº 1892-29-1) ou álcool p-(tio metil) benzil (CAS Nº 3446-90-0) e um fenólico (composto 2): 2-(1-etilfenil)-fenol (CAS Nº 4237-44-9) ou fenoxietil-benzeno(CAS Nº 54852-74-3) possíveis responsáveis pelo caráter fungistático, comprovando que utilização de espécies antagônicas pode manter a sanidade de grãos de café, evitando restrições no seu consumo ou comercialização.

**PALAVRAS-CHAVES:** *Aspergillus ochraceus*, *Candida lambica*, *Lactobacillus brevis*, ação fungistática, ocratoxina A

## ABSTRACT

The fungistatic action of yeasts and lactic acid bacteria strains, isolated from coffee cherries of several regions of Brazil against *Aspergillus ochraceus* producer of ochratoxin A was evaluated. When tested in agar plates, twenty three of the thirty five isolated yeasts strains and six of lactic bacteria of the twenty isolated revealed different levels of mycelium inhibition. Of those *Candida lambica* 13b and *Lactobacillus brevis* LPB 03 showed greater antagonistic potential. Inoculated in submerge culture, *Candida lambica* reduced by 95.87% the fungal biomass. Inoculated in green coffee cherries artificially contaminated with *Aspergillus ochraceus* spores, it reduced 88.37% the ochratoxin A synthesis, which was quantified by high performance liquid chromatography with fluorescence.

The characterization of the metabolites by gas chromatography coupled to mass spectrometry revealed the formation of two compounds, an alcoholic (compound 1): Ethanol, 2,2'-dithiobis-(CAS N° 1892-29-1) or p-(Methylthio)benzyl alcohol (CAS N° 3446-90-0) and a phenolic (compound 2): Phenol, 2-(1-phenylethyl)- (CAS N° 4237-44-9) or Benzene, ethylphenoxy-(CAS N° 54852-74-3), possibly the responsables for the fungistatic character, proving that the utilization of antagonistic species can maintain the quality of coffee grains, avoiding restrictions in its consumption or commercialization.

KEY-WORDS: *Aspergillus ochraceus*, *Candida lambica*, *Lactobacillus brevis*, fungistatic action, ochratoxin A

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior consumidor e exportador mundial de café. A acirrada concorrência com outros países da América Central e do Sul como Colômbia, Guatemala e México tem exigido o desenvolvimento de estratégias mercadológicas para diferenciar o produto brasileiro, evitando restrições na sua comercialização.

Desde 2002, países importadores como Espanha, Itália e Holanda estão avaliando a segurança microbiológica dos lotes de grãos de café verde exportados, mediante quantificação da ocratoxina A.

A ocratoxina A é um metabólito tóxico, termoestável e solúvel em água, produzido por determinadas cepas de fungos filamentosos, sendo *Aspergillus ochraceus* a principal espécie pesquisada em café.

Tal metabólito é produzido no café principalmente na etapa pós-colheita, quando os grãos são armazenados ou transportados em condições inadequadas de umidade, o que favorece o desenvolvimento desse fungo toxigênico.

Para assegurar a qualidade e sanidade do café exportado, a longo prazo é fundamental identificar os fatores críticos que contribuem na contaminação, adotando boas práticas de produção, mas a curto prazo buscar alternativas que inibam ou impeçam o desenvolvimento do *Aspergillus ochraceus* em grãos contaminados é imprescindível.

No controle do desenvolvimento de microrganismos potencialmente patogênicos nos mais diversos tipos de alimentos, técnicas de inoculação de espécies antagonistas têm sido empregadas com sucesso.

O isolamento de espécies de microrganismos com ação fungistática contra o desenvolvimento do *Aspergillus ochraceus* tornou-se estratégia biotecnológica para manter a sanidade do café consumido no mercado interno ou externo.

As etapas deste experimento envolveram além do isolamento e identificação das leveduras naturalmente presentes na microbiota de cerejas maduras de café, a avaliação da ação fungistática, das mesmas e de cepas de bactérias lácticas cedidas pelo Laboratório de Processos Biotecnológicos da Universidade Federal do Paraná, contra *Aspergillus ochraceus*, mediante quantificação da biomassa e ocratoxina A além da caracterização dos metabólitos responsáveis pelo antagonismo.

## 1.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar a ação fungistática de cepas de leveduras e bactérias lácticas isoladas de cerejas de café provenientes de diversos estados do Brasil e inoculadas em grãos de café verde, artificialmente contaminados com *Aspergillus ochraceus*, mediante quantificação da biomassa e ocratoxina A .

## 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar e identificar as leveduras naturalmente presentes nos frutos maduros de café provenientes de Minas Gerais, Espírito Santo, Bahia, São Paulo e Paraná;
- Avaliar em meio sólido a ação fungistática das cepas de leveduras isoladas e de cepas de bactérias lácticas contra *Aspergillus ochraceus* (produtor de ocratoxina A), pela medida de crescimento radial e formação de halo de inibição, selecionando-as;
- Avaliar por cultura submersa, a ação fungistática das cepas selecionadas através da biomassa e quantificação da ocratoxina A;
- Avaliar a ação fungistática das cepas selecionadas inoculando-as em grãos de café verde artificialmente contaminados com *Aspergillus ochraceus*, mediante quantificação da ocratoxina A;
- Avaliar a variação da ação fungistática da cepa selecionada inoculando-a em diferentes concentrações, em grãos de café verde artificialmente contaminados com *Aspergillus ochraceus* por meio da quantificação da ocratoxina A;
- Caracterizar os metabólitos produzidos pela cepa de levedura selecionada;
- Correlacionar a ação fungistática com a identificação do metabólito formado.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 CAFÉ

O cultivo do café no Brasil integra importante complexo agro-industrial, tornando-o o principal país exportador.

Duas espécies de café são comercialmente exploradas em nível mundial. *Coffea arabica* (arabica), considerada mais nobre e *Coffea canephora* (robusta), considerada mais ácida porém mais resistente a pragas (PETTIGREW, 1999).

*Coffea arabica*, arbusto originário da Etiópia, desenvolve-se bem em altitudes elevadas (600 m a 2000 m). Os maiores produtores mundiais dessa espécie são Brasil, Colômbia, México e Guatemala.

No Vietnã, Costa do Marfim, Índia e Uganda predomina o plantio de *Coffea canephora*, pequena árvore originária do Congo, que se adapta bem em altitudes inferiores a 600 m (COMITÉ FRANÇAIS DU CAFÉ, 1997).

A aceitabilidade da bebida está interligada a uma série de fatores relacionados às fases de pré e pós-colheita dos grãos. Os atributos de classificação estão vinculados não só às condições naturais (solo, clima, chuvas e altitude do terreno) como aos cuidados adotados no cultivo (adubação, poda, seleção dos pés, coleta e manipulação dos frutos) (LUNA-FILHO, 2003).

Algumas espécies de microrganismos, principalmente bactérias lácticas, leveduras e fungos filamentosos, estão relacionados a má qualidade da bebida do café alterando seu sabor e aroma ou produzindo metabólitos tóxicos potencialmente prejudiciais à saúde, como a ocratoxina A (ALVES e CASTRO,1998 e BITANCOURT,1957)

A acirrada concorrência internacional com países como Colômbia, Guatemala e México e o fato do café exportado em grãos ter características de “commodity” (produto vendido a granel, sem diferenciação de origem ou qualidade) exigem o desenvolvimento de estratégias comerciais e mercadológicas para diferenciar o produto brasileiro (LUNA-FILHO, 2003).

### 2.1.1 A cafeicultura no mundo

Segundo DEMARCHI (2003), a produção mundial de café na última década apresentou crescimento de 2,7% ao ano, situando-se em média em 103 milhões de sacas de 60 kg. Os dez maiores países produtores respondem por quase 80% da produção mundial. Desse percentual, a América do Sul participa com 43%, a Ásia com 24%, a América Central com 18% e a África com 16%. Brasil, Vietnã e Colômbia, respectivamente, 1º, 2º e 3º produtores mundiais, detêm quase metade da oferta mundial de café (Quadro 1). Deve-se destacar o Vietnã, cuja produção aumentou 1169%, entre 1989 e 2001, desbancando a Colômbia.

**QUADRO 1 - CAFÉ – PRINCIPAIS PAÍSES PRODUTORES - EVOLUÇÃO DA PRODUÇÃO EM MILHÕES DE SACAS 60 Kg– 1997/1998 A 2001/2002**

PAÍSES	1997/1998	1998/1999	1999/2000	2000/2001	2001/2002
Brasil	20.475	33.950	27.170	31.100	27.490
Vietnã	7.000	7.500	11.010	13.333	12.500
Colômbia	12.043	10.868	9.512	11.500	11.400
Indonésia	7.000	6.950	6.660	6.495	6.280
México	4.950	5.010	6.193	5.300	5.500
Índia	3.805	4.415	4.870	5.020	5.425
Guatemala	4.200	4.300	4.364	4.494	4.976
Costa do Marfim	4.080	2.217	5.700	4.333	4.700
Etiópia	3.833	3.867	3.833	3.683	3.800
Uganda	3.032	3.640	3.097	3.100	3.200
Honduras	2.905	2.494	3.067	2.900	2.961
Costa Rica	2.455	2.459	2.688	2.489	2.560
Peru	1.820	1.980	2.571	2.500	2.550
El Salvador	2.040	1.860	2.612	1.603	1.895
Camarões	889	1.114	1.370	1.505	1.550
Nicarágua	1.083	1.079	1.514	1.243	1.350
Tailândia	1.293	916	1.397	1.200	1.300
Papua-Nova Guiné	1.076	1.351	1.387	1.034	1.200
Equador	1.230	1.322	1.295	1.081	1.166
Quênia	1.028	1.148	1.685	1.019	969
Outros	11.176	9.992	11.728	12.069	14.967
TOTAL	97.413	108.432	113.723	117.001	117.739

FONTE: DEMARCHI,2003

A quantidade de café exportado tem se situado, em média, em 80,0 milhões de sacas de 60 kg/ano, sendo o Brasil principal exportador, com uma participação de 22,5% desse mercado. A Colômbia, segunda colocada, com uma participação de 12,5% e o Vietnã na terceira colocação, com 8,8%.

### 2.1.2 A cafeicultura no Brasil

As primeiras mudas e sementes de café chegaram ao Brasil no século XVIII, por volta de 1730, vindas da América Central e Guiana.

Somente a partir do início do século XIX a cultura despertou interesse nos grandes proprietários, tornando-se rapidamente a principal atividade agrícola do país.

A significativa importância econômica fez dos “Barões do Café” de São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais o centro da elite do Império e da República, até quase a metade do século XX.

Entre 1810 e 1820, os cafezais espalharam-se por todo o Vale do Paraíba, primeiro na parte fluminense, depois na parte paulista e no sul de Minas. Em meados do século XIX, ocuparam as terras das antigas lavouras de cana-de-açúcar e algodão e avançaram para oeste de São Paulo, local em que encontraram condições favoráveis de clima e solo.

No início do século XX, os cafezais cobriam extensa faixa que se estendia do Paraná ao Espírito Santo. A cafeicultura despontou entre as monoculturas exportadoras, desbancando a cana-de-açúcar e iniciando o ciclo econômico do café, que foi sem dúvida a mola propulsora da urbanização e industrialização do país. Nas primeiras cinco décadas deste século, o Brasil reinou no cenário mundial com, em média, 70% da produção mundial de café.

Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Paraná, Rondônia e Bahia são estados notoriamente produtores de café e juntos produzem 96% do café brasileiro. A produção de *Coffea arabica* concentra-se em Minas Gerais, São Paulo, Paraná e Bahia, enquanto no Espírito Santo, são plantadas ambas.

Minas Gerais é o maior estado produtor, com 47% da produção do café brasileiro. Em segundo lugar está o Espírito Santo, com 19% (maior produtor de café

robusta). Na terceira colocação vem São Paulo, com 13%. O Paraná é o quarto maior produtor, com 7% do café nacional (terceiro se for considerada apenas a produção de café arábica) (DEMARCHI, 2003).

Das espécies cultivadas, *C.canephora* tem plantada no Brasil apenas a variedade conillon enquanto *C.arabica* tem variedades como Icatu, Obatã e Catuai (LUNA-FILHO, 2003).

### 2.1.3 Cultivo e processamento do café

O cafeeiro, planta perene da família das Rubiáceas pode atingir 10 a 12 metros de altura, porém é mantido entre 2 a 3 metros para facilitar a colheita dos frutos (LUNA-FILHO, 2003).

Os frutos denominados de “cerejas”, estão distribuídos nos ramos. Sua coloração varia de acordo com o estágio de maturação entre verde, amarelo e vermelho. Quando adquirem coloração vermelho-escuro estão prontos para a colheita (Figura 1).

### FIGURA 1 – FRUTOS MADUROS DE CAFÉ



FONTE: BARTELS (1993).

Visto sob corte longitudinal, a cereja mostra diferentes camadas de tecidos recobrando os grãos. O exocarpo (ou epiderme) é a parte mais externa, sua consistência varia de acordo com a espécie e a coloração de verde (clorofila) ao vermelho (antocianos) de acordo com o estágio de maturação.

O mesocarpo, mucilagem ou polpa é constituído por uma camada de 5 mm, situada abaixo do exocarpo. É formado por tecido esponjoso, rico em açúcares e pectinas recobrando os grãos. Esses são revestidos por dupla membrana (endocarpo ou pergaminho e espermoderma ou película prateada) (BRESSANI, 1978).

Na maioria das áreas de cultivo, há uma colheita por ano, mas em países cujo clima permanece constante o ano todo, ocorrem duas safras.

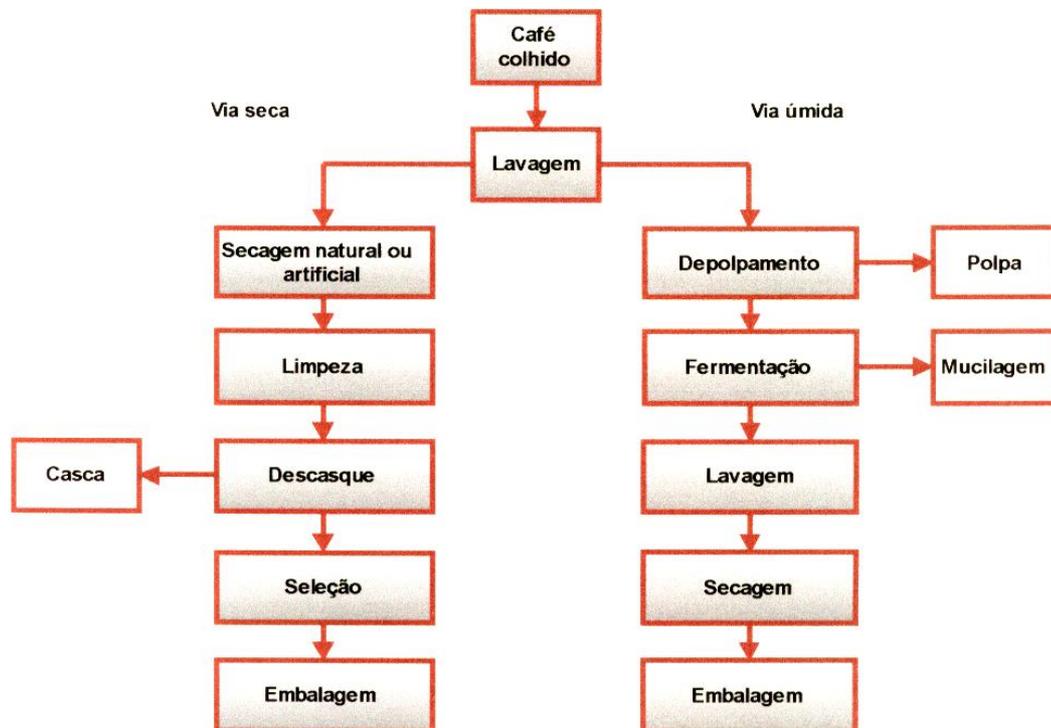
O pé de café frutifica em média após cinco anos do plantio, sendo produzidos em torno de 2,5 Kg de cerejas ao ano, por pé, resultando em 0,5 kg de café verde e 0,4 kg de café torrado (LUNA-FILHO, 2003).

A escolha da época para colheita é fundamental. Se os frutos não estiverem maduros, os grãos não estarão plenamente desenvolvidos ou amadurecidos em seu interior e não amadurecerão após serem colhidos. Se os frutos estiverem maduros demais, os grãos estragarão e basta um grão estragado numa saca para contaminar o restante alterando a sabor (PETTIGREW, 1999).

Como os frutos amadurecem em tempos diferentes, o melhor método de colheita é os apanhadores colherem apenas alguns por vez e então voltarem aos mesmos arbustos a cada de dez dias até que toda a colheita seja feita.

Uma vez colhidas, as cerejas são submetidas a diversas operações para retirada dos grãos. Existem duas tecnologias para obtenção do grão descascado: a via seca e a via úmida (Figura 2) (CLARKE e MACRAE, 1985). Por via seca, os frutos são espalhados ao sol por três a quatro semanas e rastelados de vez em quando para serem revolvidos, a fim de garantir secagem uniforme. Durante esse período ocorrem fermentações naturais por microrganismos, a polpa ou mucilagem é degradada e o exocarpo torna-se quebradiço (café “coco”), permitindo separar os grãos da casca através da passagem dos mesmos por peneiras vibratórias e ventilação.

**FIGURA 2 - OPERAÇÕES PARA OBTENÇÃO DOS GRÃOS DE CAFÉ: VIA SECA E VIA ÚMIDA**



FONTE: CLARKE e MACRAE, 1985.

O processo por via seca predomina na cafeicultura brasileira e proporciona bebida mais encorpada e menos ácida, devido a migração dos açúcares da polpa para o grão durante a secagem, porém considerada de qualidade inferior à obtida por via úmida (MACHADO, 2002).

Por via úmida, após a colheita, as cerejas são lavadas em água corrente e depolpadas mecanicamente. Os grãos são imersos em água por até 36 horas, sendo fermentados naturalmente. Posteriormente são lavados e secos ao sol. Essa metodologia é mais cara e requer grandes volumes de água, no entanto origina bebida de melhor qualidade (PETTIGREW, 1999).

Depois que os grãos foram removidos dos frutos, por um dos dois métodos, ainda resta uma película muito fina que também deve secar para que os mesmos possam ser armazenados. Os grãos são espalhados ao sol durante cerca de 14 dias ou depositados em bandejas e secos artificialmente para a obtenção do “café

pergaminho”. Esse pode ser estocado por até um ano em sacos de juta ou outra fibra natural, desde que sejam mantidas condições adequadas de temperatura e umidade relativa do ar.

Os grãos expostos ao sol, em lugar arejado, secam rapidamente originando bebida de melhor qualidade. Já os que permanecem muitos dias no terreiro sem secar favorecem o desenvolvimento de microrganismos (LUNA-FILHO, 2003).

Antes de serem exportados, o “pergaminho” é removido por máquinas e os grãos são submetidos ao polimento para apresentar aparência brilhante e coloração azulada (PETTIGREW, 1999).

## 2.2 FUNGOS

Os fungos compreendem seres eucarióticos, heterotróficos, aclorofilados e quimiotróficos, obtendo energia através de reações químicas nas quais substratos adequados são oxidados (TORTORA et al, 2000). Apresentam parede celular rígida quitinosa, constituída de polímeros de amino-açúcares, sem reserva de amido, em alguns casos, com presença de glicogênio.

Ubíquos, são encontrados no ar, no solo, na água, nos vegetais e nos animais. Formam grupo complexo e divergente de microrganismos constituído por centenas de espécies (APHA, 2001).

Segundo LACAZ (1998), o reino Mycetalia ou Fungi engloba os fungos gelatinosos (Divisão Myxomycota) e os verdadeiros (Divisão Eumycota). Os Eumycota compreendem seres com organização miceliana e dependendo da origem dos esporos, sexuada ou assexuada, são divididos em fungos perfeitos ou imperfeitos (deuteromicetos), respectivamente.

Sob o ponto de vista morfológico torna-se conveniente distingui-los em fungos filamentosos ou bolores e leveduras. Essa distinção não tem valor taxonômico, pois ambas as formas podem ser encontradas num mesmo grupo de fungos.

Artificialmente desenvolvem-se em meios de cultura, apresentando colônias visíveis macroscopicamente. As leveduras formam aglomerados de aspecto cremoso ou rugoso e os bolores massas filamentosas .

Segundo MINAMI (2003), o substrato e temperatura de incubação são fatores que interferem no dimorfismo (leveduriforme ou filamentoso) apresentado por algumas espécies.

### 2.2.1 Fungos filamentosos

Os fungos filamentosos ou bolores são constituídos por células multinucleadas (cenocitos) formando tubos denominados hifas, que entrelaçadas constituem o micélio (BORZANI et al., 2001).

O micélio pode ser vegetativo ou reprodutivo. O primeiro tem por finalidade absorver e metabolizar nutrientes e o segundo multiplicar, reproduzir, transmitir caracteres genéticos e perpetuar a espécie. Multiplicam-se por fragmentação das hifas ou formação de esporos mediante fusão (sexuadamente) ou dispersão dos mesmos no ambiente (assexuadamente) (LACAZ, 1998).

Os fungos imperfeitos ou deuteromicetos assumem importância diferenciada, pois apresentam micélio septado, reprodução exclusivamente assexuada com esporos exógenos formados em conidióforos. A identificação de gêneros e espécies está vinculada a coloração do micélio e forma, cor e disposição dos conídios (BORZANI et al., 2001).

#### 2.2.1.1 Fungos toxigênicos e micotoxinas

Segundo BLACK (2002), micotoxinas são produtos metabólicos secundários produzidos por algumas espécies de fungos e que quando ingeridos causam alterações biológicas prejudiciais aos seres humanos e outros animais. Esses metabólitos são quimicamente diversos e podem estar contidos no micélio, no interior dos esporos ou serem liberados no alimento contaminado por esses microrganismos.

O desenvolvimento de fungos toxigênicos e a produção de micotoxinas depende de um complexo conjunto de fatores sendo os principais, a suscetibilidade do substrato, a colonização do fungo produtor, a temperatura e umidade do

substrato, a umidade relativa do ar durante o armazenamento e a capacidade biológica do fungo produzir micotoxinas os principais (SCUSSEL, 2000).

Segundo FORSYTHE (2002), a toxicidade das micotoxinas pode ser subdividida em aguda (provoca danos aos rins ou fígado), crônica (resulta em câncer de fígado), mutagênica, (causa danos ao DNA) e teratogênica (provoca anomalias em fetos).

A preocupação reside também na possibilidade do aparecimento de tumores malignos relacionados com a ingestão repetida de baixas doses (sub-agudas) de micotoxinas .

Considerando-se a ocorrência de micotoxinas em alimentos é importante realçar que nem todas as cepas da mesma espécie são toxigênicas. A presença de um fungo viável produtor de toxina não indica necessariamente que a toxina esteja presente como também a mesma pode ser detectada na ausência de fungos viáveis. Algumas micotoxinas podem induzir a formação de lesões orgânicas em seres vivos após ingestão repetida de pequenas quantidades. O controle das micotoxinas busca o equilíbrio prático entre a eliminação completa e um nível tolerável (ICMSF, 2000).

Numerosos fungos foram testados em laboratório visando detectar a produção de micotoxinas. As principais espécies produtoras pertencem aos gêneros *Alternaria* sp (muitas espécies), *Aspergillus* sp (mais de vinte espécies), *Chaetomium globosum*, *Cladosporium* sp (pelo menos duas espécies), *Claviceps* sp (pelo menos duas espécies), *Fusarium* sp (pelo menos seis espécies), *Gibberella zea*, *Paecilomyces variota* (*Byssochlamys fulva*), *Penicillium* sp (mais de quinze espécies), *Myrothecium* sp (pelo menos duas espécies), *Phoma herbarium*, *Pithomyces chartarum*, *Rhizopus oryzae*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Stachybothys atra* e *Trichoderma lignorum* (SCUSSEL, 2000). Entretanto os gêneros *Aspergillus* sp, *Penicillium* sp e *Fusarium* sp são os mais freqüentemente associados a micotoxinas que ocorrem naturalmente em cereais, grãos e sementes em níveis que tornam os alimentos impróprios para consumo (APHA, 2001).

As principais micotoxinas podem ser divididas em três grandes grupos, ou seja, aflatoxinas, fusariotoxinas (zearalenona, tricotecenos e fumonisina) e ocratoxinas (Quadro 2).

## QUADRO 2 – PRINCIPAIS GRUPOS DE MICOTOXINAS E ESPÉCIES DE FUNGOS PRODUTORES

MICOTOXINA	ESPÉCIE PRODUTORA
Aflatoxina B1 e B2	<i>Aspergillus flavus</i>
Aflatoxina B1, B2, G1 e G2	<i>Aspergillus parasiticus</i> <i>Aspergillus nomius</i>
Zearalenona	<i>Fusarium graminearum</i> <i>Fusarium culmorum</i> <i>Fusarium crookwellense</i>
Tricotecenos	<i>Fusarium graminearum</i> <i>Fusarium culmorum</i> <i>Fusarium crookwellense</i>
Fumonisina	<i>Fusarium moniliforme</i> <i>Fusarium proliferatum</i> <i>Fusarium subglutinans</i>
Ocratoxina	<i>Aspergillus ochraceus</i> <i>Aspergillus niger</i> var. <i>niger</i> <i>Penicillium verrucosum</i> <i>Penicillium viridicatum</i>

Fonte APHA, 2001.

### 2.2.2 Leveduras

As leveduras são geralmente unicelulares, de forma esférica, elíptica ou filamentosa. O tamanho varia de 1 a 5  $\mu\text{m}$  de diâmetro a 5-30  $\mu\text{m}$  de comprimento (BORZANI et al., 2001). Compõem a microbiota natural de frutas e vegetais sendo a colonização influenciada pelas condições ambientais, de colheita ou de armazenamento (SKINNER, 1980).

Segundo LACAZ (1998), as colônias apresentam coloração variada (branca, vermelha, amarela e preta) caracterizadas por reprodução mediante brotamento ou cissiparidade. Raramente formam micélio rudimentar e nunca micélio bem desenvolvido, sem formação de hifas aéreas, podendo ocorrer em algumas espécies a formação de pseudo-hifas.

As leveduras apresentam estruturas relativamente simples porém de identificação mais complexa quando comparada a de outros fungos, sendo baseada em diferenças morfológicas e propriedades bioquímicas (HERITAGE et al., 1996).

Segundo LEITÃO et al. (1988), a ocorrência de espécies patogênicas em alimentos é praticamente desconhecida; sendo consideradas basicamente como agentes de deterioração.

Condições seletivas para proliferação são condicionadas ao pH ácido (ótimo entre 4,0 e 4,5), valores de atividade de água superiores a 0,94, temperatura entre 25°C e 28°C e substratos ricos em carboidratos (particularmente açúcares) razão pela qual tem como principal habitat a superfície de frutos e vegetais.

A utilização dos carboidratos pode ocorrer por meio de anaerobiose ou então por processo respiratório ou oxidativo.

Vários são os açúcares passíveis de utilização no processo metabólico, sendo o etanol e o gás carbônico os principais produtos finais da atividade fermentativa sobre os açúcares. Entre as leveduras oxidativas destacam-se *Candida* sp, *Pichia* sp, *Hansenula* sp, *Debaromyces* sp.

### 2.3 BACTÉRIAS LÁCTICAS

São consideradas como bactérias lácticas todas as bactérias Gram positivas, anaeróbias facultativas, capazes de produzir ácido láctico como principal produto final do metabolismo (PERRAUD, 1996). Esse grupo de bactérias é amplamente distribuído na natureza e por reduzirem o pH até valores próximos a 4 são empregadas na elaboração de alimentos fermentados (MACEDO, 1997).

Trata-se de microrganismos procariontes, heterotróficos, não esporulados e aerotolerantes. Apresentam metabolismo fermentativo com produção exclusiva de ácido láctico (homolácticas), de ácido láctico e acético (heterolácticas facultativas) ou ácido láctico, ácido acético, etanol e gás carbônico (heterolácticas estritas) (DELLAGLIO, 1994).

Entre as espécies encontradas em vegetais destaca-se o *Lactobacillus brevis*, caracterizado por apresentar em meio sólido colônias pequenas que ao microscópio

revelam forma de bastonetes com extremidades arredondadas. Ocorrem isolados ou em pequenas cadeias, sendo heterofermentativos (HAMMES e VOGEL, 1995).

#### 2.4 MICRORGANISMOS ASSOCIADOS AO CAFÉ NAS FASES DE PRÉ E PÓS-COLHEITA DOS GRÃOS

LOPEZ-GARAY (1988), isolou os microrganismos presentes em grãos de café cultivados na Bolívia e demonstrou que a qualidade da bebida pode ser mantida desde que durante a estocagem a contagem de microrganismos seja inferior a  $10^5$  unidades formadoras de colônias por grama.

Os gêneros e espécies de bactérias lácticas considerados freqüentes por AVALLONE et al. (2001), no café, foram *Leuconostoc* sp, *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus brevis*, já a microbiota fúngica apresenta-se bem mais diversificada e heterogênea.

PEE e CASTELEIN (1971) isolaram as leveduras presentes em amostras de café robusta na República do Congo e identificaram oito espécies: *Candida guilliermondii*, *Candida parapsilopsis*, *Candida pelliculosa*, *Candida famata*, *Candida tropicalis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces marxianus* e *Rhodotorula mucilaginosa*.

SILVA et al (2000), isolaram a microbiota presente em cerejas de café de 15 localidades de Minas Gerais, nas fases de pré e pós colheita e identificaram 624 cepas. Desse total, 273 (43,8%) eram colônias de bactérias, 100 (16,1%) de leveduras e 251 (40,1%) de fungos filamentosos. Entre as leveduras os gêneros isolados foram *Pichia* sp (38,9%), *Candida* sp (22,3%), *Arxula* sp (18,9%) e *Saccharomycopsis* sp (9,7%). Entre os fungos filamentosos os gêneros isolados foram *Cladosporium* sp (39,7%), *Fusarium* sp (34,2%), *Penicillium* sp (28,8%) e *Aspergillus* sp (2,7%).

ALVES e CASTRO (1998) isolaram fungos presentes nas fases de maturação (verde-cana, cereja, passa e seco no pé), chão e beneficiado de cafés cultivados na cidade de Lavras, Minas Gerais. Identificaram *Colletotrichum* sp, *Phoma* sp, *Cercospora* sp, *Fusarium* sp, *Cladosporium* sp, *Penicillium* sp e *Aspergillus* sp. *Colletotrichum* sp e *Phoma* sp foram isolados das fases verde-cana e cereja, já

*Cercospora* sp apenas da fase verde-cana. A ausência desses fungos nas fases posteriores pode ser devido a gêneros como *Fusarium* sp, *Penicillium* sp e *Cladosporium* sp aproveitarem-se das injúrias provocadas nos frutos pelos primeiros para penetrarem e colonizarem os tecidos mais rapidamente.

*Fusarium* sp foi encontrado em todas as fases, sendo que maiores percentagens verificadas nas fases cereja, passas, seco no pé e chão.

*Penicillium* sp presente em todas as fases, apresentou maior percentagem no café beneficiado, talvez por suportar baixa umidade (condição de armazenamento).

*Cladosporium* sp também foi encontrado em todas as fases, porém com maior incidência nas fases passas e seco no pé.

Quanto ao *Aspergillus* sp, as espécies *Aspergillus niger* e *Aspergillus ochraceus* (relacionadas com bebida de pior qualidade), foram encontradas a partir da fase de passa, com maior incidência na fase de café do chão e beneficiado.

Segundo DAIVASIKAMANI e KANNAN (1986), a presença dos gêneros *Cladosporium* sp, *Penicillium* sp e *Aspergillus* sp é associada aos grãos de café na fase pós-colheita.

TANIWAKI et al. (2003), isolaram e identificaram as espécies de fungos filamentosos presentes em amostras de grãos de *Coffea arabica* provenientes de três regiões do estado de São Paulo (Parapuã, Franca e Pirajú) nos estágios de cereja na árvore, cereja no chão, passas na árvore, passas no chão, terreiro e tulha.

Os gêneros isolados foram *Penicillium* sp, *Fusarium* sp, *Aspergillus niger* e *Aspergillus ochraceus* (produtor de ocratoxina A). A frequência de *Aspergillus ochraceus* foi menor em grãos da árvore e solo, contudo na fase de secagem (terreiro e tulha) houve uma predominância dessa espécie.

TANIWAKI, BANHE e IAMANAKA (1998) analisaram amostras de café provenientes de Minas Gerais e isolaram *Alternaria alternata*, *Fusarium incarnatum*, *Phoma sorghina*, *Penicillium aurantiogriseum* e *Aspergillus ochraceus*

ROUSSOS (1995) isolou e identificou os gêneros *Aspergillus* sp, *Penicillium* sp, *Trichoderma* sp, *Fusarium* sp e *Humicola* sp de amostras de cerejas de café provenientes do México.

MILISVEC et al. (1983), isolaram e identificaram as espécies de fungos filamentosos presentes em 865 amostras de grãos de café verde, provenientes de

26 países, reportando que 100% estava contaminada com *Aspergillus ochraceus* (Quadro 3).

**QUADRO 3 - CONTAMINAÇÃO DE GRÃOS DE CAFÉ VERDE POR *Aspergillus ochraceus* EM AMOSTRAS PROVENIENTES DE 26 PAÍSES**

País	Número de amostras	% contaminada por
Haiti	11	100,0
Mexico	3	92,7
Peru	50	90,9
Cingapura	3	90,0
Paraguai	22	89,2
Etiópia	11	88,9
Honduras	25	88,6
Argentina	15	85,7
Colômbia	129	83,4
Brasil	251	80,8
República Dominicana	30	78,1
Madagascar	7	77,7
Zaire	14	71,7
Quênia	10	71,2
Venezuela	5	69,6
Uganda	29	67,2
Nicarágua	5	64,4
Equador	39	63,4
Indonésia	66	60,9
Filipinas	9	60,4
Índia	6	47,3
Guatemala	55	46,7
Costa Rica	21	42,7
El Salvador	40	40,5
Tanzânia	3	35,3
Panamá	6	29,0

Fonte: MILISVEC et al ,1983

#### 2.4.1 *Aspergillus ochraceus* K. Wilh

O *Aspergillus ochraceus* K.Wilh (classificado também como *Aspergillus alutaceus*) pertence ao Reino Mycetalia, Sub-divisão Deuteromycotina, Classe

Hyphomycetes (conídios formados em conidióforos), Família Aspergillaceae, Gênero *Aspergillus* sp e Espécie *Aspergillus ochraceus* (POHLAND et al., 1992).

Em meio sólido as colônias são circulares com aproximadamente 40-55 mm de diâmetro, planas ou sulcadas, micélio branco, membrana do conidióforo caracteristicamente rugosa, amarelo ocre a amarelo dourado com conídios da mesma tonalidade (Figura 3) (LACAZ, 1998).

**FIGURA 3 - ASPECTO MORFOLÓGICO DA COLÔNIA DE *Aspergillus ochraceus* EM ÁGAR DICLORAN ROSA DE BENGALA CLORANFENICOL APÓS 10 DIAS DE INCUBAÇÃO A 25°C**

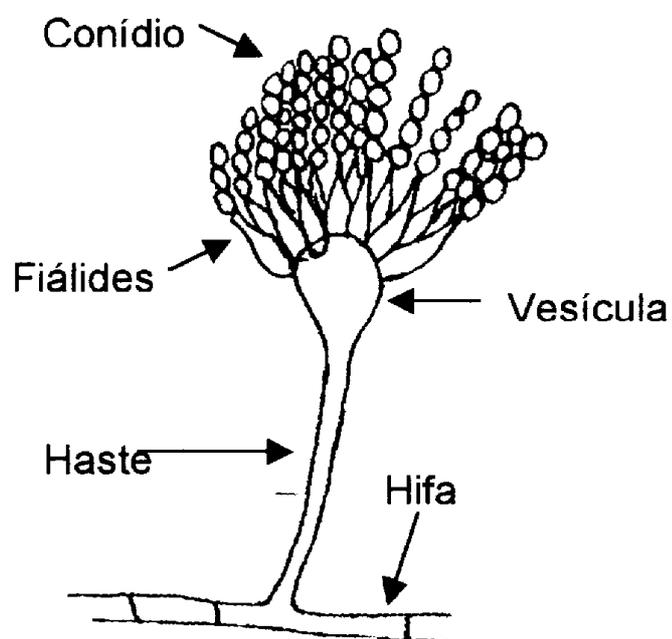


FONTE: fotografia tirada por BEUX, M.R.

Microscopicamente os conidióforos são eretos, isolados, terminando em dilatação globosa ou clavada (vesícula), da qual nascem as fiálides (mono ou bisseriadas) em toda a superfície, em disposição radiada ou colunar. Os conídios são unicelulares, globosos, catenulados, lisos ou equinulados (Figura 4) (MINAMI, 2003).

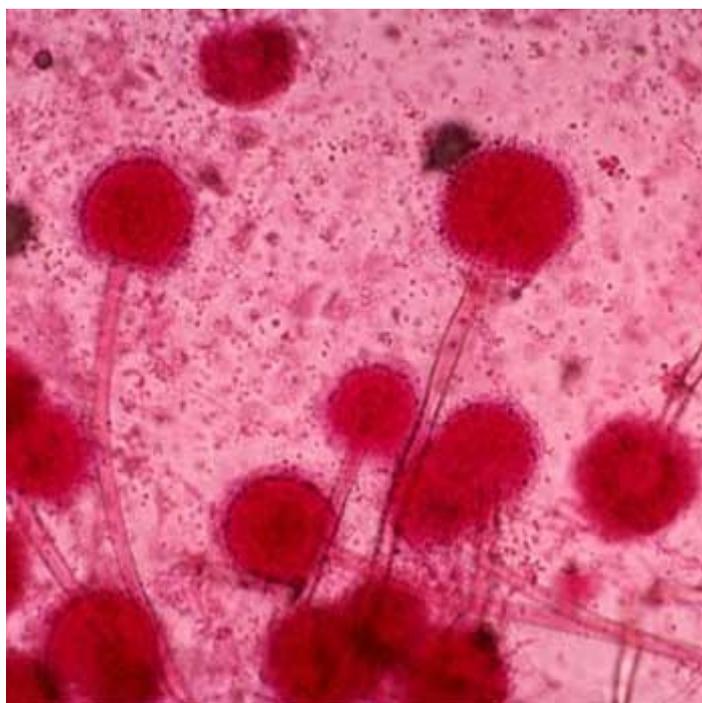
**FIGURA 4 - ASPECTO MORFOLÓGICO DO MICÉLIO REPRODUTIVO DE *Aspergillus* sp (a) E DO *Aspergillus ochraceus* (b)**

a)



Fonte: MINAMI,2003

b)



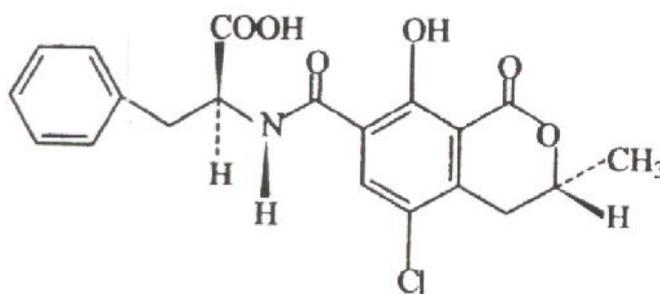
Fonte: MINAMI,2003

Como características fisiológicas, o *Aspergillus ochraceus* desenvolve-se em temperaturas entre 8°C e 37°C (temperatura ótima 24-31°C), atividade de água mínima de 0,76 a 25°C (aw ótima 0,95-0,99) e pH entre 3-10 (PITT, 1997).

#### 2.4.2 Ocratoxina A

A ocratoxina A, metabólito tóxico produzido por determinadas cepas de *Penicillium* sp e *Aspergillus* sp, sendo a principal espécie produtora o *Aspergillus ochraceus* (ABARCA et al., 2001 e PRADO,2003)(Figura 5).

**FIGURA 5 – OCRATOXINA A**



Segundo SCUSSEL (1998), o grupo das ocratoxinas divide-se em ocratoxina A, ocratoxina B e ocratoxina C. Quimicamente são compostos que apresentam uma  $\beta$ -fenilalanina ligada a uma isocumarina por ligação amida. A ocratoxina A apresenta fluorescência verde e possui uma molécula de Cloro na fórmula (radical R1), responsável pelo caráter tóxico. A ocratoxina B apresenta fluorescência azulada, não sendo tóxica pela ausência da molécula de Cloro.

A ocratoxina C com fluorescência verde, constitui um etil éter da ocratoxina A, sendo muito menos tóxica que essa.

A ocratoxina A tem sido encontrada em cereais diversos, alimentos de origem vegetal, cerveja, vinho, suco de uva, grãos de café verde e torrado e café solúvel (FURLANI, SOARES e OLIVEIRA, 1999).

A ocratoxina A é nefrotóxica e tem ação teratogênica. O fígado é um alvo secundário da toxina (SCUSSEL, 1998). A nefropatia endêmica dos Balcãs, doença

degenerativa dos rins em humanos, tem sido correlacionada com altos níveis de contaminação por ocratoxina A nos alimentos daquela região (FURLANI, SOARES e OLIVEIRA, 1999).

Apesar do *Aspergillus ochraceus* desenvolver-se a partir de uma atividade de água de 0,76, a ocratoxina é produzida a partir de 0,85 (sendo 0,97 a  $a_w$  ótima). A temperatura em que ocorre a 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, 1996).

FURLANI, OLIVEIRA e SOARES (1998), consideram que produção da ocratoxina A ocorre no café principalmente na etapa pós-colheita, quando os grãos úmidos são transportados e armazenados em condições de umidade relativa do ar alta, independentemente de espécie (*C. arabica* ou *C. canephora*).

Segundo CLARKE e MACRAE (1987), a umidade relativa do ar deve ser inferior a 74%, para evitar o desenvolvimento de fungos como *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus* e *Rhizopus* sp.

De acordo com a Instrução Normativa n. 8 de 11 de junho de 2003, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2003), que aprova o regulamento técnico de identidade e qualidade do café beneficiado grão cru (ou verde), para manter a sanidade dos grãos o teor de umidade não deve ultrapassar 12%, não mencionando valores de atividade de água.

Diversos pesquisadores isolaram cepas de fungos em amostras de grãos de café verde e torrado avaliando a produção de ocratoxina A. Das 991 cepas de *Aspergillus* sp e *Penicillium* sp de amostras de grãos de café verde no Egito, isoladas por ABD-ALLA e SAHAB (1997), 45 (4,54%) eram produtoras de Ocratoxina A. De 25 amostras de grãos de café exportados para a Suíça, avaliadas por STUDER-ROHR et al. (1995), 13 (52%) continham ocratoxina A em níveis de até 7,8 ng/g.

MICCO et al. (1989) avaliaram 627 amostras de grãos de café verde provenientes do Brasil, Costa Rica, México e África. Afirmaram que 56 (9%), estavam contaminadas com ocratoxina A em níveis que variaram entre 0,5 e 360 ng/g e que a incidência independe da espécie (*C. arabica* ou *C. canephora*) cultivada.

FURLANI, OLIVEIRA e SOARES (1998) analisaram 50 amostras de café verde provenientes do Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Espírito Santo, Roraima e

Bahia. Encontraram ocratoxina em 15 (30%) amostras, em níveis que variaram entre 0,8 ng/g a 117,4 ng/g (Quadro 4).

A molécula da ocratoxina A é termoestável, solúvel em solventes polares e apolares sendo a água bom líquido extrator (SCUSSEL, 2000).

TSUBOUCHI et al. (1988), isolaram uma cepa de *Aspergillus ochraceus* produtora de ocratoxina A e avaliaram sua estabilidade ao calor após torrefação a 200°C dos grãos de café verde artificialmente contaminados. Verificaram que a ocratoxina foi reduzida em apenas 12%.

**QUADRO 4 - CONTAMINAÇÃO POR OCRATOXINA A EM AMOSTRAS DE CAFÉ VERDE PROVENIENTES DO PARANÁ, SÃO PAULO, MINAS GERAIS, ESPÍRITO SANTO, RORAIMA E BAHIA**

Estado	Espécie	Número de amostras analisadas	Número de amostras positivas para ocratoxina
Paraná	<i>Coffea arabica</i>	21	08
São Paulo	<i>Coffea arabica</i>	06	00
Minas Gerais	<i>Coffea arabica</i>	15	03
Espírito Santo	<i>Coffea canephora</i>	05	01
Roraima	<i>Coffea canephora</i>	02	02
Bahia	<i>Coffea arabica</i>	01	01

FONTE: FURLANI, OLIVEIRA e SOARES (1998)

BURDASPAL e LEGARDA (1998), analisaram 37 amostras de café torrado comercializados na Espanha concluindo que todas apresentaram contaminação (níveis de ocratoxina A entre 0,19 ng/g e 5,65 ng/g).

PRADO (2000) concluiu que 73 % das amostras de café torrado comercializados em Minas Gerais apresentam contaminação por ocratoxina A entre 0,31 ng/g a 5,87 ng/g.

STEGEN et al. (1997), avaliaram a presença de ocratoxina em 633 amostras de café solúvel comercializadas em diversos países da Europa, sendo que 299 (47,23%) apresentaram resultado positivo (04 apresentaram níveis entre 10 ng/g e 27,2 ng/g e as demais inferiores a 10 ng/g).

PATEL et al. (1997) avaliaram a presença de ocratoxina A em 100 amostras de café solúvel comercializados na Inglaterra reportando que 64 apresentaram níveis entre 0,1 ng/g e 8 ng/g.

Segundo VARGAS, SANTOS e PITTET (2003), nem o Brasil, principal consumidor e exportador, nem os países importadores de café, dispõem de um plano de avaliação da contaminação de lotes de café verdes em grãos por ocratoxina A.

Com exceção da Itália, que em 1996 propôs um limite de 4 ng/g de ocratoxina A, os demais países não possuem padrões legais.

A União Européia estabeleceu em março de 2002 limites de tolerância para essa micotoxina em cereais e passas e para o café estava prevista a padronização para dezembro de 2003.

Países como Espanha, Itália e Holanda vêm avaliando a qualidade de lotes de cafés brasileiros e em 2002 dois alertas máximos (em março e abril), foram expedidos pela União Européia ao Itamarati-Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, sobre a devolução de lotes de café brasileiro exportados com níveis indesejáveis de ocratoxina A (>10 ng/g).

Para minimizar o impacto sobre a exportação do café brasileiro é necessário além de identificar os fatores críticos que contribuem na contaminação, adequar a metodologia empregada na quantificação da ocratoxina A (a União Européia propõe um limite de tolerância de 5 ng/g).

Para que limites mais baixos sejam alcançados, vários procedimentos de quantificação da ocratoxina A em café tem sido propostos. O café é uma matriz especialmente complexa e uma limpeza adequada do extrato para remoção dos interferentes faz-se necessária (FURLANI, SOARES e OLIVEIRA, 1999).

Segundo a APHA (2001), os extratos devem ser adequadamente purificados para remover substâncias presentes nos substratos como lipídios e pigmentos que possam interferir nas técnicas analíticas. A quantificação pode ser realizada por cromatografia, cromatografia em camada delgada (TLC), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), cromatografia gasosa (GC) ou cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GCMS).e a detecção, dependendo da metodologia, realizada por luz ultravioleta, fluorescência, eletroquímica ou ionização.

CANTAFORA et al. (1983), introduziram a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência para separar a ocratoxina A e ampliaram o limite de detecção em 100 vezes (0,2 ng/g) quando comparado ao do método oficial (de 20 ng/g), descrito primeiramente em 1975 e mantido pelos procedimentos analíticos contidos na Association of Official Agricultural Chemists (AOAC, 1997), baseado em cromatografia em camada delgada.

TERADA et al. (1986), também utilizando cromatografia de líquida de alta eficiência com fluorescência, testaram colunas de extração em fase sólida com octadecilsilil para limpeza dos extratos de grãos de café (verde e torrado), café instantâneo e café coado. O limite de detecção situou-se entre 0,2 e 5 ng/g e a recuperação foi de no mínimo 80,7%.

NAKAJIMA et al. (1990) desenvolveram uma metodologia que utiliza colunas de imunoafinidade para limpeza do extrato de amostras de café em grãos, café instantâneo em pó e bebida de café enlatada. Obtiveram limites de detecção de 0,5ng/g para cafés em grãos e cafés solúveis e recuperações acima de 98%.

PITET et al. (1996) propuseram um procedimento para analisar a ocratoxina A em amostras de café verde em grãos, café torrado em grãos e café solúvel que também envolve limpeza em colunas de imunoafinidade. Os cromatogramas mostraram-se sem interferentes na região da ocratoxina A, o limite de detecção foi de 0,2 ng/g e a recuperação de no mínimo 80%.

FURLANI, SOARES e OLIVEIRA (1999) avaliaram diferentes solventes de extração, assim como técnicas para limpeza dos extratos para determinação de ocratoxina A, tanto clássicas (clarificação, partição) como aquelas envolvendo colunas para extração em fase sólida (sílica, octadecilsilil e imunoafinidade) para determinação de ocratoxina A em café verde e torrado. Concluíram que apenas as colunas de imunoafinidade foram capazes de remover os interferentes existentes nos extratos de café, permitindo a determinação de ocratoxina A por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência em níveis de 0,7 ng/g.

Visando padronizar a metodologia, um estudo interlaboratorial colaborativo está sendo realizado por vários laboratórios. Os resultados preliminares demonstraram-se satisfatórios. A metodologia sugerida fundamenta-se na extração da ocratoxina A com metanol e uma solução aquosa de bicarbonato de sódio 3%, filtração e diluição do extrato com solução tampão de salina fosfatada (PBS-

phosphate buffered saline), purificação do em coluna de imunoafinidade contendo anticorpos específicos, lavagem, eluição com metanol e quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência, obtendo-se limite de detecção de 0,25 ng/g (VARGAS et al., 2002).

#### 2.4.3 Grãos contaminados com micotoxinas – alternativas de descontaminação

Segundo LAZZARI (1997), uma vez que grãos ou rações estejam contaminados com micotoxinas, o lote está comprometido.

Técnicas de diluição têm sido empregadas, porém quando o nível de micotoxinas é muito alto, não são recomendadas em virtude do perigo na manipulação. Consistem em misturar os grãos de lotes pouco contaminados com os de lotes que apresentam níveis elevados de micotoxinas.

Separar fisicamente as sementes ou grãos não é considerado adequado, pois os mesmos podem apresentar aparência normal e estarem altamente contaminados.

Segundo PETERSSON e SCHNÜRER (1995) a introdução em grãos e alimentos de microrganismos capazes de crescer competindo e reduzindo o desenvolvimento de linhagens toxigênicas constitui alternativa viável para minimizar os prejuízos causados pelos fungos.

#### 2.4.4 Microrganismos com ação fungistática contra fungos toxigênicos

Entre os microrganismos, as leveduras têm revelado habilidade em competir com a microbiota presente em produtos armazenados em silos, inibindo ou reduzindo seu desenvolvimento. Essa habilidade está sendo atribuída a rápida taxa de crescimento, vinculada ao esgotamento de carboidratos fermentescíveis do substrato (PASTER et al., 1993).

WILSON e WISNIEWSKI (1989) relataram a possibilidade do uso de microrganismos antagonistas para controlar doenças fúngicas de pós-colheita em frutas.

Quando comparada a outros microrganismos, *Pichia guilliermondii* apresentou maior potencial de competição e antagonismo, sendo empregada no controle do

apodrecimento de maçãs (causado por fungos), inoculada na superfície da casca (WILSON e CHALUTZ, 1989).

BJÖRNBERG e SCHNÜRER (1993) afirmaram que a inoculação “in vitro” de *Pichia anomala* foi capaz de inibir o desenvolvimento de *Aspergillus candidus*.

ONO et al. (1997) isolaram do solo uma cepa de *Streptomyces* sp (MRI 142) capaz de inibir o desenvolvimento de *Aspergillus parasiticus* tanto em meio líquido como em ágar, impedindo a formação de aflatoxina.

Para isolar os microrganismos e avaliar o potencial antagônico é necessário aplicar técnicas de fermentação.

## 2.5 FERMENTAÇÃO

Segundo FERREIRA e SOUSA (1998), durante centenas de anos alimentos fermentados foram produzidos por microrganismos desconhecidos. Só no século passado é que os princípios da microbiologia começaram a ser desvendados, permitindo o isolamento e a cultura individual de espécies. Essas primeiras aplicações de microrganismos selecionados deram origem a biotecnologia das fermentações, possibilitando o desenvolvimento de processos de produção em escala comercial.

Quatro principais classes de compostos produzidos industrialmente por fermentação, a partir de linhagens selecionadas de microrganismos, sob condições otimizadas podem ser diferenciadas: metabólitos primários, metabólitos secundários, enzimas e microrganismos (Quadro 5).

BLACK (2002) considera fermentação como o processo no qual carboidratos e substâncias similares oxidam, liberando energia na ausência de aceptores externos de elétrons. Nesse processo as alterações químicas produzidas no substrato orgânico são ocasionadas pelas enzimas sintetizadas pelos microrganismos fermentadores.

TORTORA et al (2000) define como fermentação qualquer processo metabólico que libere energia de um açúcar ou outra molécula orgânica, não requerendo oxigênio ou outro sistema transportador de elétrons e utiliza uma molécula orgânica comoceptor final de elétrons.

## QUADRO 5 - PRODUTOS COM INTERESSE INDUSTRIAL PRODUZIDOS POR MICRORGANISMOS

CLASSE	PRODUTO	APLICAÇÃO	MICRORGANISMO
Metabolitos primários	ácido cítrico	Acidulante, antioxidante	<i>Aspergillus niger</i>
	ácido itaconico	Detergentes e plásticos	<i>Aspergillus itaconicus</i> <i>Aspergillus terreus</i> <i>Ustilago zea</i>
	ácido fumarico	Acidulante	<i>Rhizopus arrhizus</i> <i>Cândida blankii</i>
	ácido glutamico	Indústria alimentícia	<i>Aspergillus oryzae</i> <i>Rhodotorula glutinis</i>
	Triptofano	Indústria alimentícia	<i>Hansenula anômala</i>
	Etanol	Bebidas e solventes	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Zymomonas sp</i>
Metabolitos secundários	Penicilina G e V	Indústria farmacêutica	<i>Penicillium chrysogenum</i>
	Penicilina N	Indústria farmacêutica	<i>Emericellopsis sp</i>
	Cefalosporina C	Indústria farmacêutica	<i>Cephalosporium acremonium</i>
	Acido fusidico	Indústria farmacêutica	<i>Fusidium coccineum</i>
Enzimas	Glucose oxidase	Produção de ácido gluconico	<i>Aspergillus niger</i>
	$\alpha$ -amilase	Panificação	<i>Aspergillus oryzae</i>
	$\beta$ -glucosidase	Sacarificação	<i>Trichoderma reesei</i>
	Celulase	Indústria alimentícia	<i>Cellulomonas sp</i>
	Lipase	Indústria alimentícia	<i>Mucor sp</i> <i>Rhizopus sp</i>
	Pectinase	Sucos de fruta	<i>Aspergillus sp</i> <i>Botrytis cinerea</i>
	Protease	Detergente	<i>Bacillus licheniformis</i>
	Invertase	Indústria alimentícia	<i>Saccharomyces sp</i>
	Lactase	Indústria alimentícia	<i>Aspergillus niger</i> <i>Kluyveromyces lactis</i>
Microrganismos	Single cell protein	Alimentação animal	<i>Candida utilis</i> <i>Paecilomyces sp</i>
	Cogumelos	Indústria alimentícia	<i>Agaricus campestris</i>
	Leveduras	Panificação	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

FONTE: FERREIRA E SOUSA, 1998

### 2.5.1 Fermentação submersa

Na fermentação ou cultura submersa o substrato está dissolvido em fase líquida e o desenvolvimento do microrganismo ocorre na presença de água livre. Nesse tipo de fermentação o meio de cultura está qualitativamente e quantitativamente mais equilibrado e homogêneo quando comparado com o substrato de fermentação no estado sólido (WOICIECHOWSKI, 1997).

No instante inicial, a solução nutriente esterilizada é inoculada com o microrganismo e incubada de modo a permitir que a fermentação ocorra sob condições ótimas. No decorrer do processo fermentativo por aerobiose nada é adicionado, exceto oxigênio (SCHMIDELL et al., 2001).

### 2.5.2 Cultura no estado sólido

Fungos filamentosos, leveduras e bactérias podem ser aplicados em processos de fermentação no estado sólido (SOCCOL, 1994).

A fermentação no estado sólido caracteriza-se pelo crescimento do microrganismo em substratos sólidos na ausência de líquido na forma livre. É considerada mais natural que outros tipos de fermentações, porque seus processos assemelham-se às condições sob as quais a maioria dos microrganismos cresce na natureza (MACHADO, 2002).

A matriz porosa pode ser constituída de substrato úmido ou de suporte inerte capaz de absorver os nutrientes. A umidade relativa depende do nível máximo de retenção de água do substrato (LONSANE et al., 1985).

O substrato deve conter umidade suficiente, existente na forma adsorvida da matriz sólida (PANDEY et al, 2001).

Fungos filamentosos como *Trichoderma* sp ou *Aspergillus* sp tem sido empregados na produção de enzimas, *Mucor* sp ou *Rhizopus* sp na produção de renina microbiana, *Penicillium* sp na produção de penicilina e *Fusarium* sp ou *Giberella* sp na obtenção de ácido giberélico (SCHMIDELL et al., 2001).

Diversas matérias primas podem ser empregadas e a escolha da mais adequada depende do produto final desejado (Quadro 6).

## QUADRO 6 - MATÉRIAS-PRIMAS EMPREGADAS EM FERMENTAÇÃO E PRODUTOS FINAIS

MATÉRIA PRIMA	PRODUTO FINAL
Farelo e palha de milho Farinha e farelo de soja Resíduos sólidos do processamento de mandioca	Enzimas
Sorgo Polpa de beterraba Bagaço de maca	Álcool
Bagaço de cana Água de maceração de milho Lactose Sacarose	Antibióticos

FONTE: SCHMIDELL (2001).

Para obtenção de produtos com características constantes e uniformes é necessário controlar a umidade e a atividade água do substrato.

O teor de umidade pode variar entre 18% e 85%, sendo determinado em função do poder de absorção do substrato,

Durante a fermentação ocorre perda de umidade devido a evaporação e as atividades metabólicas microbianas. Essa perda pode ser minimizada pela adição de água estéril em intervalos constantes de tempo ou pela manutenção da umidade atmosférica entre 90% e 97% através de sistemas de umidificação.

Durante a fermentação no estado sólido, altas atividades de água (>0,9) favorecem a esporulação enquanto que baixas atividades estimulam o crescimento miceliano (<0,75). Em termos gerais os fungos possuem uma atividade de água mínima de 0,7 enquanto que para as bactérias o valor está próximo a 0,9 (SCHMIDELL et al., 2001).

### 2.5.3 Crescimento microbiano

Considera-se como crescimento, em sistemas biológicos, o aumento de massa resultante de um acréscimo ordenado de todos os componentes de

protoplasma. Na medida do crescimento de uma população, os valores obtidos podem ser expressos como biomassa ou contagem de microrganismos viáveis (BORZANI et al., 2001).

#### 2.5.3.1 Biomassa

A biomassa, parâmetro fundamental para a caracterização do crescimento microbiano, pode ser estimada direta ou indiretamente. A determinação direta pode ser empregada em fermentação submersa mediante determinação do peso seco de uma suspensão, porém em cultura no estado sólido é muito complexa devido a dificuldades de separação entre a biomassa microbiana e o substrato. Isso é especialmente válido para processos envolvendo fungos, pois suas hifas penetram, no substrato. A determinação indireta é realizada através da quantificação de componentes ou medida metabólica após fermentação (MACHADO, 2002).

#### 2.5.3.2 Contagem de microrganismos viáveis

A contagem de microrganismos viáveis é o método mais empregado para contar bactérias e fungos. Diluições adequadas da suspensão inicial são semeadas na superfície de meios de cultura sólidos. Após incubação as colônias formadas são contadas e o resultado expresso como unidades formadoras de colônias (BORZANI et al., 2001).

#### 2.5.3.3 Cinética de processos fermentativos

O estudo cinético de um processo fermentativo consiste inicialmente na análise da evolução dos valores de concentração de um ou mais componentes do sistema de cultivo, em função do tempo de fermentação. Entendem-se como componentes, o microrganismo (ou a biomassa), os produtos do metabolismo (ou

metabólitos) e os nutrientes ou substrato que compõem o meio de cultura (SCHMIDELL et al., 2001).

Após inoculação de um microrganismo em um meio de cultura, sob temperatura controlada e agitação adequada pode-se associar os metabólitos formados ao crescimento e avaliar se o produto formado está ou não diretamente ligado à decomposição do substrato inicial (SCHMIDELL et al., 2001).

Na seqüência de reações enzimáticas rotas metabólicas alternativas aparecem tanto para propiciar a formação de materiais necessários a constituição da biomassa como para a formação de outros produtos de interesse metabólico relacionados direta ou indiretamente com a adaptação e sobrevivência (LIMA et al., 2001).

No cultivo de microrganismos de interesse alimentício ou industrial é conveniente determinar as substâncias voláteis geradas como consequência do metabolismo. Para essa finalidade utilizam-se procedimentos cromatográficos, entre os quais a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (KUNZ, 1986).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Este experimento foi realizado nos Laboratórios do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos (CEPPA), no Laboratório de Processos Biotecnológicos da Universidade Federal do Paraná e no Laboratório de Físico-Química de Alimentos da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, durante o período de julho de 2001 a julho de 2003.

#### 3.1 FRUTOS DE CAFÉ

Os frutos (“cerejas”) de café utilizados foram enviados ao Laboratório de Processos Biotecnológicos durante o período de 2001-2002 sendo provenientes dos Estados de Minas Gerais (Araguari, Terra Nova e Viçosa), Bahia (Barra do Choça, Barreiras, Buerarema, Correntina, Ilhéus e Itamaraju), Espírito Santo (Venda Nova dos Imigrantes), São Paulo (Batatais e Campinas) e Paraná (Rolândia), sendo codificados por números de 01 a 13, conforme ordem de recebimento.

##### 3.1.1 Características físico-químicas das cerejas de café

###### 3.1.1.1 pH

O pH foi medido sobre uma suspensão obtida após homogeneização de 5 g da amostra diluída em 50 mL de água destilada. Método potenciométrico (SOCCOL, 1994).

###### 3.1.1.2 Açúcares totais

A quantificação dos açúcares foi realizada conforme IAL, 1985.

###### 3.1.1.3 Composição centesimal

#### 3.1.1.3.1 Proteínas

A quantificação das proteínas foi realizada conforme IAL, 1985.

#### 3.1.1.3.2 Lipídios

A quantificação dos lipídios foi realizada conforme IAL, 1985.

#### 3.1.1.3.3 Resíduo mineral fixo (cinzas)

A quantificação do resíduo mineral fixo foi realizada conforme IAL, 1985.

#### 3.1.1.3.4 Umidade

O teor de umidade foi determinado conforme IAL, 1985.

#### 3.1.1.3.5 Carboidratos

Os carboidratos foram calculados por diferença, subtraindo-se de 100 a soma das porcentagens de umidade, proteínas, lipídios fibras e cinzas (FREITAS et al., 1979).

#### 3.1.1.3.6 Atividade de água

A atividade de água foi determinada em equipamento Aqua-lab CX-2.

### 3.2 ISOLAMENTO DA MICROBIOTA (LEVEDURAS) NATURALMENTE PRESENTES NAS CEREJAS DE CAFÉ

As amostras de cerejas de café (codificadas de 01 a 13) foram submetidas a fermentação em caldo para favorecer o desenvolvimento e isolamento das espécies de leveduras naturalmente presentes.

### 3.2.1 Preparo do caldo de fermentação

Após recebimento, as cerejas foram selecionadas e o envoltório (casca, polpa e mucilagem) separados manualmente do grão. De cada amostra foram pesados 25 g do envoltório que foi macerado em gral com pistilo. Ao macerado foram acrescentados 100 mL de água destilada. O conteúdo do gral foi filtrado em funil, o volume completado para 150 mL com água destilada e distribuído em três erlenmeyers de 250 mL (50 mL/erlenmeyer). Os erlenmeyers foram incubados em “shaker” por 3 dias/28°C/120 rpm (PAGNONCELLI, 2002).

### 3.2.2 Preparo dos meios de cultura

Foram utilizados para isolamento das leveduras seis diferentes meios de cultura, preparados conforme especificado no Quadro 7.

#### **QUADRO 7 - COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS PARA ISOLAMENTO DAS CEPAS DE LEVEDURAS**

Composição	Meios de Cultura (Agar)					
	YM	AA	ASC	ABD	DRBC	AEC
-ágar bacteriológico	20 g	20 g	20 g	20 g	20 g	20 g
-água destilada	1000 mL	1000 mL	1000 mL	1000 mL	1000 mL	1000 mL
-cerejas de café maceradas	-	-	-	-	-	500 g
-cloranfenicol	-	-	-	-	0,1 g	-
-dextrose	10 g	-	-	20 g	10 g	-
-amido	-	10g	-	-	-	-
-sacarose	-	-	10g	-	-	-
-dicloran	-	-	-	-	0,002 g	-
-dihidrogênio fosfato de sódio	-	-	-	-	1 g	-
-extrato de levedura	3 g	3 g	3 g	-	-	-
-extrato de malte	3 g	3 g	3 g	-	-	-
-infusão de batatas	-	-	-	200 g	-	-
-peptona bacteriológica	5g	5 g	5 g	-	5 g	-
-rosa de bengala	-	-	-	-	0,025 g	-
-sulfato de magnésio	-	-	-	-	0,5 g	-

Obs: ajustar pH para 4,5.

YM = ágar yeast medium, AA = ágar amido, ASC = ágar sacarose, ABD = ágar batata dextrosado, DRBC = ágar rosa de bengala cloranfenicol, AEC = ágar extrato de café

Os meios foram esterilizados em autoclave a 121°C/20 min e distribuídos assepticamente em placas de Petri (20 mL/placa).

### 3.2.3 Semeadura

Após três dias de fermentação os erlenmeyers foram retirados do “shaker” e transportados para a câmara de inoculação. A semeadura foi realizada pelo método de superfície a partir de diluições seriadas (transferiu-se 1mL do caldo para 9mL de água peptonada 0,1%; após homogeneização transferiu-se 1mL da diluição 1:10 para 9mL de água peptonada 0,1%, obtendo-se 1:100; adotou-se o mesmo procedimento até a obtenção da diluição 1:1.000.000). Na superfície de cada placa foi depositado 0,1 mL de cada diluição, sendo o inóculo espalhado com alça de Drigalski. As placas foram semeadas em triplicata (PAGNONCELLI, 2002).

### 3.2.4 Incubação

As placas foram incubadas em estufa a temperatura de 28°C por 5 dias.

### 3.2.5 Triagem e seleção das colônias

As colônias foram selecionadas segundo as características morfológicas apresentadas em cada meio de cultura. O critério utilizado foi: aspecto (cremosa ou rugosa), coloração (muito branca, branca, branca-amarelada, amarela, rosada, cor do meio), tamanho (> 2mm ou < 2mm) e borda (regular ou irregular). As colônias selecionadas foram submetidas a coloração de GRAM (PAGNONCELLI, 2002; HERITAGE et al., 1996).

### 3.2.6 Manutenção das cepas selecionadas

As cepas foram inoculadas em tubos contendo ágar YM inclinado, incubados a 28°C/48 horas e mantidos sob refrigeração a 8°C, sendo repicadas a cada 3 meses.



### 3.4 CEPAS DE BACTÉRIAS LÁCTICAS

As cepas de bactérias lácticas foram cedidas pelo Laboratório e Processos Biotecnológicos, havendo sido isoladas de amostras provenientes de Londrina e Rolândia por PAGNONCELLI (2002) conforme Quadro 8.

#### QUADRO 8 - CARACTERÍSTICAS DAS CEPAS DE BACTÉRIAS LÁCTICAS

Cepa	origem	saíra	Identificação
LPB01	Londrina	00/01	<i>Lactobacillus plantarum</i>
LPB02	Londrina	00/01	<i>Lactobacillus brevis</i>
LPB03	Londrina	00/01	<i>Lactobacillus brevis</i>
LPB04	Londrina	00/01	<i>Lactobacillus plantarum</i>
LPB05	Londrina	00/01	<i>Lactobacillus brevis</i>
LPB06	Londrina	00/01	<i>Lactobacillus brevis</i>
LPB07	Londrina	00/01	<i>Lactobacillus paracasei</i>
LPB08	Londrina	01/02	Não identificado
LPB09	Londrina	01/02	Não identificado
LPB10	Londrina	01/02	Não identificado
LPB11	Londrina	01/02	Não identificado
LPB14	Londrina	01/02	Não identificado
LPB15	Londrina	01/02	Não identificado
LPB R01	Rolândia	01/02	<i>Lactobacillus plantarum</i>
LPB R02	Rolândia	01/02	<i>Lactobacillus brevis</i>
LPB R03	Rolândia	01/02	Não identificado
LPB R04	Rolândia	01/02	Não identificado
LPB R06	Rolândia	01/02	Não identificado
LPB R07	Rolândia	01/02	Não identificado
LPB R08	Rolândia	01/02	Não identificado

#### 3.4.1 Manutenção das cepas de bactérias lácticas

As vinte cepas foram inoculadas em tubos contendo ágar MRS (MAN, ROGOSA e SHARPE), incubados a 28°C/48 horas e mantidos sob refrigeração a 8°C, sendo repicadas a cada 3 meses.

#### 3.5 CEPA DE *Aspergillus ochraceus* PRODUTOR DE OCRATOXINA A

A cepa de *Aspergillus ochraceus* 40013 (ATCC 22947) foi enviada pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) sendo uma cepa produtora de ocratoxina A

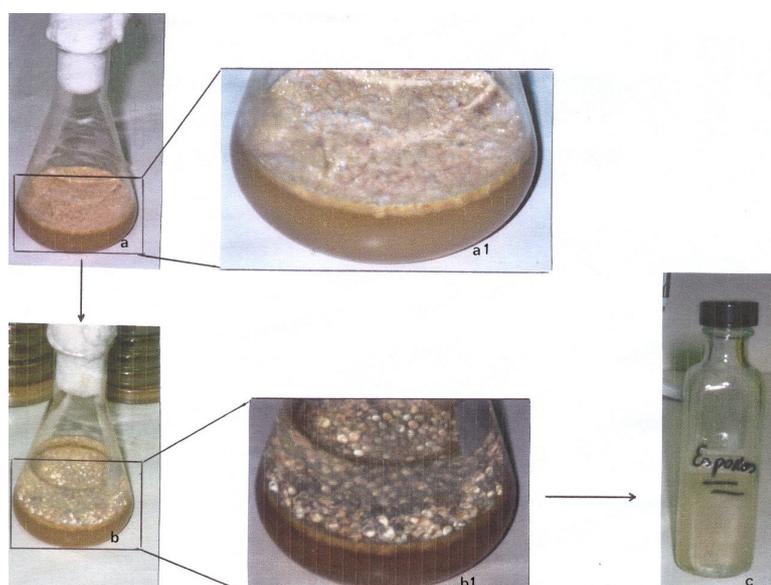
### 3.5.1 Ativação da cepa

A ampola contendo o microrganismo foi aberta com auxílio de uma lima e ao liófilo foi adicionado com pipeta de Pasteur 0,5 mL de água destilada estéril. Após 30 minutos de hidratação foi repicado para tubos de ensaio contendo ágar batata dextrosado inclinado. Os tubos foram incubados a 28°C/10 dias e posteriormente mantidos sob refrigeração a 8°C sendo repicados a cada 3 meses.

### 3.5.2 Suspensão de esporos

A suspensão de esporos foi preparada a partir do micélio da cepa de *Aspergillus ochraceus* mantido em tubo de ensaio. Sob condições de assepsia, transferiu-se com alça de inoculação estéril uma parte do micélio para a superfície de 50 mL de ágar YM, contido em um erlenmeyer de 250mL. Após 5 dias de incubação a 28°C, o erlenmeyer contendo o micélio aéreo desenvolvido (Figura 7a (a1)) foi transportado para a câmara de inoculação. Ao frasco foi adicionado 100 mL de água destilada contendo 5 gotas de Tween 80 e 15 g de pérolas de vidro estéreis (Figura 7b (b1)). Após cuidadosa agitação transferiu-se a suspensão obtida para um frasco de diluição estéril (Figura 7c) e procedeu-se a contagem (UFC/mL) pelo método de semeadura em superfície (Anexo 1) (DALLA SANTA, 2000).

**FIGURA 7 - PREPARO DA SUSPENSÃO DE ESPOROS DE *Aspergillus ochraceus***



### 3.6 AVALIAÇÃO DA AÇÃO FUNGISTÁTICA EM MEIO SÓLIDO - SELEÇÃO DAS CEPAS ISOLADAS CONTRA *Aspergillus ochraceus* OCRATOXIGÊNICO MEDIANTE MEDIDA DE CRESCIMENTO RADIAL

A ação fungistática das cepas de leveduras e de bactérias lácticas foi avaliada mediante o crescimento radial do micélio de *Aspergillus ochraceus* inoculado na superfície do meio de cultura contendo as cepas isoladas.

#### 3.6.1 Seleção das cepas de leveduras

As cepas de leveduras foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 10mL de caldo YM. Após 48 horas de incubação a 28°C, 1 mL (contendo aproximadamente  $10^6$ -Anexo 2) de cada cultura foi transferido para o centro da base de uma placa de Petri estéril, na qual foi adicionado 20 mL de ágar YM fundido e resfriado a 45°C. Após homogeneização e solidificação do ágar, depositou-se com pipeta estéril na superfície (centro) da placa 0,1mL da suspensão de esporos de *A ochraceus* preparada conforme item 3.5.2. As placas foram semeadas em triplicata e incubadas a 28°C por 5 dias. O crescimento radial (oito raios) foi medido diariamente com auxílio de uma régua milimetricamente calibrada-marca MERCK, até que o micélio atingisse a borda de uma das placas.

#### 3.6.2 Seleção das cepas de bactérias lácticas

As cepas de bactérias lácticas foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 10 mL de caldo MRS . Após 48 horas de incubação a 28°C, 1 mL de cada cultura (contendo aproximadamente  $10^6$ -Anexo 3) foi transferido para o centro da base de uma placa de Petri estéril, na qual foi adicionado 20 mL de ágar MRS fundido e resfriado a 45°C. Após homogeneização e solidificação do ágar, depositou-se com pipeta estéril na superfície (centro) da placa 0,1mL da suspensão de esporos de *A ochraceus* preparada conforme item 3.5.2. As placas foram semeadas em triplicata e incubadas a 28°C por 5 dias. O crescimento radial (oito raios) foi medido diariamente com auxílio de uma régua milimetricamente calibrada-marca MERCK, até que o micélio atingisse a borda de uma das placas.

### 3.7 AVALIAÇÃO FUNGISTÁTICA EM MEIO SÓLIDO (PLACA DE ÁGAR COM ORIFÍCIO) - SELECÇÃO DAS CEPAS ISOLADAS CONTRA *Aspergillus ochraceus* OCRATOXIGÊNICO MEDIANTE MEDIDA DO HALO DE INIBIÇÃO SOB DIFERENTES pH

#### 3.7.1 Leveduras

A ação fungistática das três cepas de leveduras (que apresentaram maior ação fungistática) foi avaliada mediante o halo de inibição formado quando inoculadas em ágar contendo o micélio do *Aspergillus ochraceus*

O inóculo das cepas de leveduras foi avaliado sob diferentes pH sendo utilizado o método da placa de ágar com orifício (INCQS, 2001). Pipetou-se com auxílio de um pipetador automático 0,1 mL da suspensão de esporos preparada conforme item 3.5.2 no centro da base de uma placa de Petri estéril, na qual foi adicionado 20 mL de ágar YM fundido e resfriado a 45°C. Após homogeneização e solidificação, com auxílio de um tubo de aço inox estéril (com 0,5 cm de diâmetro) perfurou-se o ágar obtendo-se um orifício (Figura 8a), no qual após retirada do ágar com uma agulha estéril (Figura 8b), foi depositado 0,1 mL da cultura das cepas (pH sem correção e ajustado para 5, 6 e 7). As placas foram inoculadas em triplicata e incubadas a 28°C por 5 dias. O halo de inibição formado foi medido com auxílio de uma régua milimetricamente calibrada - Marca MERCK (REQUE, 1999).

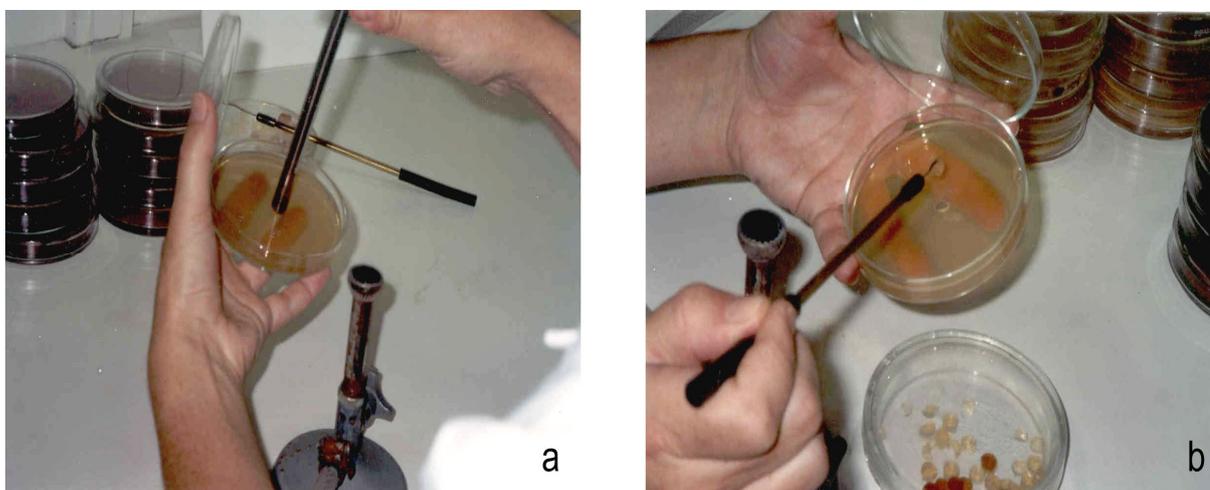
#### 3.7.2 Bactéria láctica

A ação fungistática da cepas de bactéria láctica (que apresentou maior ação fungistática) foi avaliada mediante o halo de inibição formado quando inoculada em ágar contendo o micélio do *Aspergillus ochraceus*

O inóculo da cepa foi avaliado sob diferentes pH sendo utilizado o método da placa de ágar com orifício (INCQS, 2001). Pipetou-se com auxílio de um pipetador automático 0,1 mL da suspensão de esporos preparada conforme item 3.5.2 no centro da base de uma placa de Petri estéril, na qual foi adicionado 20 mL de ágar MRS fundido e resfriado a 45°C. Após homogeneização e solidificação, com auxílio de um tubo de aço inox estéril (com 0,5 cm de diâmetro) perfurou-se o ágar

obtendo-se um orifício, no qual após retirada do ágar com uma agulha estéril, foi depositado 0,1 mL da cultura das cepas (pH sem correção e ajustado para 5, 6 e 7). As placas foram inoculadas em triplicata e incubadas a 28°C por 5 dias. O halo de inibição formado foi medido com auxílio de uma régua milimetricamente calibrada - Marca MERCK (REQUE, 1999).

### FIGURA 8 - PREPARO DAS PLACAS DE PETRI (MÉTODO DA PLACA DE ÁGAR COM ORIFÍCIO)



### 3.8 CULTURA SUBMERSA - AVALIAÇÃO VISUAL DO DESENVOLVIMENTO DO *Aspergillus ochraceus* INOCULADO EM CALDO CONTENDO AS CEPAS SELECIONADAS

#### 3.8.1 Levedura

A cepa de levedura que revelou maior ação fungistática, foi inoculada em três tubos de ensaio contendo 10 mL de caldo YM. Após 48 horas de incubação a 28°C, 1 mL de cada tubo foi transferido para um erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL da caldo YM, juntamente com 1 mL da suspensão de esporos preparada conforme item 3.5.2. Os erlenmeyers foram incubados em “shaker” por 5 dias/28°C/120 rpm (PAGNONCELLI, 2002).

Após o período de incubação foi efetuada a avaliação visual do crescimento miceliano utilizando-se o critério: ++ crescimento miceliano visível (pellets presentes), + crescimento miceliano imperceptível (turvação), - ausência de crescimento.

### 3.8.2 Bactéria láctica

A cepa de bactéria que revelou maior ação fungistática foi inoculada em três tubos de ensaio contendo 10 mL de caldo enriquecido (CE). Após 48 horas de incubação a 28°C, 1 mL de cada tubo foi transferido para um erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL do CE, juntamente com 1 mL da suspensão de esporos preparada conforme item 3.5.2. Os erlenmeyers foram incubados em “shaker” por 5 dias /28°C/ 120 rpm (PAGNONCELLI, 2002).

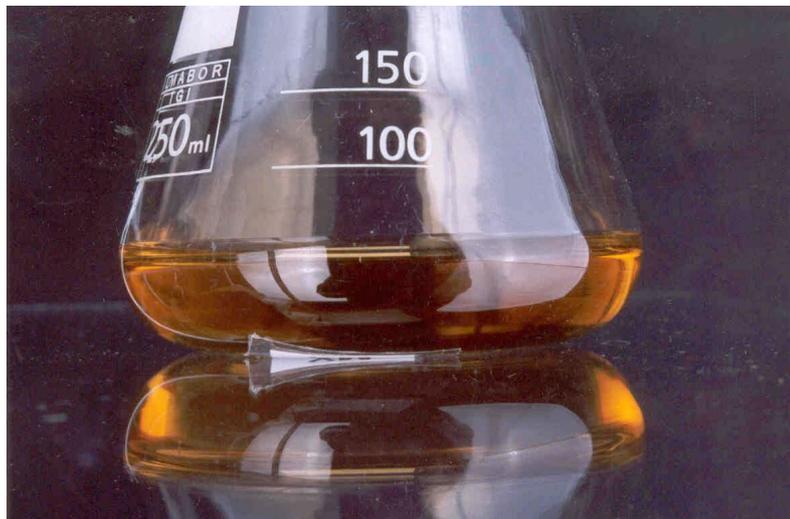
Após o período de incubação foi efetuada a avaliação visual do crescimento miceliano utilizando-se o critério: +++ crescimento miceliano visível (pellets presentes), ++ crescimento miceliano visível (pellets ausentes), + crescimento miceliano imperceptível (turvação), - ausência de crescimento.

### 3.9 CULTURA SUBMERSA - AVALIAÇÃO DA AÇÃO FUNGISTÁTICA DAS CEPAS DE LEVEDURA E BACTÉRIA LÁCTICA SELECIONADAS MEDIANTE QUANTIFICAÇÃO DA BIOMASSA E OCRATOXINA PRODUZIDAS PELA CEPA DE *Aspergillus ochraceus* EM CALDO EXTRATO DE CAFÉ VERDE

Em béquer de 2000 mL, pesaram-se em balança semi-analítica marca Marte, 100g de grãos de café verde selecionados, ao qual foi adicionado 1000 mL de água destilada. O béquer foi levado à ebulição por 15 minutos. Decorrido esse tempo o conteúdo do béquer foi filtrado em funil revestido com algodão hidrófilo. O resíduo foi desprezado e o filtrado transferido primeiramente para uma proveta para que o volume fosse completado para 1000 mL. Em cada erlenmeyer de 250 mL foi distribuído 50 mL do caldo. Após esterilização cada frasco (Figura 9), foi inoculado com 1 mL da cepa de levedura selecionada e com 1 mL da suspensão de esporos preparada conforme item 3.5.2 e outros três frascos inoculados com a cepa da

bactéria láctica selecionada e com 1 mL da suspensão de esporos preparada conforme item 3.5.2.

### **FIGURA 9 - ASPECTO DO CALDO EXTRATO DE CAFÉ VERDE ANTES DA INOCULAÇÃO**



Os erlenmeyers foram incubados em “shaker” por 5 dias/28°C/120 rpm (PAGNONCELLI, 2002).

#### **3.9.1 Biomassa**

O micélio foi separado por filtração em papel de filtro quantitativo de 8 $\mu$ m previamente pesado sendo o filtrado separado para quantificação da ocratoxina. O papel de filtro foi transferido para uma estufa a 105°C, por 24 horas. A biomassa foi calculada pela diferença de peso e expressa em g/1000 mL (SOCCOL, RAIMBAULT e PINHEIRO, 1994).

#### **3.9.2 Ocratoxina**

A ocratoxina A é uma potente nefrotoxina com potenciais propriedades imunotóxicas, teratogênicas e genotóxicas portanto roupas de proteção, óculos e luvas devem ser utilizados e os estágios da análise devem ser realizados em capela.

A solução padrão de ocratoxina foi preparada conforme especificado:

Preparou-se 100mL de uma solução de tolueno e ácido acético (99+1, v+v) em balão volumétrico, injetou-se 1 ml dessa solução no frasco contendo o padrão em pó da ocratoxina, o qual foi agitado em vortex e transferiu-se cuidadosamente para o balão volumétrico contendo o restante da solução de tolueno e ácido acético. Transferiu-se uma alíquota para cubeta do espectrofotômetro medindo-se o comprimento de onda (absorção máxima 333nm); determinou-se a concentração exata da solução usando a equação abaixo:

$$(\mu\text{g ocratoxina A /mL}) = (A \times \text{MW} \times 1000) / \epsilon$$

na qual:

MW=peso molecular da ocratoxina A=403,8

$\epsilon$ =absortividade molar da ocratoxina A em tolueno ácido acético

A=absorbância da solução de ocratoxina A no comprimento de onda de 333nm

A solução padrão de trabalho foi preparada a partir de uma solução de 10 $\mu$ g/mL de ocratoxina.

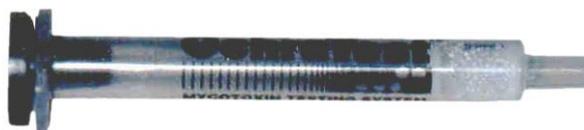
As soluções padrões da curva de calibração (100-2,1 ng/mL), para utilização no cromatógrafo líquido de alta eficiência foram preparadas conforme especificado:

Pipetou-se 500 $\mu$ L da solução de 10 $\mu$ g/mL em um frasco (vial) ambar e diluiu-se para 5000 $\mu$ L (concentração 1 $\mu$ g/mL); pipetou-se 200 $\mu$ L da solução de 1 $\mu$ g/mL em um frasco (vial) ambar), evaporou-se até secar, redissolveu-se com 2000 $\mu$ L com a fase móvel do HPLC (100ng/mL); preparou-se uma solução com concentração 40ng/mL (pipetou-se 400 $\mu$ L da solução de 100ng/mL e diluiu-se em 1000 $\mu$ L da fase móvel); preparou-se uma solução com concentração 800ng/mL (pipetou-se 800 $\mu$ L da solução de 100ng/mL e diluiu-se em 1000 $\mu$ L da fase móvel), preparou-se uma solução com concentração 20ng/mL (pipete 400 $\mu$ L da solução de 100ng/mL e diluiu-se em 2000 $\mu$ L da fase móvel), preparou-se uma solução com concentração 2,1ng/mL (pipetou-se 105 $\mu$ L da solução de 20ng/mL e diluiu-se em 1000 $\mu$ L da fase móvel), preparou-se uma solução com concentração 4,2ng/mL (pipetou-se 210 $\mu$ L da solução de 20ng/mL e diluiu-se em 1000 $\mu$ L da fase móvel), preparou-se uma solução com concentração 16,8ng/mL (pipetou-se 840 $\mu$ L da solução de 20ng/mL e diluiu-se em 1000 $\mu$ L da fase móvel). Agitou-se em vortex e guardou-se em freezer, -18°C (VARGAS et al., 2002).

As curvas de calibração do espectrofotômetro e da ocratoxina constam no Anexo 4 e Anexo 5.

Para quantificação da ocratoxina nos frascos submetidos a fermentação, pipetou-se 10 mL do caldo filtrado em proveta. Adicionou-se 40 mL de solução phosphate buffered saline (PBS)/0,01% Tween 20. Após homogeneização filtrou-se em seringa com filtro de microfibra. Transferiu-se 10 mL para uma coluna de afinidade Ochratest (Figura 10) a um fluxo de 1-2 gotas por segundo, passou-se pela coluna 10 mL de solução PBS/ 0,01% Tween 20 e 10 mL de água purificada.

**FIGURA 10 – COLUNA DE IMUNOAFINIDADE OCHRATEST**

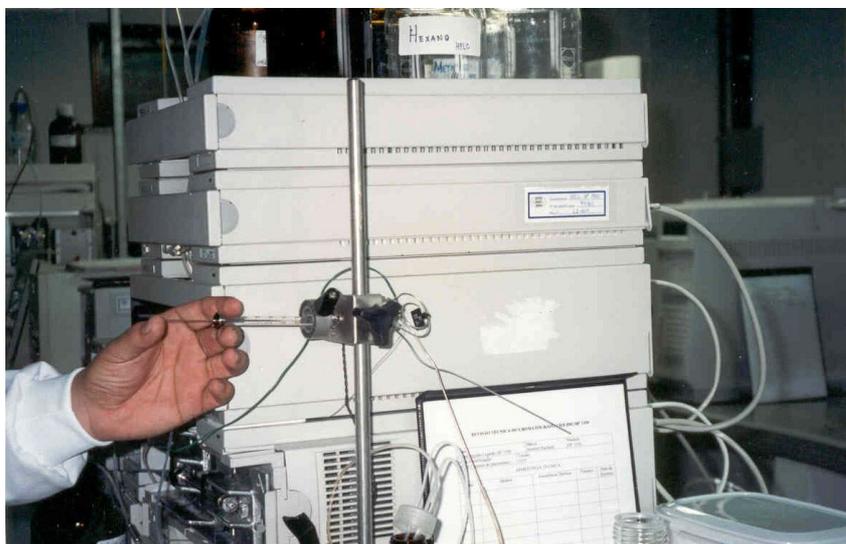


Eluiu-se (Figura 11) com metanol grau HPLC e coletou-se a amostra eluída em cubeta de vidro. Adicionou-se 1,5 mL de água purificada ao eluato. Após homogeneização injetou-se 200  $\mu$ L no cromatógrafo líquido de alta eficiência com fluorescência –Marca Agilent, modelo 1100 (Figura 12).

**FIGURA 11 - SISTEMA DE ELUIÇÃO Á VÁCUO**



**FIGURA 12 – CROMATÓGRAFO LÍQUIDO DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC), COM FLUORESCÊNCIA**



As condições de operação do sistema HPLC encontram-se no Quadro 9.

**QUADRO 9 - CONDIÇÕES DE ANÁLISE NO SISTEMA HPLC**

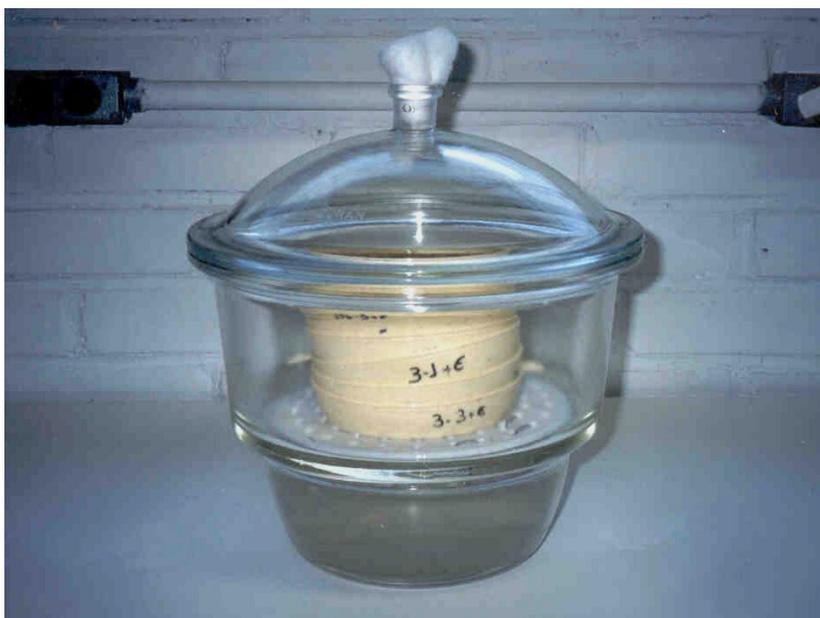
Parâmetro	Condições
Fase Móvel	Acetonitrila + Metanol + Solução Aquosa de ácido Acético Glacial (29 + 1; v+v)
Coluna	Octadecil Silano C1 – 250 x 4,6 nm – partículas de 5 µm – Fase Reversa
Detector	Fluorescência / $\lambda = 332$ nm (excitação) / $\lambda = 476$ nm (emissão)
Fluxo	1 mL/minuto
Volume do Sistema de Injeção	20 µL
Temperatura da Coluna	25 °C

### 3.10 AVALIAÇÃO DA AÇÃO FUNGISTÁTICA DA CEPA DE LEVEDURA SELECIONADA MEDIANTE QUANTIFICAÇÃO DA OCRATOXINA PRODUZIDA PELO *Aspergillus ochraceus* EM GRÃOS DE CAFÉ VERDES

Dividiu-se o experimento em oito grupos (três grupos teste e cinco grupos controle). Cada grupo foi composto por um conjunto de quatro peneiras plásticas de 15 cm de diâmetro.

Em cada peneira foram pesadas 25 g de grãos de café verde selecionados. Cada conjunto foi transferido, após inoculação de 1 mL/g da cepa de levedura e ou bactéria láctica juntamente ou não com a suspensão de esporos de *Aspergillus ochraceus* para um dessecador (transformado em umidificador pela adição de água na base e algodão no orifício da tampa) (Figura 13).

**FIGURA 13 - UMIDIFICADOR TESTE**



Os grupos controle foram: Controle 1- Grãos de café verde não inoculados, Controle 2- Grãos de café após 10 dias de incubação, Controle 3- Grãos de café verdes inoculados com a cepa 13b, Controle 4- Grãos de café verdes inoculados com a cepa LPB03 e controle 5- Grãos de café verde inoculados com *Aspergillus ochraceus*.

Os grupos teste foram: Teste 1- Grãos de café verdes inoculados com a cepa 13b e *Aspergillus ochraceus*, teste 2- Grãos de café verdes inoculados com a cepa LPB03 e *Aspergillus ochraceus* e Teste 3- Grãos de café verdes inoculados com 13b, LPB03 e *Aspergillus ochraceus*

Os umidificadores foram incubados a 25 °C /10 dias.

Antes da inoculação e após 05 dias de incubação foi realizada a análise de umidade (conforme item 3.1.2.3.4) e atividade de água (Aqua Lab CX-2) nos grãos de café. Mediu-se a umidade relativa do ar com um higrômetro inserido internamente no umidificador. Após 10 dias de incubação efetuou-se uma avaliação visual nos grãos inoculados comparados aos não inoculados. O critério utilizado foi: +++ crescimento miceliano denso, presença de esporos, ++crescimento miceliano intermediário, presença de esporos, +crescimento miceliano tênue e - ausência de crescimento. Após a avaliação visual os grãos foram transferidos, sob condições de assepsia, do umidificador para dentro de sacos plásticos, nos quais foram adicionados 50mL de uma solução de metanol : bicarbonato de sódio 3% (70:30 v/v). Após homogeneização prosseguiu-se conforme item 3.9.2.

### 3.11 AVALIAÇÃO DA VARIAÇÃO DA AÇÃO FUNGISTÁTICA DA CEPA DE LEVEDURA SELECIONADA MEDIANTE QUANTIFICAÇÃO DA OCRATOXINA PRODUZIDA PELO *Aspergillus ochraceus* EM GRÃOS DE CAFÉ VERDES

Para verificar a variação da ação fungistática da cepa 13b, diferentes concentrações de inóculo foram testadas.

A partir do inóculo inicial (contendo  $10^6$  UFC/mL) foram realizadas diluições sucessivas ( $10^5$  UFC/mL;  $10^4$  UFC/mL,  $10^3$  UFC/mL e  $10^2$  UFC/mL) que foram inoculadas em grãos de café verde após incubação processadas conforme descrito no item 3.10.

### 3.12 CARACTERIZAÇÃO DOS METABÓLITOS FORMADOS PELA CEPA DE LEVEDURA SELECIONADA, POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS

A cepa de levedura que apresentou ação fungistática foi inoculada em caldo YM e esse incubado a 28°C/10 dias. Em intervalos de 24, 48, 96, 168 e 240 h alíquotas foram retiradas para extração dos metabólitos que foram caracterizados em cromatógrafo a gás marca Varian, modelo CG3800 acoplado a um detector de

massas- marca Varian, modelo Saturn 2000 caracterizou-se os metabólitos formados.

Alíquotas de 50 mL foram retiradas do caldo YM sem inoculação e após 1 dia (24h); 4 dias (96h), 7 dias (168h) e 10 dias (240h) de incubação. Cada alíquota foi extraída 2 vezes com 100 mL de solução de diclorometano e hexano (1:1). Os solventes, previamente selecionados, foram evaporados em capela de gases e o resíduo resultante ressuspendido e avolumado para 2 mL com acetona. As soluções obtidas foram analisadas por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC/MS). As condições de operação do sistema GC/MS encontram-se no Quadro 10.

#### QUADRO 10 - CONDIÇÕES DE ANÁLISE NO SISTEMA GC/MS

Parâmetro	Condições
Temperatura do inicial injetor	150°C
Rampa de aquecimento	40°C
Temperatura final do injetor	220°C
Modo de injeção	Splitless
Temperatura inicial da coluna	80°C
Rampa de aquecimento	8°C/min
Temperatura final	300°C (2 min)
Fluxo do gás de arraste (He)	1 mL /min
Coluna	CP Sil 8CB low bleed 25m x 0,25mm
Temperatura da interface	170°C
Temperatura do Trap	190°C
Temperatura do manifold	50°C
Modo de ionização	Impacto de elétrons (IE) a 70eV

A identificação dos compostos foi realizada por comparação com os espectros armazenados na biblioteca NIST MS SEARCH Version 1.7 e SATURN, do sistema cromatográfico.

### 3.13 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os métodos estatísticos empregados foram: estatística descritiva (média e desvio padrão), análise de variância (modelo bloco ao acaso) e teste de Tukey (para comparação entre médias). As análises estatísticas foram realizadas com uso do programa estatístico Statistica (pacote estatístico para uso em microcomputador) (SAS, 2001), sendo aplicados nos experimentos de crescimento radial, halo de inibição, biomassa e quantificação da ocratoxina A.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram isoladas cepas de leveduras de 12 localidades, a amostra de número 2 proveniente do Espírito Santo (Venda Nova dos Imigrantes) foi descartada por não apresentar colônias de leveduras isoladas.

### 4.1 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DAS CEREJAS DE CAFÉ

#### 4.1.1 pH

As amostras apresentaram pH entre 3,74 e 6,29 (Quadro 11).

**QUADRO 11 - pH DAS AMOSTRAS DE CEREJAS DE CAFÉ PROVENIENTES DOS ESTADOS DE MINAS GERAIS, BAHIA, SÃO PAULO E PARANÁ**

Amostra	Procedência	UF	pH/ Repetições			média
			A	B	C	
1	Araguari	MG	3,94	3,94	3,94	3,94
3	Itamaraju	BA	4,14	4,14	4,14	4,14
4	Barra do Choça	BA	3,85	3,83	3,85	3,84
5	Viçosa	MG	6,30	6,28	6,30	6,29
6	Rolândia	PR	4,60	4,59	4,59	4,59
7	Ilhéus	BA	3,75	3,75	3,74	3,74
8	Campinas	SP	4,10	4,00	4,10	4,05
9	Correntina	BA	3,99	3,98	3,98	3,98
10	Buerarema	BA	4,02	4,01	4,03	4,02
11	Barreiras	BA	3,85	3,84	3,84	3,84
12	Batatais	SP	4,30	4,27	4,31	4,29
13	Terra Nova	MG	5,21	5,20	5,19	5,20

Amostra 2: descartada por não apresentar colônias de leveduras

Segundo LEITÃO et al. (1988), condições seletivas para proliferação de leveduras são condicionadas ao pH ácido (ótimo entre 4,0 e 4,5), valores de atividade de água inferiores a 0,94 e temperatura entre 25°C e 28°C.

Das 12 amostras analisadas, 11 revelaram pH dentro do intervalo (entre 3,5 e 5,5) adequado para proliferação de leveduras, sendo que 04 (amostra 3-Itamaraju; amostra 8-Campinas; amostra 10-Buerarema e amostra 12-Batatais) apresentaram valores considerados ótimos.

#### 4.1.2 Açúcares totais

O teor de açúcares totais (g/100 g) variou de 1,28 a 8,66 (Quadro 12).

**QUADRO 12 - AÇÚCARES TOTAIS (g/100 g) DAS AMOSTRAS DE CEREJAS DE CAFÉ PROVENIENTES DOS ESTADOS DE MINAS GERAIS, BAHIA, SÃO PAULO E PARANÁ**

Amostra	Procedência	UF	Açúcares totais/Repetições			Média
			A	B	C	
1	Araguari	MG	3,43	3,43	3,43	3,43
3	Itamaraju	BA	1,28	1,28	1,28	1,28
4	Barra do Choça	BA	5,88	5,80	5,84	5,84
5	Viçosa	MG	5,41	5,41	5,45	5,42
6	Rolândia	PR	3,86	3,86	3,84	3,85
7	Ilhéus	BA	3,63	3,61	3,60	3,61
8	Campinas	SP	8,68	8,65	8,67	8,66
9	Correntina	BA	1,30	1,35	1,28	1,31
10	Buerarema	BA	1,30	1,29	1,30	1,29
11	Barreiras	BA	4,31	4,30	4,33	4,31
12	Batatais	SP	3,74	3,76	3,72	3,74
13	Terra Nova	MG	5,43	5,38	5,40	5,40

Substratos ricos em carboidratos (particularmente açúcares) também favorecem o desenvolvimento de leveduras, razão pela qual têm como principal habitat a superfície de frutos e vegetais. Vários são os açúcares passíveis de

utilização no processo metabólico. Entre as leveduras oxidativas destacam-se *Candida* sp, *Pichia* sp, *Hansenula* sp, *Debaromyces* sp (LEITÃO et al., 1988).

Das 12 amostras analisadas, 3 amostras (3-Itamaraju, 9-Correntina e 10-Buerarema) revelaram baixo teor de açúcares totais (menos de 2 g/100 g); 8 amostras (1-Araguari; 4-Barra do Choça; 5-Viçosa; 6-Rolândia; 7-Ilhéus; 11-Barreiras; 12-Batatais e 13-Terra Nova) teores entre 3 g/100 g e 6 g/100 g e uma amostra (8-Campinas) teor acima de 8 g/100 g. Essa variação está relacionada ao grau de maturação das cerejas analisadas. Cerejas mais maduras apresentaram teor inferior de açúcares totais.

#### 4.1.3 Composição centesimal

A composição centesimal consta no Quadro 13.

### QUADRO 13 – COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DAS AMOSTRAS DE CEREJAS DE CAFÉ PROVENIENTES DOS ESTADOS DE MINAS GERAIS, BAHIA, SÃO PAULO E PARANÁ

Amostr a	Umidade (g/100 g)	Resíduo mineral fixo (g/100 g)	Lipídios (g/100 g)	Proteínas (g/100 g)	Carboidratos (g/100 g)
1	77,80	1,93	0,00	2,40	17,86
3	80,52	1,97	0,00	2,56	14,95
4	74,35	2,12	0,64	2,06	20,83
5	77,32	3,69	0,41	5,08	13,50
6	81,53	1,57	0,33	1,94	14,63
7	75,65	2,28	0,46	3,44	18,17
8	71,49	3,69	0,48	3,67	20,67
9	83,41	2,11	0,00	2,25	12,23
10	80,28	2,01	0,00	1,89	15,82
11	71,98	3,33	0,88	3,79	20,02
12	75,72	2,96	0,98	3,52	16,82
13	76,46	2,83	0,62	3,22	16,87

Segundo FERNANDES (2003), a composição química dos grãos de café sofre influência da espécie, variedade, local de cultivo, métodos de colheita e armazenamento.

O teor de umidade variou entre 71,49 g/100 g (amostra 8) e 83,41 g/100 g (amostra 9) e o teor de resíduo mineral fixo entre 1,57 g/100 g (amostra 6) e 3,69 g/100 g (amostras 5 e 8). O teor de lipídios mostrou-se inferior a 1 g/100 g para todas as amostras analisadas. Já o teor de proteínas variou entre 1,89 g/100 g (amostra 10) e 5,08 g/100 g (amostra 5). Os resultados que revelaram maior diferença entre as amostras foram os de carboidratos (entre 12,23 g/100 g - amostra 9 e 20,83 g/100 g - amostra 4). Apesar da variação da composição centesimal observada entre as amostras, os microrganismos colonizam preferencialmente a superfície dos frutos e como esses foram submetidos a fermentação o grau de maturação dos mesmos não interferiu no isolamento das colônias de leveduras.

## 4.2 TRIAGEM E IDENTIFICAÇÃO DAS CEPAS DE LEVEDURAS SELECIONADAS

### 4.2.1 Triagem das colônias

Das 42 cepas triadas após observação ao microscópio óptico, 35 revelaram características morfológicas de levedura e 07 de bactéria (Quadro 14).

Na Figura 14 observa-se as características morfológicas das colônias de leveduras isoladas em Ágar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol.

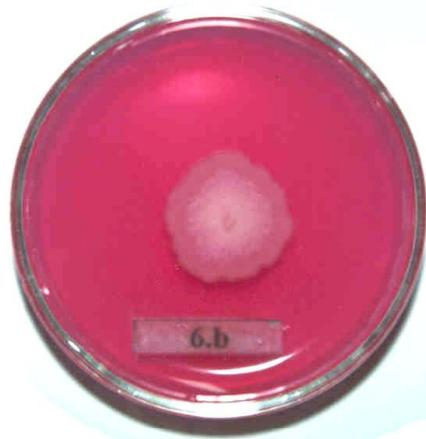
**QUADRO 14 - CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DIFERENCIAIS DAS COLÔNIAS ISOLADAS EM ÁGAR DRBC/ 10 DIAS / 25°C**

*	Procedência	UF	**	Aspecto	Coloração	Tamanho	Borda	***
1	Araguari	MG	1 <sup>a</sup>	Cremosa	B	<2mm	Regular	Bactéria
			1b	Cremosa	B	>2mm	Regular	Levedura
			1c	Rugosa	B	>2mm	Irregular	Levedura
			1d	Cremosa	BA	>2mm	Regular	Levedura
2	Venda Nova dos Imigrantes	ES	2 <sup>a</sup>	Cremosa	BA	<2mm	Regular	Bactéria
3	Itamaraju	BA	3 <sup>a</sup>	Cremosa	B	>2mm	Regular	Levedura
4	Barra do Choça	BA	4 <sup>a</sup>	Cremosa	B	>2mm	Regular	Levedura
			4b	Rugosa	B	>2mm	Irregular	Levedura
			4c	Cremosa	BA	<2mm	Regular	Bactéria
5	Viçosa	MG	5a	Cremosa	B	<2mm	Irregular	Bactéria
			5b	Rugosa	B	>2mm	Regular	Levedura
			5c	Cremosa	R	>2mm	Regular	Levedura
6	Rolândia	PR	6a	Cremosa	B	>2mm	Irregular	Levedura
			6b	rugosa	B	>2mm	Irregular	Levedura
			6c	rugosa	B	>2mm	Irregular	Levedura
			6d	rugosa	BA	>2mm	Irregular	Levedura
			6e	rugosa	B	>2mm	Irregular	Levedura
7	Ilhéus	BA	7a	cremosa	BA	>2mm	Regular	Levedura
			7b	rugosa	R	>2mm	Irregular	Levedura
			7c	rugosa	B	>2mm	irregular	Levedura
			7d	rugosa	B	>2mm	Irregular	Levedura
			7e	rugosa	R	>2mm	Irregular	Levedura
			7f	rugosa	B	>2mm	Irregular	Levedura
8	Campinas	SP	8a	cremosa	BA	>2mm	Regular	Levedura
			8b	cremosa	B	>2mm	Regular	Levedura
9	Correntina	BA	9a	rugosa	B	<2mm	Irregular	Bactéria
			9b	rugosa	B	>2mm	Irregular	Levedura
			9c	rugosa	B	>2mm	Irregular	Levedura
10	Buerarema	BA	10a	rugosa	BA	>2mm	Irregular	Levedura
			10b	rugosa	B	>2mm	Irregular	Levedura
			10c	cremosa	R	<2mm	Regular	Bactéria
			10d	cremosa	R	>2mm	Regular	Levedura
			10e	rugosa	R	>2mm	Irregular	Levedura
			10f	cremosa	B	>2mm	Regular	Levedura
			10g	rugosa	BA	>2mm	Irregular	Levedura
			10h	cremosa	R	>2mm	Regular	Levedura
11	Barreiras	BA	11a	cremosa	B	<2mm	Regular	Bactéria
			11b	cremosa	B	>2mm	Irregular	Levedura
12	Batatais	SP	12a	cremosa	R	>2mm	Regular	Levedura
			12b	rugosa	B	>2mm	Irregular	Levedura
13	Terra Nova	MG	13a	cremosa	B	>2mm	regular	Levedura
			13b	cremosa	BA	>2mm	Irregular	Levedura

\*-Amostra,\*\*-Colônia,\*\*\*-Classificação. Aspecto: cremosa ou rugosa, Coloração: branca (B) , branca-amarelada (BA), rosada (R) ou cor do meio (CM). Tamanho: >2mm ou < 2mm Borda: regular ou irregular.

**FIGURA 14 - CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DAS COLÔNIAS DE LEVEDURAS EM ÁGAR DRBC/ 10 DIAS/ 25°C**













## 4.2.2 Identificação das colônias de leveduras

A identificação pelo Sistema API 20CAUX, das 35 cepas de leveduras isoladas, consta no Quadro 15.

**QUADRO 15 - IDENTIFICAÇÃO DAS 35 CEPAS DE LEVEDURAS ISOLADAS**

*	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	código	Identificação	%	identificação	%
1b	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	6406271	C.pelliculosa	99,9		
1c	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6400004	C.lambica	72,7	G.penicillatum	21,9
1d	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	6576773	C.famata	99,9		
3ª	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	6556773	C.famata	99,9		
4a	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	6576173	C.famata	73,3	C.guilliermondii	26,2
4b	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	6000040	C.glabrata	99,8		
5b	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6400004	C.lambica	72,7	G.penicillatum	21,9
5c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0000000	S/identif.			
6a	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	6004077	C.pelliculosa	93,0	S.cerevisiae*	6,4
6b	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2000000	C.glabrata	46,1	C.inconspicua	45,5
6c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0000000	S/identif.			
6d	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	6000104	C.lipolytica	47,9	C.krusei	43,4
6e	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0000000	S/identif.			
7a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0000000	S/identif.			
7b	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	6102144	C.zeylanoides	99,9		
7c	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	6000100	C.inconspicua	74,3	C.lipolytica	25,2
7d	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	6000022	C.magnoliae			
7e	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	6000066	S.salmonicolor	98,3		
7f	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	6000100	C.inconspicua	74,3	C.lipolytica	25,2
8a	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	6142144	C.zeylanoides	99,9		
8b	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	6572174	C.albicans	99,6		
9b	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2040000	C.maris	63,4	C.inconspicua	33,7
9c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0000000	S/identif.			
10a	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	6506175	C.lusitaniae	94,4		
10b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0000000	S/identif.			
10d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0000000	S/identif.			
10e	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	6506175	C.lusitaniae	94,4		
10f	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	6166671	C.kefyr	99,9		
10g	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	2000240	C.glabrata	96,1		
10h	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2040000	C.maris	63,4	C.inconspicua	33,7
11b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0000000	S/identif.			
12a	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	6004075	C.pelliculosa	99,4		
12b	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	6142144	C.zeylanoides	99,9		
13a	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	6142062	C.colliculosa	99,9		
13b	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	6400104	C.lambica	99,7		

\*cepa

1=controle, 2=glucose, 3=glycerol, 4=2-cet-D-gluconate, 5=arabinose, 6=xylose, 7=adonitol, 8=xylitol, 9=galactose, 10=inositol, 11=sorbitol, 12=metil-d-glucosideo, 13=n-acetil-glucosamina, 14=celbiose, 15=lactose, 16=maltose, 17=sacarose, 18=trealose, 19=melezitose, 20=rafinose, 21-hifas.

+ = positivo, - = negativo C.=Candida G.=Geotrichum S\*.=Sacharomyces S\*\*.=Sporobolomyces salmonicolor.

Foram identificadas as seguintes espécies de leveduras: *Candida pelliculosa*, *C.lambica*, *C.famata*, *C.guilliermondii*, *C.glabrata*, *C.lipolytica*, *C.krusei*, *C.zeylanoides*, *C.inconspicua*, *C.magnoliae*, *C.albicans*, *C.maris*, *C.lusitaniae*, *C.kefyr*, *C.colliculosa*, *Geotrichum penicillatum*, *Sporobolomyces salmonicolor* e *Saccharomyces cerevisiae*. Das oito espécies de leveduras (*C.guilliermondii*, *C.parapsilopsis*, *C.pelliculosa*, *C.famata*, *C.tropicalis*, *S.cerevisiae*, *S.marxianus* e *Rhodotorula mucilaginosa*), isoladas por PEE e CASTELEIN (1971), em amostras de café robusta na República do Congo, quatro (*C.guilliermondii*, *C.pelliculosa*, *C.famata* e *S.cerevisiae*) coincidiram com as identificadas nas amostras analisadas. Já entre os gêneros identificados por SILVA et al (2000), em cerejas de café de Minas Gerais apenas *Candida* sp coincidiu com os isolados neste trabalho. Os demais gêneros (*Pichia* sp, *Arxula* sp e *Saccharomycopsis* sp), não foram detectados nas amostras analisadas, pelo método empregado API20C AUX.

#### 4.3 AVALIAÇÃO DA AÇÃO FUNGISTÁTICA EM MEIO SÓLIDO - SELECÃO DAS CEPAS DE LEVEDURAS E BACTÉRIAS LÁCTICAS ISOLADAS CONTRA *Aspergillus ochraceus* OCRATOXIGÊNICO MEDIANTE MEDIDA DE CRESCIMENTO RADIAL

##### 4.3.1 Seleção das cepas de leveduras

Os resultados do crescimento radial, da cepa de *Aspergillus ochraceus* inoculada em placas de Petri contendo as cepas de leveduras constam no Quadro 16.

#### QUADRO 16 - CRESCIMENTO RADIAL (cm) DA CEPA DE *Aspergillus ochraceus* INOCULADA EM PLACAS DE PETRI CONTENDO AS CEPAS DE LEVEDURAS

Amostra	No. colônia	Repetições	1	2	3	4	5	6	7	8	Media*	Média**	Dp
<i>A ochraceus</i>		A	3,60	3,50	3,00	3,45	3,10	3,50	3,35	4,00	3,44	3,56	0,109211
		B	3,70	3,65	3,70	3,60	3,70	3,10	3,65	4,10	3,65		
		C	3,85	3,90	3,40	3,30	3,40	3,15	3,75	3,95	3,59		
1- Araguari	1b	A	2,30	2,45	2,35	2,25	2,20	2,60	2,30	2,45	2,36	2,43	0,12453
		B	2,15	2,25	2,45	2,65	2,60	2,30	2,15	2,30	2,36		
		C	2,45	2,55	2,60	2,40	2,70	2,75	2,65	2,50	2,58		

	<b>1c</b>	A	2,70	2,85	2,80	2,70	2,60	2,55	2,45	2,80	2,68	2,61	0,061873
		B	2,40	2,60	2,70	2,65	2,70	2,45	2,35	2,70	2,57		
		C	2,60	2,55	2,35	2,70	2,65	2,70	2,60	2,50	2,58		
	<b>1d</b>	A	3,10	3,00	2,90	2,85	3,15	3,00	2,70	2,95	2,96	2,91	0,057282
		B	3,00	3,05	3,10	3,00	2,75	2,70	2,95	2,80	2,92		
		C	3,00	2,95	2,85	2,70	2,65	2,75	2,90	2,95	2,84		
3- Itamaraju	<b>3a</b>	A	2,25	2,20	2,00	2,15	2,10	2,00	1,95	2,20	2,11	2,10	0,066242
		B	2,15	2,10	2,00	2,10	2,15	2,20	2,25	2,30	2,16		
		C	1,95	1,90	1,90	2,00	2,10	2,10	2,15	2,10	2,03		
4-Barra do Choça	<b>4a</b>	A	2,85	2,80	2,75	2,90	2,95	2,95	2,70	2,75	2,83	2,89	0,081729
		B	2,90	2,95	3,00	2,95	2,70	2,70	2,75	2,85	2,85		
		C	2,95	2,90	3,00	3,15	3,10	3,00	2,90	2,85	2,98		
	<b>4b</b>	A	3,30	3,20	3,25	3,30	3,25	3,10	3,00	3,15	3,19	3,10	0,083229
		B	3,00	3,00	3,15	3,15	3,00	3,10	3,00	3,25	3,08		
		C	3,00	3,25	2,90	2,95	3,10	3,00	3,05	3,00	3,03		
5-Viçosa	<b>5b</b>	A	2,90	3,00	2,85	2,95	2,85	2,80	3,10	3,00	2,93	2,96	0,028183
		B	2,95	2,80	3,00	3,10	3,15	3,00	2,95	2,95	2,99		
		C	3,10	3,00	2,95	2,90	2,85	2,80	3,00	3,10	2,96		
	<b>5c</b>	A	2,50	2,60	2,65	2,55	2,45	2,45	2,60	2,55	2,54	2,58	0,034574
		B	2,60	2,65	2,70	2,55	2,60	2,45	2,60	2,75	2,61		
		C	2,55	2,60	2,70	2,75	2,45	2,60	2,50	2,40	2,57		
6-Rolândia	<b>6a</b>	A	2,35	2,20	2,15	2,10	2,30	2,30	2,25	2,15	2,23	2,27	0,040182
		B	2,40	2,45	2,30	2,45	2,20	2,25	2,20	2,15	2,30		
		C	2,40	2,35	2,20	2,25	2,15	2,25	2,30	2,40	2,29		
	<b>6b</b>	A	3,35	3,20	3,35	3,40	3,30	3,25	3,20	3,30	3,29	3,29	0,037673
		B	3,45	3,15	3,20	3,15	3,15	3,20	3,25	3,45	3,25		
		C	3,40	3,25	3,30	3,30	3,45	3,40	3,30	3,20	3,33		
	<b>6c</b>	A	3,50	3,45	3,35	3,65	3,60	3,50	3,40	3,45	3,49	3,35	0,137689
		B	2,90	3,10	3,20	3,45	3,45	3,30	3,20	3,10	3,21		
		C	3,00	3,30	3,35	3,20	3,30	3,50	3,55	3,50	3,34		
	<b>6d</b>	A	3,00	3,20	3,25	3,45	3,10	3,30	3,45	3,30	3,26	3,33	0,094861
		B	3,10	3,25	3,25	3,25	3,20	3,45	3,40	3,50	3,30		
		C	3,60	3,45	3,40	3,60	3,50	3,45	3,20	3,30	3,44		
	<b>6e</b>	A	3,45	3,50	3,55	3,60	3,20	3,25	3,20	3,50	3,41	3,39	0,021651
		B	3,60	3,00	3,45	3,10	3,40	3,50	3,45	3,45	3,37		
		C	3,50	3,55	3,10	3,25	3,45	3,50	3,60	3,30	3,41		
7-Ilhéus	<b>7a</b>	A	2,50	2,70	2,75	2,45	2,40	2,35	2,30	2,20	2,46	2,43	0,073243
		B	2,45	2,35	2,65	2,55	2,35	2,70	2,50	2,30	2,48		
		C	2,40	2,10	2,25	2,30	2,45	2,50	2,35	2,40	2,34		
	<b>7b</b>	A	2,00	1,90	1,75	1,50	1,70	1,60	1,95	2,10	1,81	1,98	0,148824
		B	2,15	2,25	2,45	2,30	2,10	1,95	1,80	1,75	2,09		
		C	2,10	2,25	2,30	1,80	1,75	1,90	2,20	2,00	2,04		
	<b>7c</b>	A	3,50	3,45	3,30	3,50	3,25	3,15	3,25	3,50	3,36	3,41	0,104021
		B	3,60	3,55	3,70	3,30	3,40	3,55	3,70	3,40	3,53		
		C	3,30	3,25	3,40	3,55	3,60	3,10	3,20	3,25	3,33		
	<b>7d</b>	A	3,00	2,90	2,70	2,80	3,10	2,05	2,85	2,90	2,90	2,95	0,043899
		B	3,10	3,15	2,90	2,95	2,80	2,95	2,80	2,95	2,95		
		C	2,95	2,80	3,10	3,25	3,15	2,90	2,95	2,80	2,99		
	<b>7e</b>	A	0,50	1,90	1,50	1,00	0,80	0,95	1,10	1,65	1,18	1,12	0,06856
		B	0,75	0,50	1,20	1,00	0,95	1,10	1,00	1,85	1,04		
		C	0,85	0,95	1,30	1,10	1,00	1,20	1,00	1,75	1,14		
	<b>7f</b>	A	2,50	2,30	2,45	2,15	2,25	2,10	2,30	2,50	2,32	2,39	0,09
		B	2,60	2,55	2,30	2,45	2,10	2,25	2,30	2,35	2,36		
		C	2,70	2,60	2,45	2,40	2,65	2,65	2,40	2,10	2,49		
8-Campinas	<b>8a</b>	A	2,00	1,85	1,80	2,20	1,80	1,75	2,20	2,15	1,97	1,99	0,08

		B	1,95	1,85	2,10	2,20	1,75	1,65	1,70	2,10	1,91		
		C	2,05	1,95	2,30	2,25	2,00	2,10	2,00	1,95	2,08		
	<b>8b</b>	A	3,45	3,50	3,40	3,20	3,25	3,15	3,50	3,30	3,34	3,38	0,03
		B	3,50	3,40	3,55	3,45	3,55	3,40	3,25	3,20	3,41		
		C	3,65	3,60	3,25	3,40	3,50	3,45	3,00	3,25	3,39		
9-Correntina	<b>9b</b>	A	2,70	2,80	2,95	2,70	2,65	2,60	2,75	2,80	2,74	2,79	0,05
		B	2,85	2,65	2,60	2,90	2,70	2,75	2,80	2,95	2,78		
		C	2,90	3,10	3,00	2,85	2,70	3,10	2,00	3,05	2,84		
	<b>9c</b>	A	2,60	2,45	2,35	2,40	2,35	2,70	2,75	2,50	2,51	2,50	0,01
		B	2,50	2,45	2,60	2,50	2,40	2,30	2,55	2,60	2,49		
		C	2,35	2,45	2,40	2,50	2,70	2,75	2,50	2,40	2,51		
10-Buerarema	<b>10a</b>	A	3,00	2,90	2,85	2,90	3,20	3,45	3,10	3,00	3,05	3,10	0,06
		B	3,35	3,25	3,20	3,15	2,95	2,80	2,90	3,00	3,08		
		C	3,45	3,40	3,25	3,15	3,25	3,20	2,85	2,80	3,17		
	<b>10b</b>	A	3,50	3,60	3,75	3,70	3,45	3,35	3,80	3,50	3,58	3,49	0,08
		B	3,55	3,60	3,25	3,30	3,25	3,50	3,45	3,50	3,43		
		C	3,60	3,55	3,45	3,60	3,40	3,45	3,50	3,25	3,48		
	<b>10d</b>	A	3,00	3,15	3,05	3,10	3,65	3,15	3,20	3,15	3,18	3,19	0,09
		B	3,25	3,25	3,20	3,15	3,00	2,95	3,00	3,05	3,11		
		C	3,05	3,35	3,50	3,35	3,25	3,30	3,20	3,30	3,29		
	<b>10e</b>	A	3,50	3,40	3,55	3,50	3,65	3,75	3,65	3,60	3,58	3,53	0,07
		B	3,90	3,45	3,50	3,35	3,50	3,40	3,30	3,25	3,46		
		C	3,40	3,60	3,35	3,70	3,65	3,60	3,70	3,55	3,57		
	<b>10f</b>	A	3,00	2,70	2,75	2,50	2,65	3,10	3,05	2,90	2,83	2,93	0,09
		B	3,05	3,05	2,90	3,05	3,10	3,05	3,15	2,70	3,01		
		C	2,90	2,95	2,70	2,85	2,95	3,00	3,20	3,05	2,95		
	<b>10g</b>	A	3,00	2,95	3,20	3,25	3,10	3,20	3,05	3,00	3,09	3,00	0,10
		B	2,85	2,90	2,95	2,80	2,75	2,80	2,90	3,20	3,89		
		C	3,05	3,10	3,00	3,15	2,90	2,85	3,10	3,00	3,02		
	<b>10h</b>		2,50	2,65	2,60	2,70	2,75	2,80	2,85	2,60	2,68	2,56	0,11
		B	2,45	2,55	2,70	2,55	2,45	2,40	2,80	2,55	2,56		
		C	2,30	2,45	2,55	2,65	2,20	2,35	2,45	2,70	2,46		
11-Barreiras	<b>11b</b>	A	0,55	0,70	0,75	0,80	0,65	0,60	0,70	0,75	0,69	0,69	0,01
		B	0,45	0,70	0,65	0,70	0,90	0,85	0,65	0,50	0,68		
		C	0,95	0,80	0,75	0,70	0,65	0,50	0,80	0,45	0,70		
12-Batatais	<b>12a</b>	A	3,20	3,45	3,35	3,45	3,60	3,65	3,50	3,25	3,43	3,49	0,06
		B	3,60	3,40	3,35	3,45	3,40	3,80	3,85	3,60	3,56		
		C	3,05	3,20	3,65	3,50	3,35	3,55	3,70	3,85	3,48		
	<b>12b</b>	A	3,00	2,90	2,80	3,10	3,15	2,95	2,80	2,85	2,94	2,98	0,06
		B	3,10	3,05	3,156	3,45	3,30	2,90	2,80	2,70	3,06		
		C	3,15	3,05	2,90	2,95	3,05	2,80	2,85	2,85	3,95		
13-Terra Nova	<b>13a</b>	A	2,50	2,45	2,30	2,70	2,60	2,35	2,40	2,30	2,45	2,49	0,04
		B	2,35	2,10	2,50	2,55	2,60	2,75	2,80	2,60	2,53		
		C	2,45	2,30	2,70	2,55	2,60	2,35	2,40	2,45	2,48		
	<b>13b</b>	A	0,85	0,90	0,60	0,65	0,75	0,65	0,80	0,85	0,76	0,74	0,06
		B	0,70	0,75	0,90	0,95	1,00	0,65	0,70	0,75	0,80		
		C	0,50	0,65	0,80	0,90	0,60	0,55	0,60	0,80	0,68		

1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 = medida (cm) da colônia de *Aspergillus ochraceus* (raio da placa de Petri)

\* média dos raios (cm).

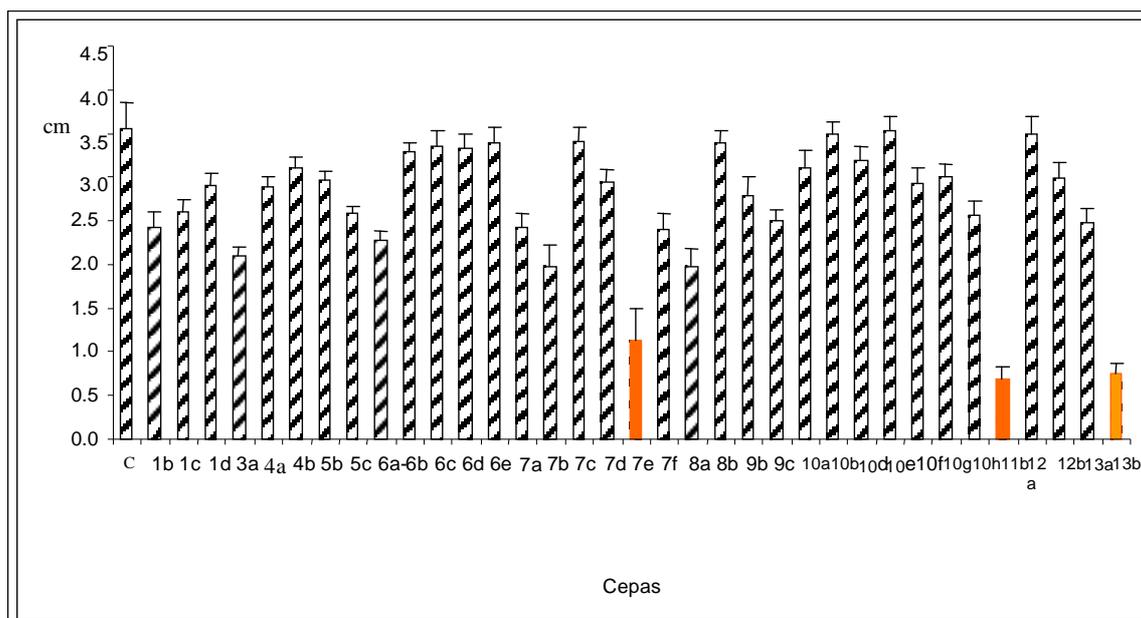
\*\* médias das repetições (cm).

Dp = desvio padrão.

Na Figura 15 observa-se graficamente a média do crescimento radial (cm) do micélio de *Aspergillus ochraceus* inoculado juntamente com as cepas de leveduras.

Das trinta e cinco cepas testadas, as três que revelaram maior potencial inibitório do micélio foram cepa 7e, cepa 11b e cepa 13b.

**FIGURA 15 - MÉDIA DO CRESCIMENTO RADIAL (cm) DA CEPA DE *Aspergillus ochraceus* EM PLACAS DE PETRI CONTENDO AS CEPAS DE LEVEDURAS**



C=placa controle (cepa de *Aspergillus ochraceus* em agar YM)

A análise de variância (ANOVA) evidenciou diferença significativa (5%) entre a ação fungistática das cepas testadas (Quadro 17).

**QUADRO 17 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO CRESCIMENTO RADIAL (cm) DA CEPA DE *Aspergillus ochraceus* INOCULADO EM PLACAS DE PETRI CONTENDO AS CEPAS DE LEVEDURAS**

ANOVA

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	Valor-P	F crítico
Cepas	446.2654	35	12.75044	443.9939	0	1.443595
Quadrantes	0.197555	7	0.028222	0.98275	0.442741	2.025462
Interações	8.69369	245	0.035484	1.235634	0.022676	1.190076
Dentro	16.54134	576	0.028718			
Total	471.6979	863				

SQ=soma dos quadrados  
 QM=quadrado médio  
 GL= graus de liberdade  
 F= teste de distribuição  
 Valor p = probabilidade  
 FC = fator crítico para  $\alpha=0,05$

Quando as médias ordenadas são comparadas pelo Teste de Tukey, observa-se que das trinta e cinco cepas testadas, doze não diferem estatisticamente do controle enquanto vinte e três revelaram diferentes graus de ação fungistática (Quadro 18).

**QUADRO 18 - MÉDIAS ORDENADAS DO CRESCIMENTO RADIAL (cm) DA CEPA DE *Aspergillus ochraceus* INOCULADO EM PLACAS CONTENDO CEPAS DE LEVEDURAS**

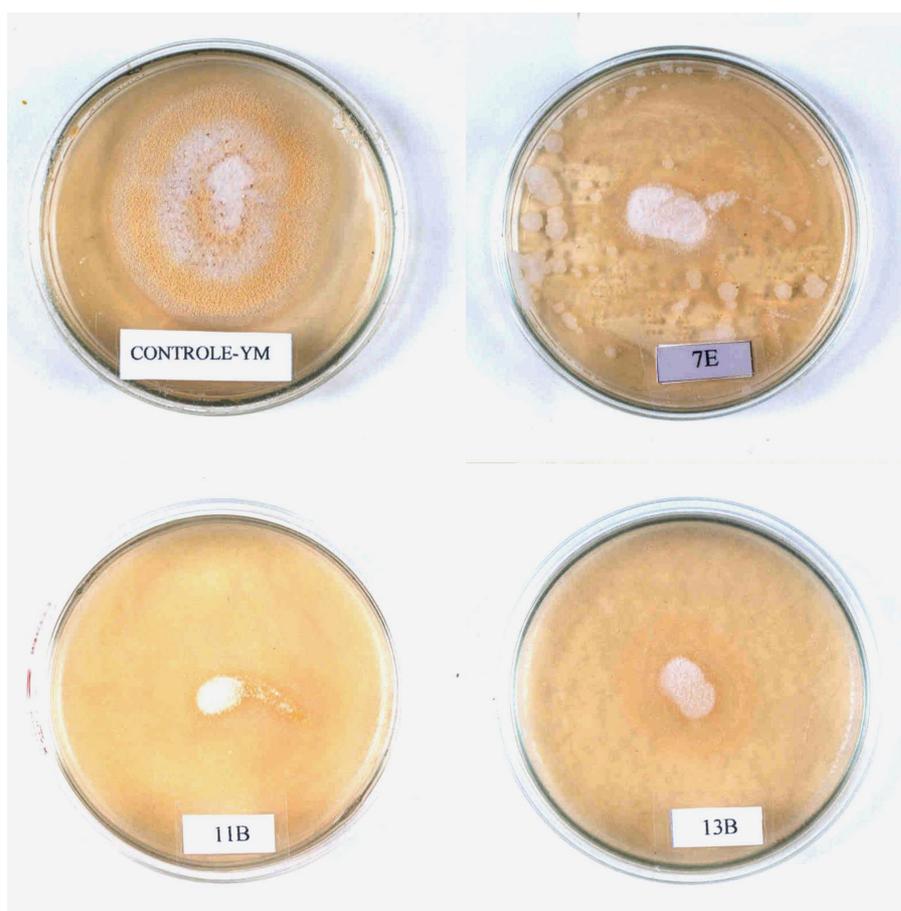
Cepas	Média	Diferenças
<b>Controle (cepa de <i>Aspergillus ochraceus</i>)</b>	<b>3.558</b>	
10e	3.533	0.025
10b	3.494	0.065
12 <sup>a</sup>	3.490	0.069
7c	3.406	0.152
6e	3.394	0.165
8b	3.381	0.177
6c	3.346	0.213
6d	3.331	0.227
6b	3.290	0.269
10d	3.192	0.367
4b	3.102	0.456
10a	3.098	0.460
10g	3.002	0.556
12b	2.983	0.575
5b	2.960	0.598
7d	2.946	0.613
10f	2.929	0.629
1d	2.906	0.652
4-Barra do Choça-4 <sup>a</sup>	2.888	0.671
9-Correntina-9b	2.785	0.773
1c	2.610	0.948
5c	2.575	0.983
10h	2.565	0.994
9c	2.502	1.056
13 <sup>a</sup>	2.485	1.073
1b	2.431	1.127
7 <sup>a</sup>	2.427	1.131
7f	2.392	1.167
6 <sup>a</sup>	2.271	1.288
3 <sup>a</sup>	2.096	1.463
8 <sup>a</sup>	1.985	1.573

<i>7b</i>	<i>1.981</i>	<i>1.577</i>
<i>7e</i>	<i>1.121</i>	<i>2.438</i>
<i>13b</i>	<i>0.744</i>	<i>2.815</i>
<i>11b</i>	<i>0.688</i>	<i>2.871</i>
Diferença mínima significativa (crítico)	0.30017	

As médias em itálico diferem do controle.

Das vinte e três cepas significativamente diferentes do controle, as três que revelaram maior ação fungistática foram selecionadas (7e, 13b e 11b) (Figura 16).

**FIGURA 16 - CRESCIMENTO RADIAL (cm) DA CEPA DE *Aspergillus ochraceus* INOCULADA EM PLACAS DE PETRI CONTENDO AS CEPAS DE LEVEDURAS QUE APRESENTARAM MAIOR AÇÃO FUNGISTÁTICA (7e, 11b e 13b)**



### 4.3.2 Seleção das cepas de bactérias lácticas

Os resultados do crescimento radial, da cepa de *Aspergillus ochraceus* inoculada nas placas de Petri contendo as cepas de bactérias lácticas estão expressos no Quadro 19. Das vinte cepas testadas a cepa LPB03 revelou maior ação antagônica quando comparada as demais.

**QUADRO 19 - CRESCIMENTO RADIAL (cm) DA CEPA DE *Aspergillus ochraceus* INOCULADA EM PLACAS DE PETRI CONTENDO AS CEPAS DE BACTÉRIAS LÁCTICAS**

Cepa	repetições	1	2	3	4	5	6	7	8	Média*	Média**	Dp
<i>Aspergillus ochraceus</i>	A	4,10	4,00	3,80	3,60	4,10	4,00	4,00	4,00	3,95	3,93	0,033072
	B	4,10	4,25	3,90	3,85	3,65	3,85	3,90	4,00	3,94		
	C	4,00	4,00	4,05	4,00	3,80	3,75	3,50	4,00	3,89		
LPB01	A	3,90	3,60	3,65	3,70	3,80	3,95	3,70	3,70	3,75	3,69	0,05625
	B	3,80	2,90	3,70	3,75	3,80	3,95	3,65	3,55	3,64		
	C	3,70	3,60	3,55	3,50	3,70	3,85	3,90	3,75	3,69		
LPB02	A	2,65	2,40	2,10	2,25	2,30	2,35	2,70	2,45	2,40	2,43	0,076801
	B	2,55	2,35	2,40	2,30	2,50	2,40	2,20	2,30	2,38		
	C	2,40	2,50	2,65	2,55	2,30	2,40	2,70	2,65	2,52		
LPB03	A	1,90	1,70	1,90	1,35	1,35	2,10	1,80	1,35	1,68	1,70	0,039693
	B	1,85	1,90	1,70	1,70	1,50	1,45	1,90	2,00	1,75		
	C	1,60	1,65	1,50	1,85	1,80	1,80	1,45	1,80	1,68		
LPB04	A	2,35	2,00	1,95	1,90	2,05	2,15	2,25	2,10	2,09	2,08	0,009547
	B	2,30	2,35	2,10	2,20	1,95	1,85	1,70	2,15	2,08		
	C	2,05	2,15	2,35	2,00	1,95	2,10	2,05	2,00	2,08		
LPB05	A	2,80	2,75	2,65	2,60	2,75	2,55	2,80	2,85	2,72	2,87	0,135833
	B	2,90	3,10	3,05	2,95	3,15	2,70	2,75	2,80	2,93		
	C	3,00	3,05	3,10	2,95	2,80	2,85	3,05	3,00	2,98		
LPB06	A	2,55	2,40	2,35	2,00	2,05	2,15	2,60	2,35	2,31	2,38	0,071908
	B	2,45	2,50	2,35	2,45	2,15	2,35	2,25	2,50	2,37		
	C	2,65	2,70	2,40	2,35	2,40	2,35	2,40	2,35	2,45		
LPB07	A	2,60	2,75	2,80	2,45	2,55	2,60	2,70	2,95	2,68	2,51	0,146175
	B	2,45	2,35	2,15	2,70	2,45	2,60	2,30	2,35	2,42		
	C	2,60	2,75	2,30	2,25	2,30	2,15	2,45	2,60	2,43		
LPB08	A	3,20	3,25	3,40	3,55	3,70	3,65	3,30	3,40	3,43	3,27	0,141283
	B	3,10	3,45	3,20	3,05	3,00	3,35	3,20	3,25	3,20		
	C	3,00	3,15	3,25	3,05	3,25	3,35	3,20	3,15	3,18		
LPB09	A	2,70	2,70	3,50	2,50	3,30	2,50	2,70	2,50	2,80	2,66	0,180478
	B	2,85	2,70	2,75	2,55	3,40	2,30	2,85	2,45	2,73		
	C	2,45	2,65	2,75	2,10	2,95	2,00	2,52	2,25	2,46		
LPB10	A	3,75	3,90	4,00	3,90	4,05	3,90	3,90	4,10	3,94	3,85	0,091073
	B	4,00	4,10	4,75	3,85	3,90	3,85	3,70	3,75	3,86		
	C	3,90	3,85	3,60	3,60	3,55	3,75	3,85	3,95	3,76		
LPB11	A	3,00	3,15	3,25	3,00	3,40	3,00	3,05	3,15	3,13	3,00	0,125052
	B	2,70	2,80	2,85	2,95	2,50	2,90	3,10	3,20	2,88		
	C	2,80	2,95	2,85	3,05	3,00	3,15	3,15	3,00	2,99		
LPB14	A	3,10	3,20	3,25	3,20	3,50	3,55	3,45	3,50	3,34	3,39	0,061555
	B	3,25	3,30	3,40	3,45	3,55	3,60	3,55	3,60	3,46		
	C	3,00	3,15	3,25	3,05	3,65	3,70	3,75	3,45	3,38		
LPB15	A	2,60	2,65	2,70	2,55	2,35	2,45	2,10	2,05	2,43	2,52	0,080081
	B	2,75	2,70	2,55	2,65	2,60	2,45	2,50	2,40	2,58		
	C	2,70	2,45	2,55	2,65	2,75	2,80	2,45	2,40	2,56		
LPB-R01	A	2,10	2,05	2,20	2,25	2,15	2,10	2,05	1,90	2,10	2,09	0,059739
	B	2,35	2,25	2,00	1,95	1,80	1,90	1,90	2,10	2,03		
	C	2,45	2,00	2,30	2,25	2,15	2,30	1,95	1,80	2,15		
LPB-R02	A	3,00	3,05	3,10	3,15	3,35	3,20	3,15	3,05	3,13	3,02	0,1068
	B	2,95	3,05	3,10	3,15	3,05	2,95	2,80	3,00	3,01		
	C	2,75	2,80	2,65	2,90	2,95	3,00	3,15	3,15	2,92		
LPB-R03	A	3,50	3,55	3,50	3,70	3,75	3,60	3,65	3,80	3,63	3,61	0,022535
	B	3,45	3,45	3,55	3,65	3,70	3,80	3,65	3,45	3,59		
	C	3,60	3,65	3,55	3,50	3,45	3,70	3,75	3,60	3,60		

LPB-R04	A	3,20	3,00	3,10	3,05	2,95	2,70	2,90	2,85	2,97	3,10	0,134484
	B	3,40	3,35	3,65	3,40	3,35	3,05	3,00	2,70	3,24		
	C	3,20	3,10	3,00	3,05	2,95	2,90	3,20	3,35	3,09		
LPB-R06	A	2,10	2,05	2,00	1,95	1,90	1,80	2,05	2,00	1,98	2,05	0,098226
	B	2,00	2,35	2,15	2,00	2,20	2,35	2,15	2,10	2,16		
	C	1,85	1,90	1,65	2,10	2,15	2,00	2,25	2,15	2,01		
LPB-R07	A	3,50	3,40	3,55	3,35	3,30	3,10	3,00	3,00	3,28	3,23	0,06
	B	3,55	3,25	3,35	3,45	3,35	3,05	3,00	2,95	3,24		
	C	3,40	3,34	3,25	3,30	3,20	3,10	3,00	2,75	3,17		
LPB-R08	A	3,00	2,95	2,80	2,75	3,05	3,10	3,20	3,15	3,00	2,95	0,05
	B	2,95	2,70	2,75	2,90	2,80	3,10	3,05	2,95	2,90		
	C	2,85	2,65	2,80	2,90	3,00	3,10	3,05	3,25	2,95		

1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 = medida (cm) da colônia de *Aspergillus ochraceus* (raio da placa de Petri)

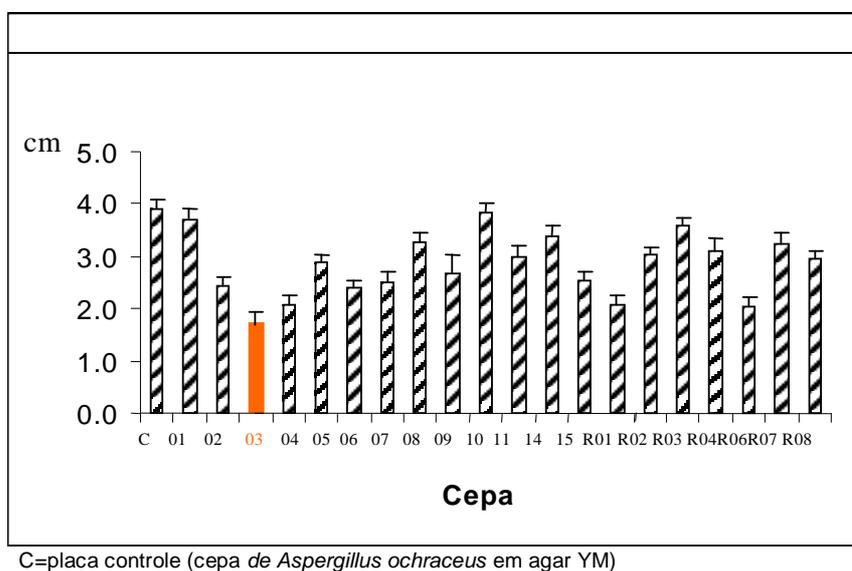
\* média dos raios (cm).

\*\* médias das repetições (cm).

Dp = desvio padrão.

Na Figura 17 observa-se graficamente a média do crescimento radial (cm) das vinte cepas testadas comparadas ao controle (cepa de *Aspergillus ochraceus*), destacando maior ação da cepa LPB03.

**FIGURA 17 - MÉDIA DO CRESCIMENTO RADIAL (cm) DA CEPA DE *Aspergillus ochraceus* EM PLACAS DE PETRI CONTENDO AS CEPAS DE BACTÉRIAS LÁCTICAS**



A análise de variância (ANOVA) evidenciou diferença significativa (5%) entre a ação fungistática das cepas testadas (Quadro 20).

**QUADRO 20 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA, DO CRESCIMENTO RADIAL (cm) DA  
CEPA DE *Aspergillus ochraceus* INOCULADO EM PLACAS DE  
PETRI CONTENDO AS CEPAS DE BACTÉRIAS LÁCTICAS**

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Cepas	190.4254	20	9.521269	301.8859	4.6E-201	1.601906
Quadrantes	0.216889	7	0.030984	0.982397	0.443834	2.036863
Interações	7.778973	140	0.055564	1.761742	1.8E-05	1.25618
Dentro	10.5972	336	0.031539			
Total	209.0184	503				

SQ=soma dos quadrados  
 QM=quadrado médio  
 GL= graus de liberdade  
 F= teste de distribuição  
 Valor p = probabilidade  
 FC = fator crítico para  $\alpha=0,05$

Quando as médias ordenadas são comparadas pelo Teste de Tukey, observa-se que seis das vinte cepas testadas, não diferem estatisticamente do controle enquanto quatorze revelam diferentes graus de ação fungistática (Quadro 21).

**QUADRO 21 - MÉDIAS ORDENADAS DO CRESCIMENTO RADIAL (cm) DA  
CEPA DE *Aspergillus ochraceus* INOCULADO EM PLACAS  
CONTENDO CEPAS DE BACTÉRIAS LÁCTICAS**

Controle (cepa de <i>Aspergillus ochraceus</i> )	3.925	Diferenças
LPB10	3.852	0.0729
LPB01	3.694	0.2313
LPB-R03	3.606	0.3188
LPB14	3.394	0.5313
LPB08	3.269	0.6563
LPB-R07	3.229	0.6965
LPB-R04	3.100	0.8250
LPB-R02	3.019	0.9063
LPB11	2.998	0.9271
LPB-R08	2.950	0.9750
LPB05	2.873	1.0521
LPB09	2.663	1.2617
LPB15	2.533	1.3917
LPB07	2.506	1.4188
LPB02	2.431	1.4938
LPB06	2.377	1.5481
LPB-R01	2.094	1.8312

<i>LPB04</i>	2.083	1.8417
<i>LPB-R06</i>	2.050	1.8750
<b><i>LPB03</i></b>	<b>1.704</b>	<b>2.2208</b>
Diferença mínima significativa (crítico)	0.314571	

as médias em itálico diferem do controle

Das quatorze cepas significativamente diferentes do controle, a que revelou maior ação fungistática (cepa LPB03) foi selecionada (Figura 18).

**FIGURA 18 - CRESCIMENTO RADIAL (cm) DA CEPA DE *Aspergillus ochraceus* INOCULADA EM PLACAS DE PETRI CONTENDO A CEPA DE BACTÉRIA LÁCTICA QUE APRESENTOU MAIOR AÇÃO FUNGISTÁTICA (LPB03)**



#### 4.4 AVALIAÇÃO DA AÇÃO FUNGISTÁTICA EM MEIO SÓLIDO (PLACA DE ÁGAR COM ORIFÍCIO) - SELECÃO DAS CEPAS DE LEVEDURAS E BACTÉRIAS LÁCTICAS ISOLADAS CONTRA *Aspergillus ochraceus* OCRATOXIGÊNICO MEDIANTE MEDIDA DO HALO DE INIBIÇÃO SOB DIFERENTES pH

##### 4.4.1 Leveduras (cepas 7e, 11b e 13b)

Os resultados da medida do halo de inibição (cm), sob diferentes pH, das cepas de leveduras (7e, 11b,e 13b) inoculadas em placas de Petri contendo a cepa de *Aspergillus ochraceus* estão expressos no Quadro 22 onde pode-se observar que as cepas 7e e 11b não revelaram formação de halo de inibição.

**QUADRO 22 - MEDIDA DO HALO DE INIBIÇÃO (cm) DAS CEPAS DE LEVEDURAS (7e, 11b e 13b) INOCULADA EM PLACAS DE PETRI CONTENDO *Aspergillus ochraceus***

pH	Cepa	Repetições	1	2	3	4	5	6	7	8	Média*	Média**	Dv*
4,5	7e	A	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	-
		B	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25		
		C	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25		
5	7e	A	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	-
		B	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25		
		C	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25		
6	7e	A	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	-
		B	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25		
		C	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25		
7	7e	A	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	-
		B	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25		
		C	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25		
3,8	11b	A	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	-
		B	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25		
		C	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25		
5	11b	A	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	-
		B	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25		
		C	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25		
6	11b	A	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	-
		B	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25		
		C	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25		
7	11b	A	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	-
		B	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25		
		C	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25		
4,5	13b	A	0,95	1,10	0,95	0,55	0,50	0,60	1,00	0,75	0,80	<b>0,82</b>	<b>0,022535</b>
		B	0,90	0,95	0,95	0,65	0,70	0,80	1,00	0,80	0,84		
		C	0,65	0,80	0,75	0,90	0,85	0,95	0,70	0,90	0,81		
5	13b 0	A	0,85	0,75	0,65	0,75	0,90	0,70	0,75	0,90	0,78	<b>0,81</b>	<b>0,022535</b>
		B	0,90	0,95	1,00	0,75	0,90	0,70	0,65	0,65	0,81		
		C	0,90	0,75	0,80	1,10	0,65	0,80	0,70	0,90	0,83		
6	13b	A	0,85	1,10	1,00	0,70	0,65	0,95	0,65	0,55	0,81	<b>0,79</b>	<b>0,0125</b>
		B	0,90	1,00	0,95	0,75	0,55	0,90	0,70	0,60	0,79		
		C	0,90	0,90	1,10	0,80	0,65	0,70	0,65	0,55	0,78		
7	13b	A	0,75	0,80	0,80	0,95	0,60	0,80	1,00	0,75	0,81	<b>0,78</b>	<b>0,021949</b>
		B	0,60	0,90	0,95	0,70	0,55	0,60	1,10	0,80	0,78		
		C	0,70	0,55	0,60	0,90	1,00	0,55	0,95	0,85	0,76		

1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 = raios da placa de Petri (cm).

\* média dos raios.

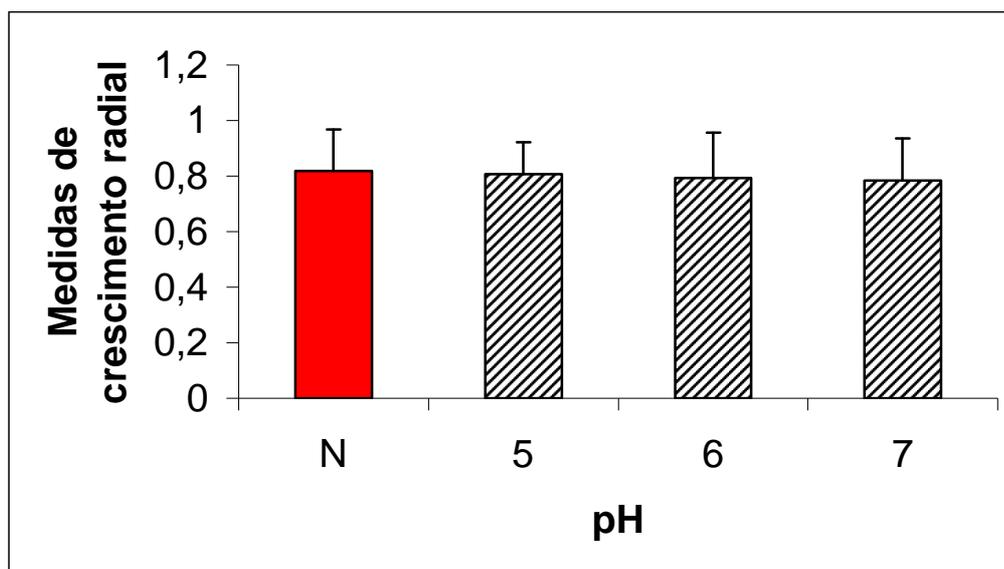
\*\* média entre as repetições.

Dv = desvio padrão.

<0,25 = ausência de halo de inibição.

Na Figura 19 observa-se graficamente a medida do halo de inibição da cepa de *C.lambica* 13b, onde os tratamentos em diferentes pH revelaram não haver diferença estatisticamente significativa.

**FIGURA 19 –MEDIDA DO HALO DE INIBIÇÃO DA CEPA DE *C.lambica* 13b, SOB DIFERENTES pH, INOCULADA EM PLACA DE PETRI CONTENDO *Aspergillus ochraceus***



N=4,5 (pH do inoculo após incubação, sem correção de pH)

A análise estatística da medida do halo de inibição não demonstrou haver diferença significativa entre os pH testados, revelando que a ação fungistática está relacionada a metabólitos produzidos pela cepa 13b após incubação e não a acidificação do meio de cultura, visto que nos demais pH a ação fungistática foi mantida.

Das três cepas testadas apenas a cepa 13b revelou ação fungistática contra *Aspergillus ochraceus*, independente dos pH testados.

Conforme item 4.2.2, a cepa de levedura 13b foi identificada como *Candida lambica*. Segundo RIJ (1984), essa espécie é também reconhecida como *Pichia fermentans*, tendo sido isolada primeiramente de queijos, suco de laranja e kefir.

Em sementes de cacau foram isoladas por AGELL (2004), juntamente com *Candida krusei*, *Saccharomyces sp* e *Hansenula anomala*.

#### 4.4.2 Bactéria láctica

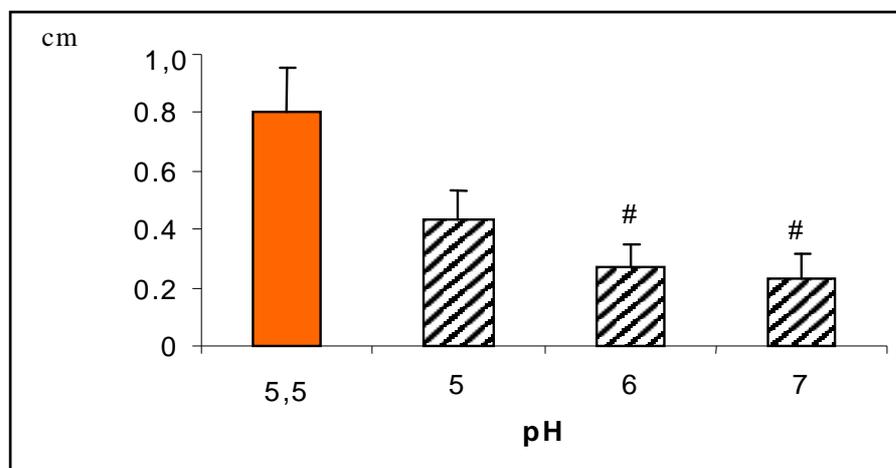
Os resultados da medida do halo de inibição (cm), sob diferentes pH, da cepa de bactéria láctica (LPB03) inoculadas em placas de Petri contendo a *Aspergillus ochraceus*, estão expressos no Quadro 23 no qual pode-se observar que houve diferença estatisticamente significativa entre os pH testados..

**QUADRO 23 - MEDIDAS DO HALO DE INIBIÇÃO (cm) DA CEPA DE *L.brevis* LPB03 INOCULADA EM PLACAS DE PETRI CONTENDO *Aspergillus ochraceus***

PH	Cepa	Repetições	1	2	3	4	5	6	7	8	Média*	Média**	dv*
5,5	LPB03	A	0,85	1,10	1,00	0,70	0,65	0,95	0,65	0,55	0,81	0,80	0,009547
		B	0,70	0,90	1,10	0,60	0,65	0,90	0,85	0,65	0,79		
		C	0,80	0,95	0,80	0,95	0,65	0,70	0,80	0,85	0,81		
5	LPB03	A	0,45	0,40	0,55	0,50	0,45	0,35	0,50	0,55	0,47	0,43	0,030831
		B	0,45	0,30	0,35	0,40	0,30	0,60	0,55	0,40	0,42		
		C	0,65	0,55	0,35	0,30	0,25	0,35	0,40	0,45	0,41		
6	LPB03	A	0,25	0,20	0,45	0,20	0,35	0,40	0,20	0,15	0,28	0,27	0,014543
		B	0,25	0,25	0,30	0,15	0,25	0,20	0,30	0,30	0,25		
		C	0,30	0,35	0,40	0,15	0,35	0,30	0,15	0,20	0,28		
7	LPB03	A	0,15	0,45	0,35	0,25	0,20	0,15	0,15	0,20	0,24	0,23	0,003608
		B	0,25	0,15	0,25	0,30	0,30	0,25	0,15	0,20	0,23		
		C	0,20	0,15	0,15	0,30	0,35	0,20	0,15	0,35	0,23		

Na Figura 20 observa-se graficamente as medidas do halo de inibição da cepa de bactéria láctica LPB03, sob diferentes pH.

**FIGURA 20 –MEDIDA DO HALO DE INIBIÇÃO DA CEPA DE *L.brevis* LPB03, SOB DIFERENTES pH, INOCULADA EM PLACA DE PETRI CONTENDO *Aspergillus ochraceus***



# - Sem diferenças significativas quando comparados par a par (teste Tukey).

A análise estatística da medida do halo de inibição demonstrou não haver diferença significativa dos pH, quando comparados para a par (5,5 e 5) e (6 e 7), revelando que a ação fungistática pode ser devida a acidificação do inóculo após incubação e não a metabólitos gerados pela cepa de bactéria láctica LPB03.

Essa cepa de bactéria láctica LPB03, foi identificada por PAGNONCELLI (2002), como *Lactobacillus brevis*, apresentando característica heteroláctica (após fermentação os metabólitos produzidos foram ácido láctico, ácido acético, ácido propiônico e etanol).

#### 4.5 CULTURA SUBMERSA - AVALIAÇÃO VISUAL DA AÇÃO FUNGISTÁTICA DAS CEPAS DE *Candida lambica* 13b e *Lactobacillus brevis* LPB03 INOCULADAS EM CALDO CONTENDO SUSPENSÃO DE ESPOROS DE *Aspergillus ochraceus*

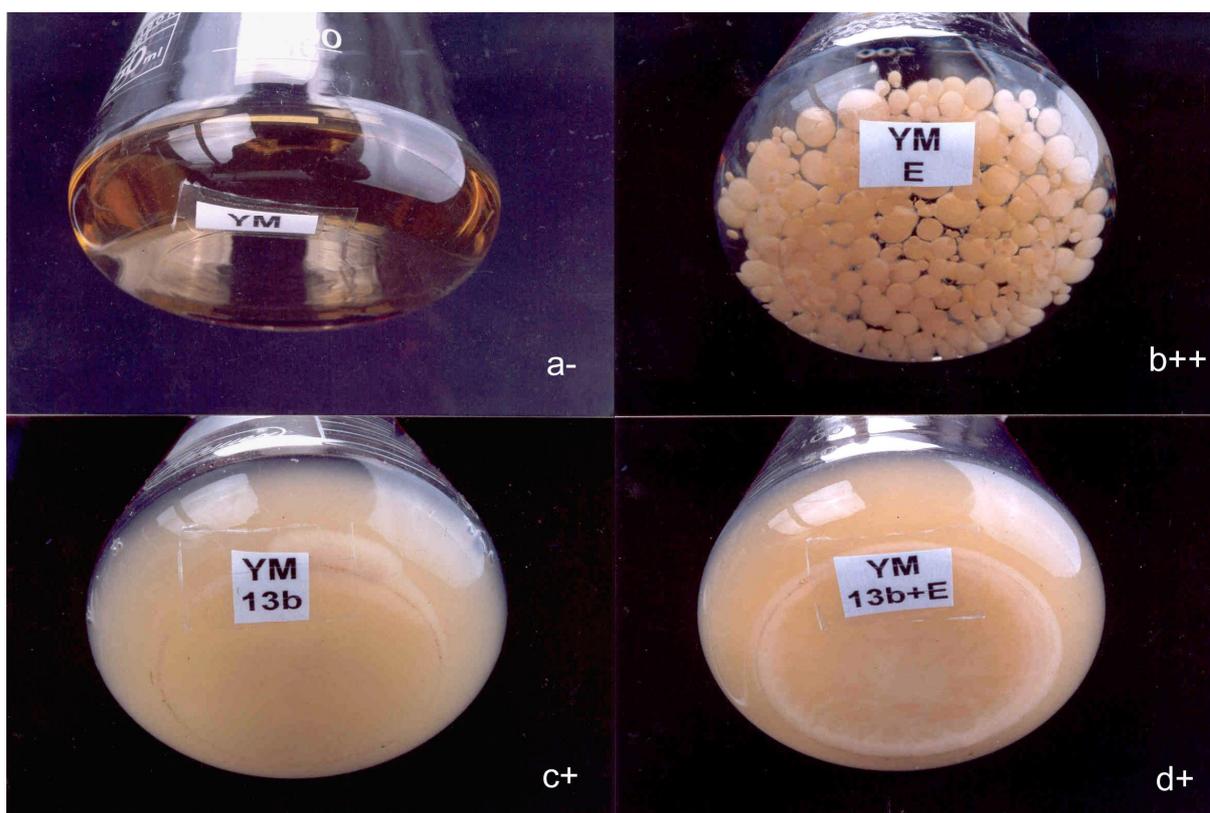
A partir da medida crescimento radial e formação do halo de inibição, foi possível selecionar as cepas que revelaram maior ação fungistática (cepa de levedura 13b-*Candida lambica* e cepa de bactéria láctica LPB03-*Lactobacillus brevis*) quando inoculadas em meio sólido contendo esporos de *Aspergillus ochraceus*,

A ação fungistática em meio líquido das cepas selecionadas foi avaliada previamente pelo controle visual do crescimento.

#### 4.5.1 Cultura submersa em Caldo YM inoculado com a cepa de *Candida lambica* 13b e esporos de *Aspergillus ochraceus*

Os resultados obtidos após 5 dias de fermentação do Caldo YM inoculado com a cepa de *Candida lambica* 13b juntamente com a suspensão de esporos do *Aspergillus ochraceus* revelaram inibição de desenvolvimento do micélio fúngico (Figura 21).

**FIGURA 21 – AVALIAÇÃO VISUAL DA AÇÃO FUNGISTÁTICA DA CEPA DE *C.lambica* 13b INOCULADA EM CALDO CONTENDO SUSPENSÃO DE ESPOROS DE *Aspergillus ochraceus***

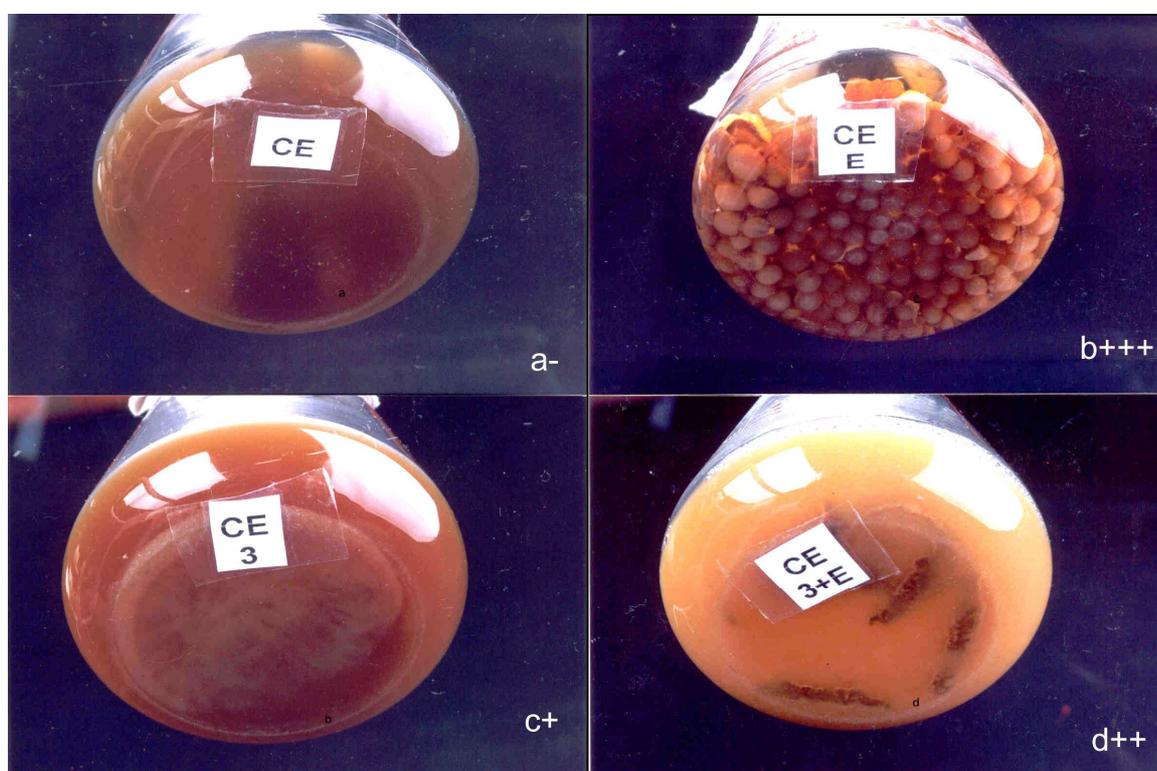


-ausência de crescimento;  
 +crescimento miceliano imperceptível (turbacão);  
 ++crescimento miceliano visível (pellets presentes);  
 a = controle negativo (-); b = controle positivo 2(*Aspergillus ochraceus*) (++); c = controle positivo 1 (cepa 13b) (+); d = teste (+).

#### 4.5.2 Cultura submersa em Caldo Enriquecido inoculado com a cepa de *Lactobacillus brevis* LPB03 e esporos de *Aspergillus ochraceus*

Os resultados obtidos após 5 dias de fermentação do Caldo Enriquecido inoculado com a cepa de *Lactobacillus brevis* LPB03 juntamente com a suspensão de esporos do *Aspergillus ochraceus* não revelaram inibição do desenvolvimento do micélio fúngico (Figura 22).

**FIGURA 22 –AVALIAÇÃO VISUAL DA AÇÃO FUNGISTÁTICA DA CEPA DE BACTÉRIA LÁCTICA LPB03 INOCULADA EM CALDO CONTENDO SUSPENSÃO DE ESPOROS DE *Aspergillus ochraceus***



-ausência de crescimento;  
 +crescimento miceliano imperceptível (turbacão);  
 ++crescimento miceliano visível (pellets presentes);  
 a = controle negativo (-); b = controle positivo 2(*Aspergillus ochraceus*) (+++); c = controle positivo 1(cepa LPB03) (+); d = teste (++)

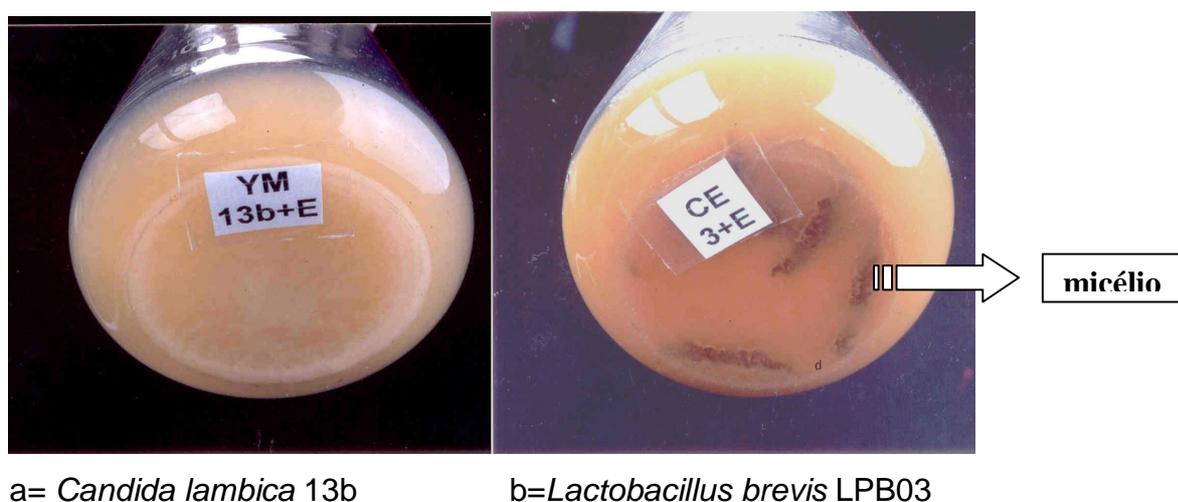
Comparando-se os resultados obtidos nos frascos teste com os frascos controle, observa-se que no frasco contendo o Caldo YM inoculado com a cepa de *Candida lambica* 13b houve turbacão; no frasco contendo o Caldo YM inoculado com a suspensão de esporos de *Aspergillus ochraceus*, houve crescimento

miceliano com formação de “pellets” e no frasco teste (contendo o Caldo YM inoculado com a cultura da cepa de *Candida lambica* 13b e suspensão de esporos de *Aspergillus ochraceus*) houve apenas turvação não revelando formação de micélio.

No frasco contendo Caldo Enriquecido inoculado com a cepa de *Lactobacillus brevis* LPB03 houve turvação; no frasco contendo o Caldo Enriquecido inoculado com a suspensão de esporos de *Aspergillus ochraceus*, houve crescimento miceliano com formação de “pellets” e no frasco teste (contendo o Caldo Enriquecido inoculado com a cultura da cepa de *Lactobacillus brevis* LPB03 e suspensão de esporos de *Aspergillus ochraceus*) houve formação de micélio, sem formação de “pellets”.

Na figura 23 observa-se o frasco a, contendo o Caldo YM inoculado com a cultura da cepa de *Candida lambica* 13b e suspensão de esporos de *Aspergillus ochraceus* revelando apenas turvação, sem formação de micélio e o frasco b contendo o Caldo Enriquecido inoculado com a cepa de *Lactobacillus brevis* LPB03 e suspensão de esporos de *Aspergillus ochraceus* com formação de micélio.

**FIGURA 23 – COMPARAÇÃO VISUAL DO DESENVOLVIMENTO DO MICÉLIO DE *Aspergillus ochraceus* INOCULADO EM CALDO CONTENDO CEPA DE *Candida lambica* 13b E CEPA DE *Lactobacillus brevis* LPB03**



#### 4.6 CULTURA SUBMERSA - AVALIAÇÃO DA AÇÃO FUNGISTÁTICA DA CEPA DE *Candida lambica* 13b E *Lactobacillus brevis* LPB03 MEDIANTE QUANTIFICAÇÃO DA BIOMASSA E OCRATOXINA PRODUZIDAS PELA CEPA DE *Aspergillus ochraceus* EM CALDO EXTRATO DE CAFÉ VERDE

Baseando-se nos resultados obtidos optou-se por prosseguir os experimentos com fermentação submersa, modificando o meio de cultura utilizado (Caldo Extrato de Café Verde).

##### 4.6.1 Biomassa

Os resultados da biomassa (g/1000 mL) produzida pelo *Aspergillus ochraceus* em Caldo Extrato de Café Verde estão expressos no Quadro 24.

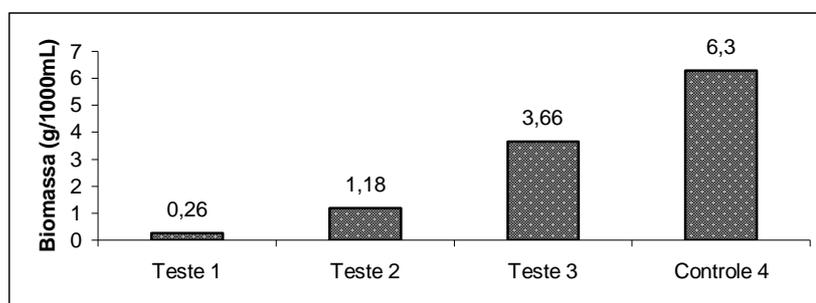
**QUADRO 24- BIOMASSA (g/1000 mL) PRODUZIDA PELO *Aspergillus ochraceus* EM CALDO EXTRATO DE CAFÉ VERDE**

Experimentos	A	B	C	Média
Controle1-(CEC)	0,02	0,03	0,02	0,02
Controle2-(CEC + <i>C.lambica</i> 13b)	0,05	0,04	0,06	0,05
Controle3-(CEC + <i>L.brevis</i> LPB03)	0,03	0,03	0,04	0,03
Teste1-(CEC + <i>C.lambica</i> 13b+ <i>Aspergillus ochraceus</i> )	0,26	0,29	0,25	0,26
Teste2-(CEC + <i>L.brevis</i> LPB03 + <i>Aspergillus ochraceus</i> )	1,25	1,13	1,18	1,18
Teste3-(CEC + <i>C.lambica</i> 13b + <i>L.brevis</i> LPB03 + <i>Aspergillus ochraceus</i> )	3,84	3,62	3,53	3,66
Controle4-(CEC+ <i>Aspergillus ochraceus</i> )	6,37	6,12	6,42	6,30

CEC=Caldo Extrato de Café.

Comparando-se os resultados da biomassa (g/1000 mL) obtidos no frasco controle 4 (caldo extrato de café verde inoculado com suspensão de esporos de *Aspergillus ochraceus*) com os frascos testes (1, 2 e 3), observa-se que quando a cepa de *Candida lambica* 13b foi inoculada juntamente com o *Aspergillus ochraceus* houve uma redução de 95,87% da massa miceliana, quando a cepa de *Lactobacillus brevis* LPB03 foi inoculada juntamente com o *Aspergillus ochraceus* a redução foi de 81,26%; porém quando ambas estavam presentes o percentual de redução foi de apenas 41,90% (Figura 24).

**FIGURA 24 - BIOMASSA (g/1000 mL) FORMADA POR *Aspergillus ochraceus* APÓS FERMENTAÇÃO SUBMERSA**



Teste1(CEC + *C.lambica* 13b+ *Aspergillus ochraceus*)

Teste2-(CEC + *L.brevis* LPB03 +*Aspergillus ochraceus*)

Teste3-(CEC + *C.lambica* 13b + *L.brevis* LPB03 + *Aspergillus ochraceus*)

Controle4-(CEC+*Aspergillus ochraceus*)

A análise estatística (Teste de Tukey) revelou haver diferença significativa entre a biomassa formada pelo *Aspergillus ochraceus* inoculado em caldo extrato de café verde contendo a cepa de *Candida lambica* 13b, de *Lactobacillus brevis* LPB03 ou ambas quando comparada ao controle (frasco contendo suspensão de esporos de *Aspergillus ochraceus*). Dessa forma, apesar da cepa de *Candida lambica* 13b e da cepa de *Lactobacillus brevis* LPB03 inibirem o desenvolvimento miceliano, a cepa de *Candida lambica* 13b apresentou maior ação fungistática comprovando os resultados inicialmente obtidos na avaliação visual (Quadro 25).

**QUADRO 25 - TESTE DE TUKEY APLICADO AOS RESULTADOS DA BIOMASSA (g/1000 mL) OBTIDOS NOS FRASCOS TESTE E CONTROLES**

RESUMO	Média	Teste Tukey
Controle 4-(CEC+ <i>Aspergillus ochraceus</i> )	6.30	a
Teste 3-(CEC + <i>C. lambica</i> 13b + <i>L.brevis</i> LPB03 + <i>Aspergillus ochraceus</i> )	3.66	b
Teste 2-(CEC + <i>L.brevis</i> LPB03 + <i>Aspergillus ochraceus</i> )	1.19	c
Teste 1-(CEC + <i>C.lambica</i> 13b + <i>Aspergillus ochraceus</i> )	0.27	d
Controle-(CEC + <i>C.lambica</i> 13b)	0.05	e
Controle-(CEC + <i>L.brevis</i> LPB03)	0.03	e
Controle-(CEC)	0.02	e

Letras diferentes indicam comparações par a par estatisticamente significativas (Teste Tukey).  
CEC=Caldo extrato de café verde

#### 4.6.2 Ocratoxina

Os cromatogramas da ocratoxina, não revelaram produção de ocratoxina A em níveis detectáveis (Anexo 6), apesar de ter havido formação de biomassa fúngica, em diferentes percentuais, nos frascos contendo caldo extrato de café verde inoculados com *Candida lambica* 13b, *Lactobacillus brevis* LPb03 e ou *Aspergillus ochraceus*,

Segundo SCUSSEL (2000), o desenvolvimento de fungos toxigênicos e a produção de micotoxinas é dependente de um complexo conjunto de fatores sendo os principais, a suscetibilidade do substrato, a colonização do fungo produtor, a temperatura e umidade do substrato, a umidade relativa do ar durante o armazenamento e a capacidade biológica do fungo produzir micotoxinas, além de que a presença de um fungo viável produtor de toxina não indica necessariamente que a toxina esteja presente (ICMSF, 2000).

A ocratoxina desenvolve-se em substratos sólidos e segundo FURLANI, OLIVEIRA e SOARES (1998), é produzida no café principalmente na etapa pós-colheita quando os grãos de café são transportados e armazenados em condições de umidade relativa alta e ou ainda úmidos.

A partir da confirmação de que a cepa de *Candida lambica* 13b e a cepa *Lactobacillus brevis* LPB03 apresentaram ação fungistática, inibindo a formação de biomassa de *Aspergillus ochraceus* em fermentação submersa (mesmo que em percentuais estatisticamente diferentes), decidiu-se quantificar a ocratoxina em grãos de café verde.

Segundo MACHADO (2002), a cultura no estado sólido é considerada mais natural que outros tipos de fermentações, porque seus processos assemelham-se às condições sob as quais a maioria dos microrganismos cresce na natureza.

#### 4.7 AVALIAÇÃO DA AÇÃO FUNGISTÁTICA DA CEPA DE *Candida lambica* 13b e DA CEPA DE *Lactobacillus brevis* LPB03 MEDIANTE AVALIAÇÃO VISUAL DO CRESCIMENTO DO *Aspergillus ochraceus* E QUANTIFICAÇÃO DA OCRATOXINA EM GRÃOS DE CAFÉ VERDES

Os resultados da umidade e atividade de água dos grãos de café verde antes da inoculação com os microrganismos teste e após 05 dias de incubação constam no Quadro 26.

**QUADRO 26 - RESULTADOS DA ANÁLISE DE UMIDADE (g/100 g) E ATIVIDADE ÁGUA DOS GRÃOS DE CAFÉ VERDE ANTES DA INOCULAÇÃO E APÓS 05 DIAS DE INCUBAÇÃO**

Grãos de café verde	Umidade (g/100 g)	Atividade água
Antes da inoculação	11,41	0,63
Após 05 dias de incubação a 25°C	23,11	0,97

Os grãos de café verde apresentavam condições ótimas de estabilidade antes da inoculação (Figura 25), com teor de umidade de 11,41% a atividade de água 0,63, atendendo ao padrão máximo de umidade de 12%, estabelecido pela Instrução Normativa número 08 de 11 de junho de 2003 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento que aprova o regulamento técnico de Identidade e qualidade do Café Beneficiado Grão Cru (ou verde) (BRASIL, 2003) e ao reportado por PITT (1997) considerando que o micélio do *Aspergillus ochraceus* desenvolve-se em atividade de água mínima de 0,76 a 25°C.

**FIGURA 25 - ASPECTO DOS GRÃOS DE CAFÉ VERDES, ANTES DA INOCULAÇÃO**

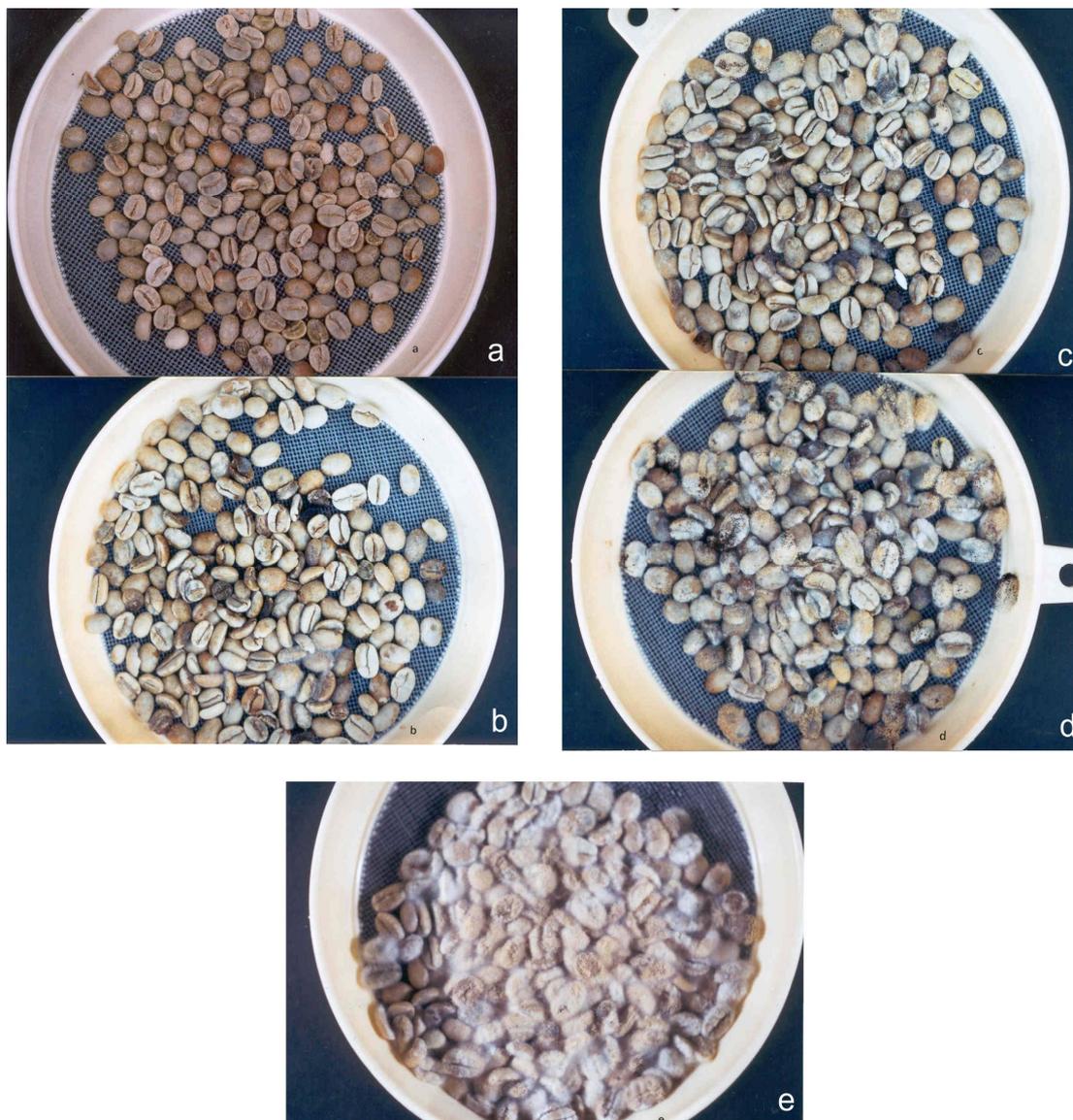


Segundo MOSS (1996), apesar do *Aspergillus ochraceus* desenvolver-se a partir de uma atividade de água de 0,76 a ocratoxina é produzida a partir de 0,85 (sendo a  $a_w$  ótima = 0,97), atividade água obtida após 5 dias de incubação (Quadro 26).

#### 4.7.1 Avaliação visual

A avaliação visual dos grãos de café verde após 10 dias de incubação pode ser observada na Figura 26.

**FIGURA 26 - ASPECTO DOS GRÃOS DE CAFÉ VERDE ANTES E APÓS 10 DIAS DE INCUBAÇÃO**



a- grãos de café verde não inoculados.

b- grãos de café verde inoculados com *C.lambica* 13b e suspensão de esporos de *Aspergillus ochraceus*.

c- grãos de café verde inoculados com *L. brevis* LPB03 e suspensão de esporos de *Aspergillus ochraceus*.

d- grãos de café verde inoculados com *C.lambica* 13b, *L.brevis* LPB03 e suspensão de esporos de *Aspergillus ochraceus*.

e- grãos de café verde inoculados com a suspensão de esporos de *Aspergillus ochraceus*.

Nos grãos de café não inoculados (a) não houve crescimento miceliano (-). Os grãos inoculados com a suspensão de esporos de *Aspergillus ochraceus* (e) revelaram crescimento denso, presença de esporos (+++).

Nos grupos teste: grãos de café inoculados com *C. lambica* 13b e suspensão de esporos de *Aspergillus ochraceus* (b) e grãos de café inoculados com *L.brevis* LPB03 e suspensão de esporos de *Aspergillus ochraceus* (c) houve crescimento miceliano tênue (+) e nos grãos de café inoculados com *C.lambica* 13b, *L.brevis* LPB03 e suspensão de esporos de *Aspergillus ochraceus* (d) houve crescimento intermediário com presença de esporos (++)

#### 4.7.2 Ocratoxina

Os resultados da produção de ocratoxina pela cepa de *Aspergillus ochraceus* inoculada nos grãos de café verde simultaneamente com as cepas de microrganismos selecionadas (*C.lambica* 13b e *L.brevis* LPB03) estão expressos no Quadro 27 e nos cromatogramas (Anexo 7 ),

#### QUADRO 27 - RESULTADOS DA QUANTIFICAÇÃO DE OCRATOXINA (ng/g) OBTIDOS APÓS 10 DIAS DE INCUBAÇÃO DOS GRÃOS DE CAFÉ VERDE ARTIFICIALMENTE CONTAMINADOS

AMOSTRA	A	B	C	Média	dp
Controle 1-Grãos de café verde não inoculados	<0,25	<0,25	<0,25	<b>&lt;0,25</b>	<b>0</b>
Controle 2-Grãos de café após 10 dias de incubação	<0,25	<0,25	<0,25	<b>&lt;0,25</b>	<b>0</b>
Controle 3-Grãos de café verdes inoculados com <i>C.lambica</i> 13b	<0,25	<0,25	<0,25	<b>&lt;0,25</b>	<b>0</b>
Controle 4-Grãos de café verdes inoculados com a <i>L.brevis</i> LPB03	<0,25	<0,25	<0,25	<b>&lt;0,25</b>	<b>0</b>
Teste 1-Grãos de café verdes inoculados com <i>C.lambica</i> 13b e <i>Aspergillus ochraceus</i>	0,69	0,87	0,72	<b>0,76</b>	<b>0,09</b>
Teste 2-Grãos de café verdes inoculados com a <i>L.brevis</i> LPB03 e <i>Aspergillus ochraceus</i>	7,50	7,71	6,57	<b>7,11</b>	<b>0,57</b>
Teste 3-Grãos de café verdes inoculados com <i>C.lambica</i> 13b, <i>L.brevis</i> LPB03 e <i>Aspergillus ochraceus</i>	51,48	53,58	50,61	<b>51,89</b>	<b>1,53</b>
Controle 5- Grãos de café verde inoculados com <i>Aspergillus ochraceus</i>	6,12	6,81	6,54	<b>6,54</b>	<b>0,37</b>

A, B, C=repetições.

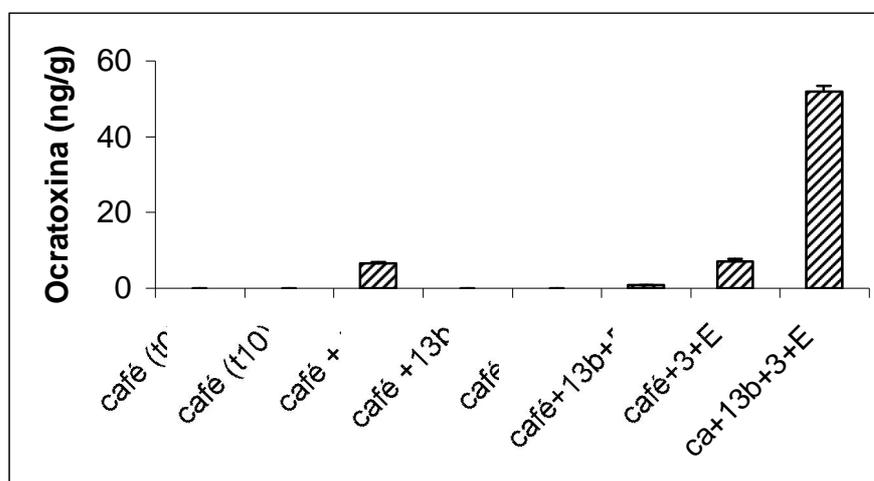
<0,25=formação de ocratoxina inferior ao limite de detecção.

dp=desvio padrão.

Comparando-se os resultados da ocratoxina formada (ng/g) obtidos no controle 5 (Grãos de café verde inoculados com *Aspergillus ochraceus* ) com os

testes (1, 2 e 3), observa-se que quando a *C.lambica* 13b foi inoculada juntamente com o *Aspergillus ochraceus* houve redução de 88,37% da ocratoxina formada. Porém quando a cepa de *L.brevis* foi inoculada juntamente com o *Aspergillus ochraceus* ocorreu um estímulo à produção de ocratoxina, de 8,71%. Já quando ambas (*C.lambica* 13b e *L.brevis* LPB03) foram inoculadas o acréscimo foi de 693% (figura 27).

**FIGURA 27 - QUANTIFICAÇÃO DE OCRATOXINA (ng/g) OBTIDA APÓS 10 DIAS DE INCUBAÇÃO DOS GRÃOS DE CAFÉ VERDE ARTIFICIALMENTE CONTAMINADOS**



café (t0)= grãos de café verde não inoculados

café (t10)=grãos de café verde após 10 dias de incubação

café + E=grãos de café verde inoculados com esporos de *Aspergillus ochraceus*

café + 13b= grãos de café verde inoculados com *C.lambica* 13b

café + 3= grãos de café verde inoculados com *L.brevis* LPB03

café + 13b + E= grãos de café verde inoculados com *C.lambica* 13b e esporos de *Aspergillus ochraceus*

café + 3 + E= grãos de café verde inoculados com *L. Brevis* LPb03 e esporos de *Aspergillus ochraceus*

café + 13b + 3 + E= grãos de café verde inoculados com *C.lambica* 13b, *L. Brevis* LPb03 e esporos de *Aspergillus ochraceus*

Quando isolada, *C.lambica* 13b, manteve a ação fungistática revelada previamente em meio líquido.

Quando isolado, *L.brevis* LPB03, não revelou ação fungistática, ao contrário, estimulou a produção de ocratoxina.

Tais fatos, confirmam o relato de PASTER et al. (1993). Esse considera que entre os microrganismos, as leveduras têm revelado habilidade em competir com a microbiota presente em produtos, inibindo ou reduzindo seu desenvolvimento, sendo essa habilidade atribuída à rápida taxa de crescimento vinculada ao esgotamento de carboidratos fermentescíveis do substrato.

Cepas de *Pichia* sp foram isoladas por WILSON e CHALUTZ (1989) e BJÖRNBERG e SCHNÜRER (1993). Os primeiros pesquisadores concluíram que quando comparada a outros microrganismos, *Pichia guilliermondi* apresentou maior potencial de competição e antagonismo, sendo empregada no controle do apodrecimento de maçãs (causado por fungos), inoculada na superfície da casca. Os segundos concluíram que a inoculação “in vitro” de *Pichia anomala* foi capaz de inibir o desenvolvimento de *Aspergillus candidus*.

Esse experimento, de caráter inédito comprovou que a utilização da cepa de *Candida lambica* 13b (*Pichia fermentans*) revelou atividade fungistática (antagônica) contra *Aspergillus ochraceus*.

#### 4.8 AVALIAÇÃO DA VARIAÇÃO DA AÇÃO FUNGISTÁTICA DA CEPA DE *Candida lambica* MEDIANTE QUANTIFICAÇÃO DA OCRATOXINA PRODUZIDA PELO *Aspergillus ochraceus* EM GRÃOS DE CAFÉ VERDES

Os resultados da variação da produção de ocratoxina (ng/g) formada nos grãos de café verdes, inoculados com concentrações de *C.lambica* 13b, que variaram de  $10^2$  UFC/g a  $10^6$  UFC/g estão expressos no Quadro 28, na Figura 28 e nos cromatogramas (Anexo 8)

#### QUADRO 28 - RESULTADOS DA QUANTIFICAÇÃO DE OCRATOXINA (ng/g) OBTIDOS APÓS 10 DIAS DE INCUBAÇÃO DOS GRÃOS DE CAFÉ VERDE ARTIFICIALMENTE CONTAMINADOS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE INÓCULO DA CEPA DE *Candida lambica* 13b

AMOSTRA	A	B	C	Média	DP
Controle 1-Grãos de café verde não inoculados	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	0
Controle 2-Grãos de café após 10 dias de incubação	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	0
Controle 4-Grãos de café verdes inoculados <i>Aspergillus ochraceus</i>	6,12	6,81	6,69	6,54	0,3009
Teste 1-Grãos de café verdes inoculados com $10^2$ UFC/g de <i>C.lambica</i> 13b e <i>Aspergillus ochraceus</i>	61,41	61,08	65,88	62,79	2,18919
Teste 2-Grãos de café verdes inoculados com $10^3$ UFC/g de <i>C.lambica</i> 13b e <i>Aspergillus ochraceus</i>	3,36	3,33	3,15	3,28	0,09276
Teste 3-Grãos de café verdes inoculados com $10^4$ UFC/g de <i>C.lambica</i> 13b e <i>Aspergillus ochraceus</i>	1,92	1,71	1,89	1,84	0,09276
Teste 4-Grãos de café verdes inoculados com $10^5$ UFC/g de <i>C.lambica</i> 13b e <i>Aspergillus ochraceus</i>	1,50	1,44	1,38	1,44	0,04899
Teste 5-Grãos de café verdes inoculados com $10^6$ UFC/g de <i>C.lambica</i> 13b e <i>Aspergillus ochraceus</i>	0,69	0,87	0,72	0,76	0,07874

A, B, C=repetições. <0,25=formação de ocratoxina inferior ao limite de detecção. dp=desvio padrão.

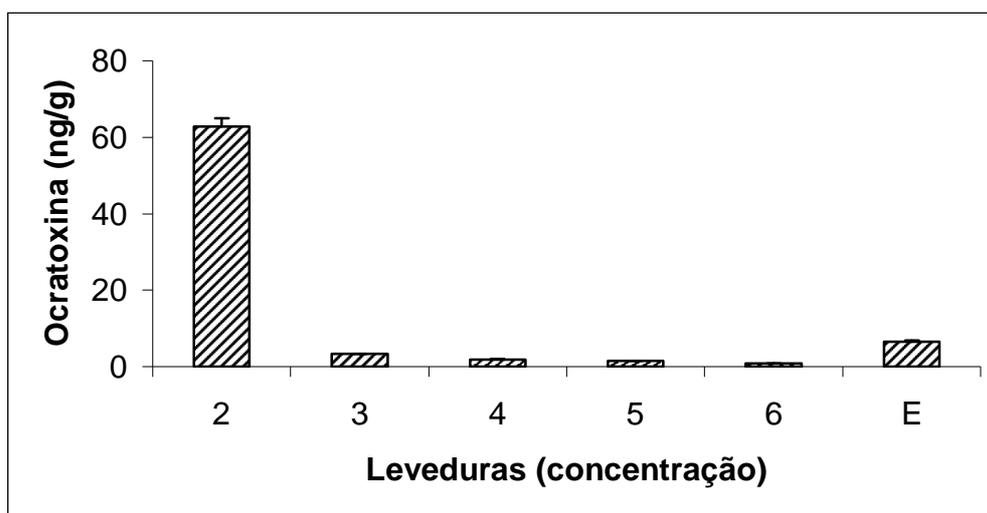
Comparando-se os resultados da ocratoxina formada (ng/g) obtidos no controle 4 (Grãos de café verdes inoculados *Aspergillus ochraceus*) com os testes (1, 2, 3, 4 e 5), observa-se que quando inoculado  $10^2$  UFC/g ocorre um estímulo à formação de ocratoxina de 860% ( de 6,54 ng/g para 62,79 ng/g). Esse dado revela uma concentração que pode ser considerada limítrofe entre a ação antagônica e a potencialização à produção da micotoxina pelo fungo, merecendo estudos complementares.

Quando inoculado  $10^3$  UFC/g,  $10^4$  UFC/g e  $10^5$  UFC/g há redução de ocratoxina de 49,84% (de 6,54 ng/g para 3,28 ng/g), 71,86% (de 6,54 ng/g para 1,84 ng/g) e 77,98% (de 6,54 ng/g para 1,44 ng/g), respectivamente.

O melhor percentual de redução (88,37%), de 6,54 ng/g para 0,76 ng/g, foi obtido quando inoculado  $10^6$  UFC/g.

Na Figura 28 observa-se graficamente a variação da formação de ocratoxina após inoculação de diferentes concentrações do inóculo da cepa de *C.lambica* 13b comparada a cepa de *Aspergillus ochraceus*

**FIGURA 28 - VARIAÇÃO DA QUANTIFICAÇÃO DE OCRATOXINA (ng/g) OBTIDA APÓS 10 DIAS DE INCUBAÇÃO DOS GRÃOS DE CAFÉ VERDE ARTIFICIALMENTE CONTAMINADOS**



2= Grãos de café verdes inoculados com  $10^2$ UFC/g da cepa de *C.lambica* 13b e *Aspergillus ochraceus*  
 3= Grãos de café verdes inoculados com  $10^3$ UFC/g da cepa de *C.lambica* 13b e *Aspergillus ochraceus*  
 4= Grãos de café verdes inoculados com  $10^4$ UFC/g da cepa de *C.lambica* 13b e *Aspergillus ochraceus*  
 5= Grãos de café verdes inoculados com  $10^5$ UFC/g da cepa de *C.lambica* 13b e *Aspergillus ochraceus*  
 6= Grãos de café verdes inoculados com  $10^6$ UFC/g da cepa de *C.lambica* 13b e *Aspergillus ochraceus*  
 E= Grãos de café verdes inoculados *Aspergillus ochraceus*

#### 4.9 CARACTERIZAÇÃO DOS METABÓLITOS FORMADOS PELA CEPA *Candida lambica* 13b

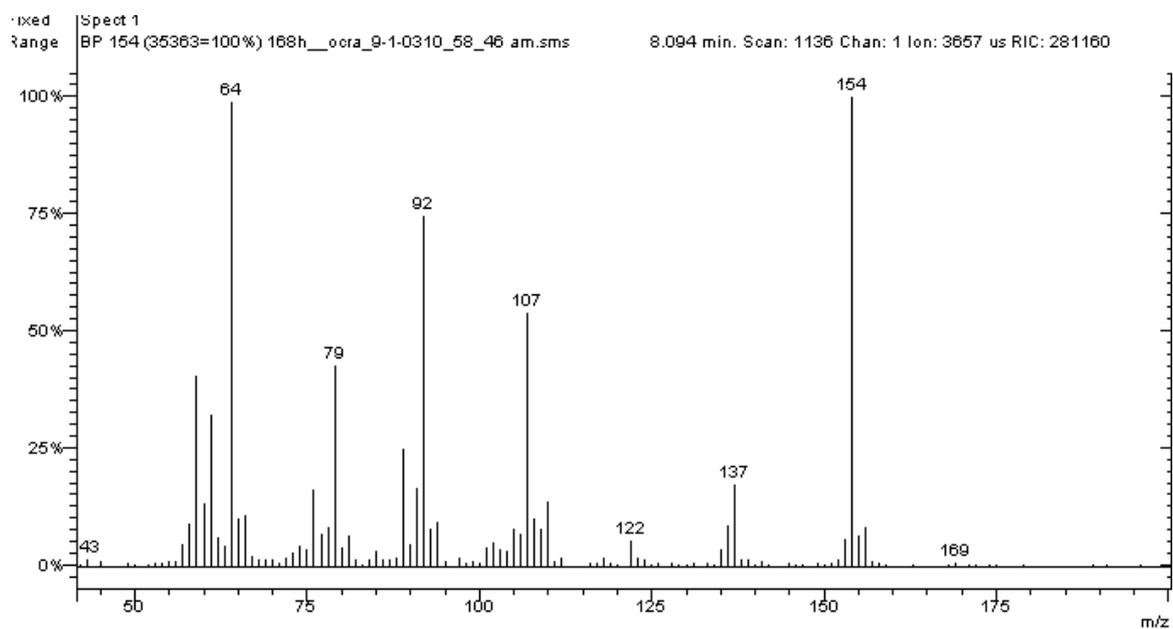
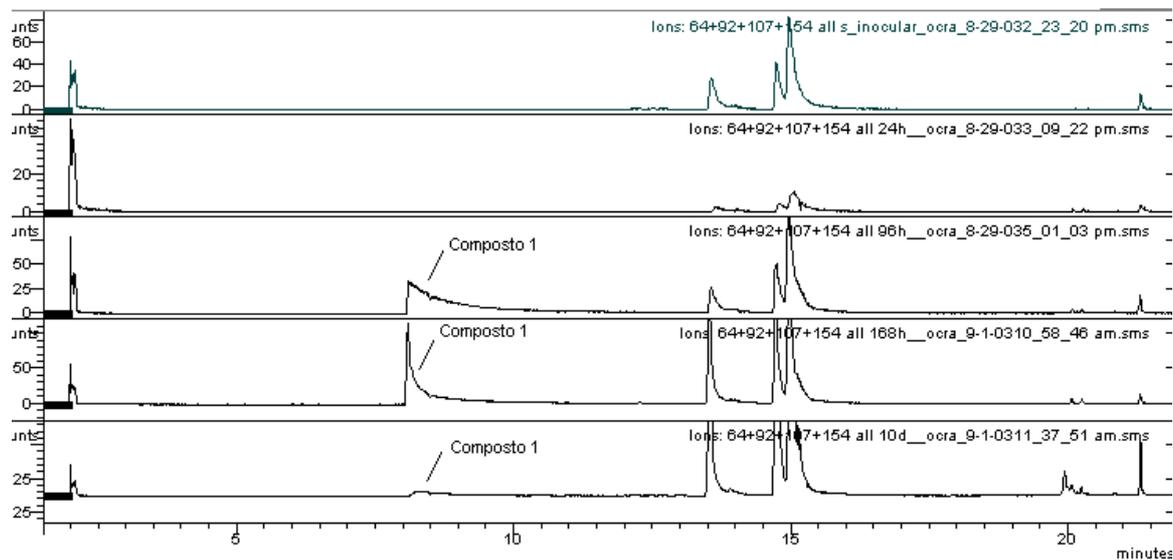
A comparação entre os cromatogramas das várias frações do caldo YM (sem levedura, após 24h, 96h, 168h e 240h) de inoculação revelou o surgimento de 2 novos compostos: um alcoólico e outro fenólico em relação à fração inicial. O cromatograma e o espectrograma do composto alcoólico podem ser observados na Figura 29. A comparação entre o espectrograma obtido e a base de dados consultada consta na figura 30. A identificação do composto foi realizada através da comparação dos espectros com os armazenados nas bibliotecas NIST e Saturn. O espectro de massas em abundância relativa percentual e a identidade sugerida são apresentados no Quadro 29. O composto alcóolico provável foi caracterizado como 2-2 ditiobis-etanol (CAS Nº 1892-29-1) (Figura 30) ou álcool p-(tio metil) benzil (CAS Nº 3446-90-0) (Figura 31).

#### QUADRO 29 - ESPECTRO DE MASSA E IDENTIFICAÇÃO SUGERIDA DO COMPOSTO ALCOÓLICO OBTIDO

Composto	Identificação sugerida	
	NIST	Saturn
Composto 1	2-2 ditiobis-etanol CAS Nº 1892-29-1	2-2 ditiobis-etanol CAS Nº 1892-29-1
Composto 1'	álcool p-(tio metil) benzil CAS Nº 3446-90-0	álcool p-(tio metil) benzil CAS Nº 3446-90-0

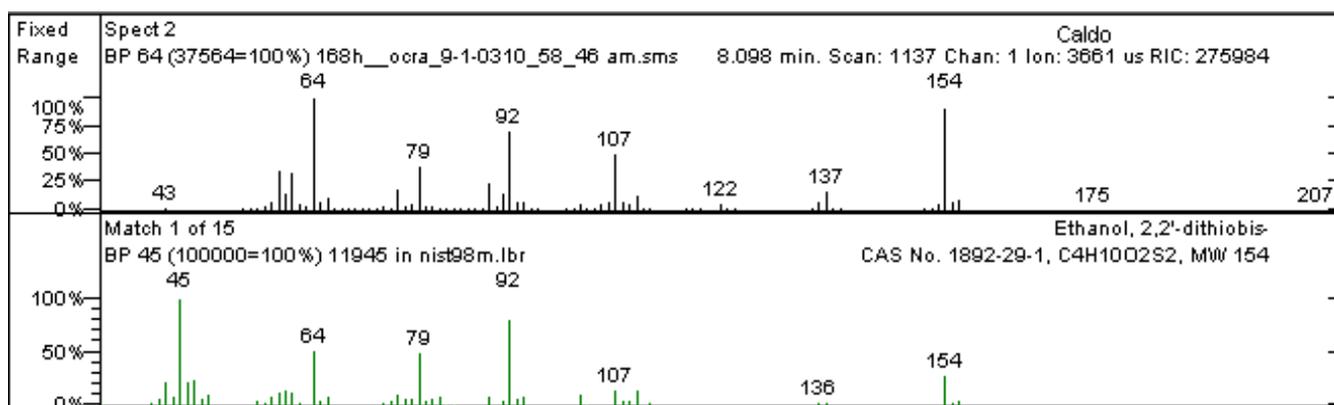
NIST e SATURN = base de dados consultada

## FIGURA 29 - CROMATOGRAMA E ESPECTROGRAMA DO COMPOSTO ALCOÓLICO OBTIDO

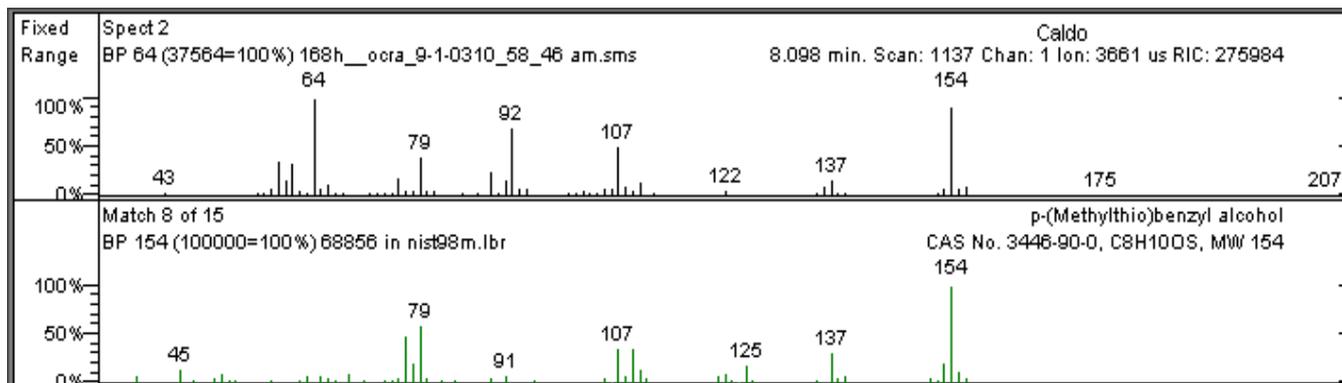


**FIGURA 30- COMPARAÇÃO DO ESPECTROGRAMA DO COMPOSTO  
ALCOÓLICO OBTIDO COM O SUGERIDO**

2-2 ditiobis-etanol

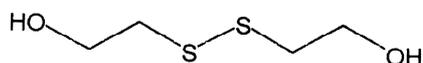


álcool p-(tio metil) benzil

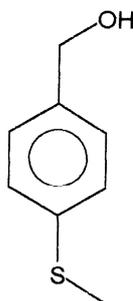


### FIGURA 31 – FÓRMULA ESTRUTURAL DOS COMPOSTOS ALCOÓLICOS FORMADOS

#### 2-2 ditiobis-etanol



#### álcool p-(tio metil) benzil



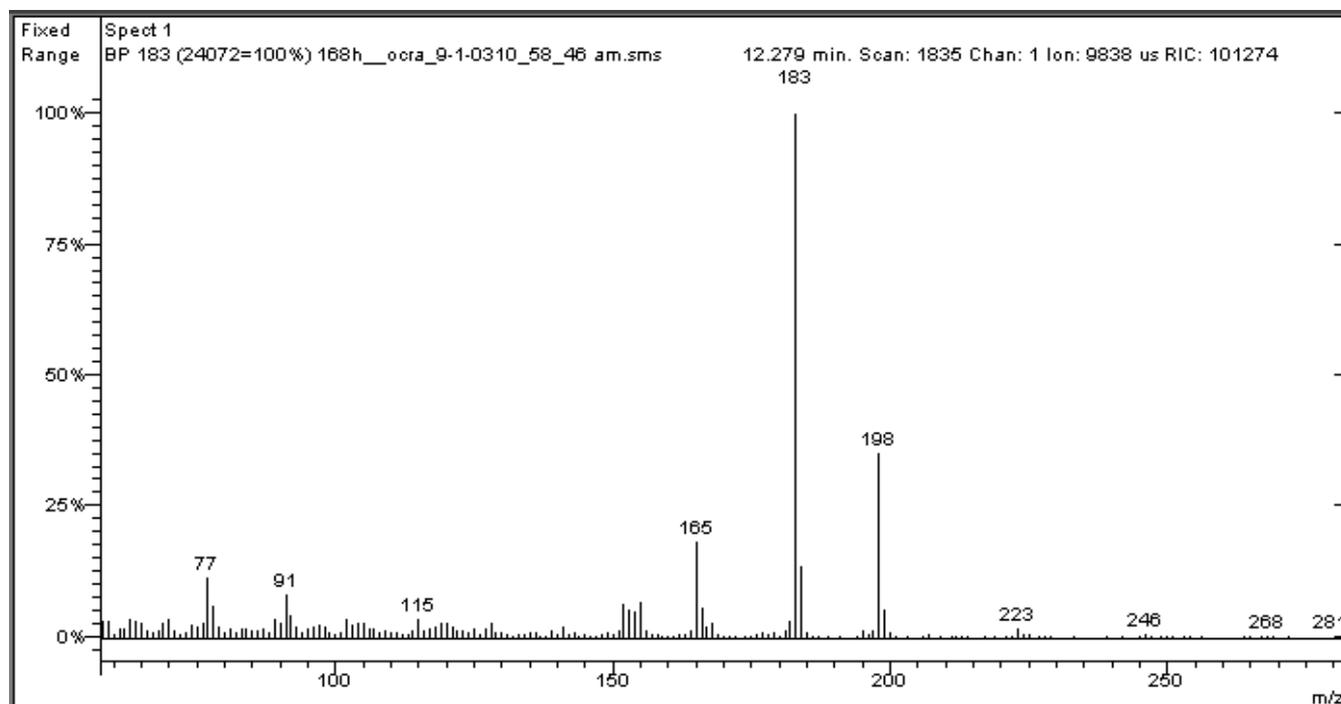
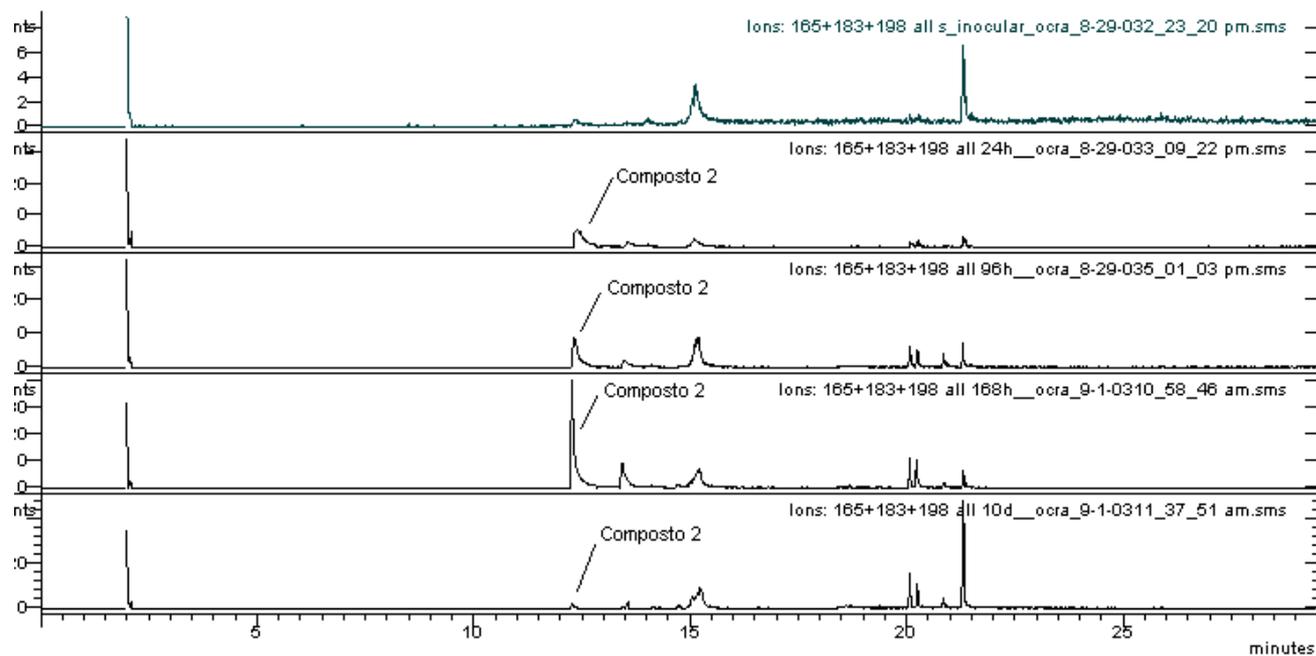
O cromatograma e o espectrograma do composto fenólico podem ser observados na Figura 32. A comparação entre o espectrograma obtido e a base de dados consultada consta na figura 33. A identificação do composto foi realizada através da comparação dos espectros com os armazenados nas bibliotecas NIST e Saturn. O espectro de massas em abundância relativa percentual e a identidade sugerida são apresentados no Quadro 30. O composto fenólico provável foi caracterizado como 2-(1-etilfenil)-fenol (CAS N° 4237-44-9) ou fenoxietil-benzeno (CAS N° 54852-74-3) (Figura 34).

#### QUADRO 30 - ESPECTRO DE MASSA E IDENTIFICAÇÃO SUGERIDA DO COMPOSTO FENÓLICO OBTIDO

Composto	Identificação sugerida	
	NIST	Saturn
Composto 2	2-(1-etilfenil)-fenol CAS N° 4237-44-9	2-(1-etilfenil)-fenol CAS N° 4237-44-9
Composto 2'	fenoxietil-benzeno CAS N° 54852-74-3	fenoxietil-benzeno CAS N° 54852-74-3

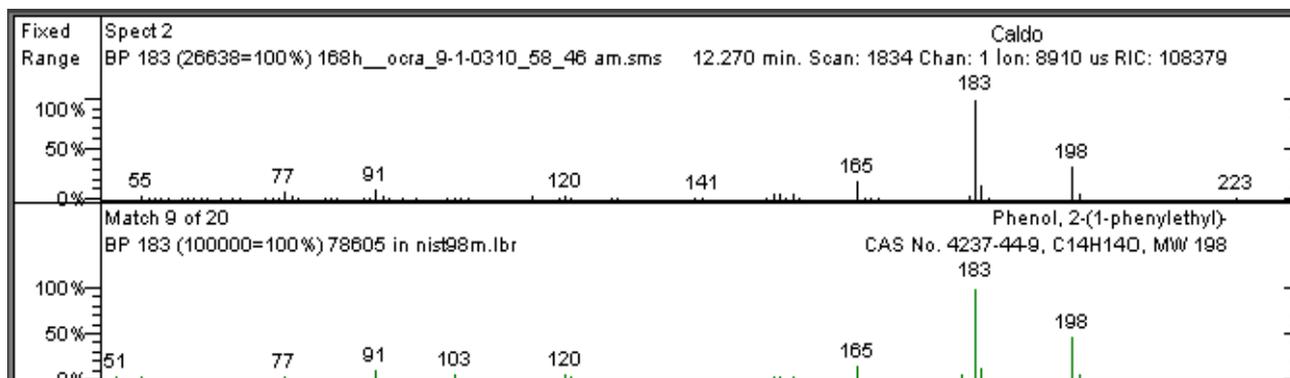
NIST e SATURN = base de dados consultada

## FIGURA 32 - CROMATOGRAMA E ESPECTROGRAMA DO COMPOSTO FENÓLICO OBTIDO

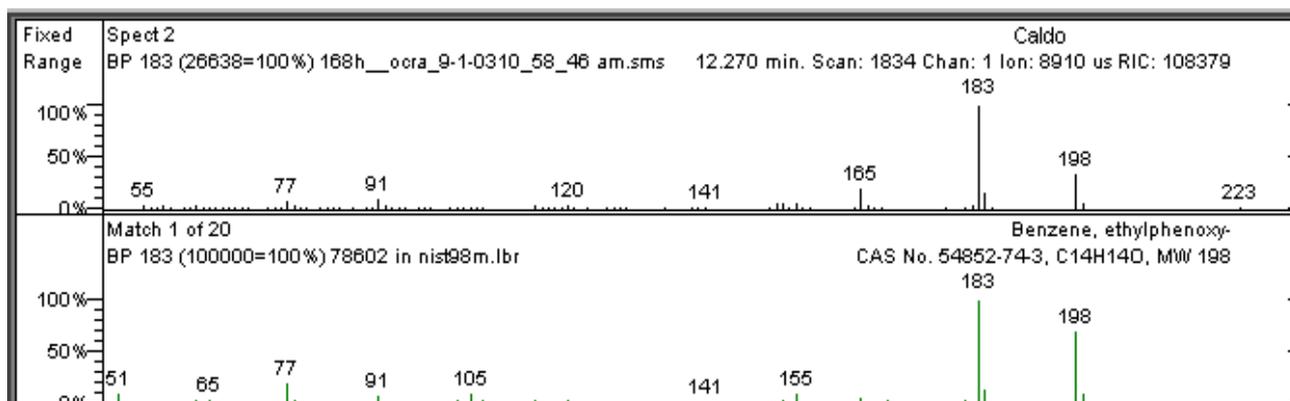


### FIGURA 33- COMPARAÇÃO DO ESPECTROGRAMA DO COMPOSTO FENÓLICO OBTIDO COM O SUGERIDO

#### 2-(1-etilfenil)-fenol

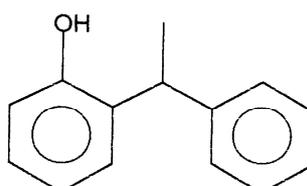


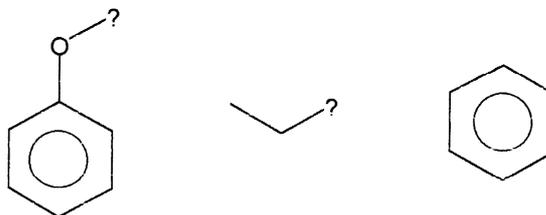
#### fenoxietil-benzo



### FIGURA 34 – FÓRMULA ESTRUTURAL DOS COMPOSTOS FENÓLICOS FORMADOS

#### 2-(1-etilfenil)-fenol



**fenoxietil-benzeno**

Ambas as bibliotecas retornaram o mesmo resultado para a identidade dos compostos.

A cepa de *Candida lambica* LPB03 revelou ação fungistática contra *Aspergillus ochraceus*. Após caracterização dos metabólitos formados, os prováveis compostos pela ação fungistática foram: composto alcoólico 2-2 ditiobis-etanol (CAS Nº 1892-29-1) ou álcool p-(tio metil) benzil (CAS Nº 3446-90-0) e composto fenólico 2-(1-etilfenil)-fenol (CAS 4237-44-9) ou fenoxietil-benzeno (CAS 54852-74-3).

## 5 CONCLUSÃO

O presente trabalho pode ser avaliado sob dois aspectos complementares: o primeiro refere-se a identificação da biodiversidade de cerejas maduras de café e o segundo a seleção das cepas que revelaram ação antagônica ao desenvolvimento do fungo filamentosso *Aspergillus ochraceus* em grãos de café verde.

Foram isoladas trinta e cinco cepas de leveduras das cerejas de café provenientes de Minas Gerais, Espírito Santo, Bahia, São Paulo e Paraná, sendo identificadas dezoito espécies: *Candida pelliculosa*, *C.lambica*, *C.famata*, *C.guilliermondii*, *C.glabrata*, *C.lipolytica*, *C.krusei*, *C.zeylanoides*, *C.inconspicua*, *C.magnoliae*, *C.albicans*, *C.maris*, *C.lusitaniae*, *C.kefyr*, *C.colliculosa*, *Gerotrichum penicillatum*, *Sporobolomyces salmonicolor* e *Saccharomyces cerevisiae*.

Na avaliação da ação fungistática em meio sólido, as três cepas de leveduras que revelaram maior inibição do crescimento radial do *Aspergillus ochraceus* foram *Sporobolomyces salmonicolor* (cepa 7e), cepa não identificada (11b) e *Candida lambica* (cepa 13b).

Na avaliação da ação fungistática em meio sólido, *Lactobacillus brevis* (cepa LPB03) revelou maior inibição do crescimento radial do *Aspergillus ochraceus*, quando comparada as demais cepas de bactérias lácticas testadas.

Na avaliação da ação fungistática das cepas de leveduras sob diferentes pH, as cepas 7e (*Sporobolomyces salmonicolor*) e 11b (não identificada) não revelaram formação de halo de inibição. A cepa de *Candida lambica* 13b não revelou diferença estatisticamente significativa entre o halo de inibição formado frente aos quatro pH testados (pH 4,5, pH 5, pH 6 e pH 7), comprovando a ação fungistática da cultura.

Na avaliação da ação fungistática da cepa de *Lactobacillus brevis* LPB03, sob diferentes pH, houve diferença estatisticamente significativa entre os pares (pH 5,5 e pH 5 e pH 6 e pH 7) sendo que o pH 5,5 apresentou maior halo de inibição.

Na avaliação da ação fungistática por fermentação submersa em Caldo YM (Yeast Medium), a cepa de *C. lambica* 13b revelou inibição do crescimento miceliano do *Aspergillus ochraceus*.

Na avaliação da ação fungistática por fermentação submersa em Caldo Enriquecido, a cepa de *L.brevis* LPB03 não revelou inibição do crescimento miceliano do *Aspergillus ochraceus*.

Na avaliação da ação fungistática por fermentação submersa em Caldo Extrato de Café Verde, a cepa de *C.lambica* 13b revelou inibição do crescimento miceliano de *Aspergillus ochraceus*, reduzindo a biomassa do mesmo em 95,87% e a cepa de *L. brevis* LPB03 em 81,26%. No entanto quando a cepa de *C. lambica* 13b foi inoculada juntamente com a cepa de *L.brevis* LPB03 o percentual de redução da biomassa do fungo filamentososo foi de apenas 41,90%. Não houve formação de ocratoxina A em níveis detectáveis.

Na avaliação da ação fungistática em grãos de café verde, artificialmente contaminados com *Aspergillus ochraceus*, a cepa de *C. lambica* 13b reduziu a formação de ocratoxina A em 88,37%, a cepa de *L.brevis* LPB03 estimulou a produção de ocratoxina A em 8,71%. Quando a cepa de *C.lambica* 13b foi inoculada juntamente com a cepa de *L.brevis* houve um acréscimo à produção de ocratoxina de 693%.

Na avaliação da variação da ação fungistática por fermentação no estado sólido, em grãos de café verde, artificialmente contaminados com *Aspergillus ochraceus*, o melhor percentual de redução (88,37%) de ocratoxina A foi obtido quando inoculado  $10^6$  UFC/g da cepa de *C. lambica* 13b.

A caracterização dos metabólitos formados pela cepa de *Candida lambica* 13b revelou a formação de dois compostos (um alcoólico e um fenólico) prováveis responsáveis pelo caráter fungistático.

A identificação sugerida para o composto alcoólico é 2,2 ditiobis-etanol ou álcool p-(tiometil) benzil e para o composto fenólico 2-(1-etilfenil)-fenol ou fenoxietil-benzeno.

## 6 SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

- Identificar as cepas de leveduras isoladas por métodos moleculares;
- Avaliar as características sensoriais dos grãos de café
- Extrair o composto fenólico produzido aplicando-o em grãos de café verde;
- Avaliar a ação fungistática das cepas isoladas contra outros fungos toxigênicos.

**REFERÊNCIAS**

- 1 ABARCA, M.L.; ACCENSI, F.; BRAGULAT, M.R. Current importance of ochratoxin A: producing *Aspergillus spp.* **J. Food Protection**, v. 64, n. 6, p. 903-906, 2001.
- 2 ABD-ALLA, E.A.M.; SAHAB, A.F.; ALY, S.E. Formation of micotoxins by toxigenic fungi isolated from green coffee. **Egyptian Journal of Microbiology**, v. 32, n. 4, p. 481-491, 1997.
- 3 AGELL, O. **La seguridad alimentaria del chocolate**. Disponível em: <[www.stfrancis.edu/ns/diab](http://www.stfrancis.edu/ns/diab)>. Acesso em 16 fev. 2004.
- 4 ALVES, E.; CASTRO, H.A. de. Fungos associados ao café (*Coffea arábica* L.) nas fases de pré e pós-colheita em lavouras da região de Lavras. **Summa Phytopathologica**, v. 24, n. 1, p. 4-7, 1998.
- 5 AOAC. Association of Official Agricultural Chemists. **Official methods of analysis of AOAC international**. 16<sup>th</sup> ed. Gaithersburg, MD, 1997. (Method 975.38).
- 6 APHA. American Oublic Health Association. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4<sup>th</sup> ed. Washington, 2001.
- 7 AVALLONE, S.; GUYOT, B.; BRILLOUET, J.-M., OLGUIN, E., GUIRAUD, J.P. Microbiological and biochemical study of coffee fermentation. **Current Microbiology**, v. 42, p. 252-256, 2001.
- 8 BARTELS, Andreas. **Guide de plantes tropicales: plantes ornamentales, plantes utiles, fruits exotiques**. 3.ed. Paris: Ulmer, 1993. 384 p.
- 9 BIOMÉRIEUX. **Analytical profile index**. 2<sup>nd</sup> ed. France: Marcy-L'Etoile, 1993. (api 20Caux) (Ref.20290).
- 10 BITANCOURT, A. A. As fermentações e podridões da cereja de café. **Boletim da Superintendência dos Serviços do Café**, v. 32, n. 359, p. 7-14, 1957.
- 11 BJÖRNBERG, A.; SCHNÜRER, J. Inhibition of the growth of grain-storage molds in vitro by the yeast *Pichia anomala*. **Canadian Journal of Microbiology**, v.39, n.6, p.623-628, 1993.
- 12 BLACK, J.G. **Microbiologia: fundamentos e perspectivas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 829p.
- 13 BORZANI, Walter, SCHMIDELL, W., LIMA, U. , AQUARONE, E. (Coords.). **Biotechnologia industrial: fundamentos**. São Paulo: E. Blücher, 2001. v.1.
- 14 BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 8 de 11 jun. 2003. Regulamento técnico de identidade e

qualidade para classificação do café beneficiado grão cru. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, n. 113, 13 jun. 2003. p. 4.

- 15 BRESSANI, R. Subproductos del fruto de café. In: BRAHAM, J.E.; BRESSANI, R. **Pulpa de café: composición, tecnología y utilización**. Guatemala: INCAP, 1978. p. 9-17.
- 16 BU'LOCK, J.; KRISTIANSEN, B. **Biotecnología básica**. Zaragoza: Acribia, 1991. 557 p.
- 17 BURDASPAL, P.A.; LEGARDA, T.M. Ochratoxin A in roasted and soluble coffes marketed in Spain. **Alimentaria**, n.296, p. 31-35, 1998.
- 18 CAFÉ é objeto de pesquisa na área de alimentação. Disponível em: <<http://www.unisantos.br/pesquisas/ipecc/pesquisas/cafe.htm>>. Acesso em 8 jul. 2002.
- 19 CANTAFORA, A.; GROSSI, M.; MIRAGLIA, M.; BENELLI, L. Determination of ochratoxin A in coffee beans using reverse-phase high performance liquid chromatography. **Riv. Soc. Ital. Alimen.**, v. 12, p. 103-108, 1983.
- 20 CARVALHO, João C.M. de. **Pró-café: coordenação do programa integrado de apoio à cafeicultura**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/dfpv/cafe.htm>>. Acesso em 30 jan. 2002.
- 21 CECCHI, H.M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. Campinas: UNICAMP, 1999. 212 p.
- 22 CLARKE, R.J.; MACRAE, R. (Ed.). **Coffee: chemistry**. London: Elsevier, 1985. v.1.
- 23 CLARKE, R.J.; MACRAE, R. (Ed.). **Coffee: technology**. London: Elsevier, 1987. v.2.
- 24 COMITÉ FRANÇAIS DU CAFÉ. **Café...cafés: a la découverte du café**. Paris, 1997.
- 25 DAIVASIKAMANI, S.; KANNAN, N. Studies on post-harvest mycoflora of coffee cherry of robusta. **J. Coffee Res.**, v. 16, n. 3-4, p. 102-106, 1986.
- 26 DALLA SANTA, H. S. **Produção de esporos de *Beauveria bassiana* (BALS.) Vuillemin em resíduos agroindustriais para controle biológico de *Thelesia camina* (SHAUS, 1920) e *Hylesia* sp., pragas da erva-mate**. Curitiba, 2000. 96 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Química) - Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná.
- 27 DELLAGLIO, F. Caractéristiques générales des bactéries lactiques. In: ROISSART, H.; LUQUET, F.M. **Bactéries lactiques**. Uriage: Lorica, 1994. v.1, p. 25-70.

- 28 DEMARCHI, M. **Café: aspectos econômicos**. [Curitiba]: SEAB, Departamento De Economia Rural, 2003.
- 29 FERNANDES, S.M. **Caracterização da composição química de arábica e conillon**. Disponível em: <<http://www.coffeebreak.com.br/ocafezal.asp?SE=8&ID=181>>. Acesso em 31 jan. 2003.
- 30 FERREIRA, W.F.C.; SOUSA, J.C.F.de. (Coord.). **Microbiologia**. Lisboa: Lidel, 1998. v.1.
- 31 FORSYTHE, S.J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002. 424 p.
- 32 FRANK, H.A.; DELA CRUZ, A.S. Role of incidental microflora in natural decomposition of mucilage layer in kona coffee cherries. **J. Food Science**, v. 29, p. 850-853, 1964.
- 33 FREITAS, R.J.S.; DAHLER, A.L.K.; SANTOS, M.A.B.; TIBONI, E.; CECATO, E. **Técnicas analíticas de alimentos**. Curitiba: TECPAR, 1979. 114 p. (Apostila).
- 34 FURLANI, R.P.Z.; OLIVEIRA, P.L.; SOARES, L.M.V. Incidência de ocratoxina A em café verde proveniente de várias regiões produtoras brasileiras. In: ENCONTRO NACIONAL DE MICOTOXINAS, 9., 1998; SIMPÓSIO EM ARMAZENAGEM QUALITATIVA DE GRÃOS DO MERCOSUL, 1., 1998, Florianópolis. Florianópolis: UFSC/Dep. Ciência e Tecnologia de Alimentos/Centro de Ciências Agrárias; Sociedade Latino-Americana de Micotoxicologia, 1998. p. 117.
- 35 FURLANI, R.P.Z.; SOARES, L.M.V.; OLIVEIRA, P. L. Avaliação de métodos para determinação de ocratoxina em cafés verdes e torrados. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 58, n. 2, p. 87-98, 1999.
- 36 HAMMES, W.P.; VOGEL, R.F. The genus *Lactobacillus*. In: WOOD, B.J.B.; HLZAPFEL, W.H. **The lactic acid bacteria**. London: Blackie, 1995. v. 2, p. 19-54.
- 37 HERITAGE, J.; EVANS, E G V.; KILLINGTON, R A. **Introductory microbiology**. Cambridge: University of Cambridge, 1996.
- 38 IAL. Instituto Adolfo Lutz. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 3.ed. São Paulo, 1985. v. 1.
- 39 ICMSF. International Commission on Microbiological Specifications for foods. **Microrganismos de los alimentos**. 2.ed. Zaragoza: Acribia, 2000. v. 1.
- 40 INCQS. Instituto Nacional de Controle de Qualidade e Saúde. **Manual da qualidade: método para avaliação das atividades bacteriostática e fungistática**

de saneantes e substâncias preservativas. Rio de Janeiro, 2001. 9 p. (Método 65.3210.006).

- 41 JAY, J.M. **Microbiologia moderna de los alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1994.
- 42 KUNZ, Benno. **Cultivo de microorganismos para la producción de alimentos**: obtención, aplicaciones e investigación. Zaragoza: Acribia, 1986.
- 43 LACAZ, C. da S. **Guia de identificação**: fungos actinomicetos algas de interesse médico. São Paulo: Sarvier, 1998. 45 p.
- 44 LAZZARI, F.A. **Umidade, fungos e micotoxinas na qualidade de sementes, grãos e rações**. Curitiba: O Autor, 1997.
- 45 LEITÃO, M.F. de F.; HAGLER, L.C.S.M.; HAGLER, A.N.; MENEZES, T.J.B.de. **Tratado de microbiologia**. [Rio de Janeiro]: Manole, 1988. v.1
- 46 LIMA, Urgel de Almeida, AQUARONE, E., BORZANI, W., SCHMIDELL, W. (Coord.). **Biotecnologia industrial**: processos fermentativos e enzimáticos. São Paulo: E. Blücher, 2001, v.3.
- 47 LONSANE, B.K. Engineering aspects of solid state fermentation. **Enzyme and Microbiology Technology**, New York, v. 7, p. 258-265, 1985.
- 48 LOPEZ-GARAY, C. Microflora of the stored coffee and its influence on quality. In: INTERNATIONAL SCIENTIFIC COLLOQUIUM ON COFFEE, 12., 1988. Paris, France: Association Scientifique Internationale du Café, 1988.
- 49 LUNA-FILHO, Eury P. **Cafés do Brasil e indicações geográficas**. Disponível em: <<http://www.coffeebreak.com.br/ocafezal.asp?SE=8&ID=99>>. Acesso em 31 jan. 2003.
- 50 MACEDO, R. **Desenvolvimento de bebida Láctea fermentada a base de extrato hidrossolúvel de soja e soro de leite de búfala por cultura mista de *Lactobacillus casei shirota* e *Bifidobacterium adolescentis***. Curitiba, 1997. 141 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Química, Área de Concentração em Tecnologia de Alimentos) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.
- 51 MACHADO, C.M.M. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de hormônio vegetal (ácido giberélico – GA<sub>3</sub>) por fermentação no estado sólido em resíduos agroindustriais brasileiros**: relação da produção de GA<sub>3</sub> em biorreator piloto e bioensaios em mudas de tomateiro (*Lycopersicon esculentum*). Curitiba, 2002. 95 f. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos), Área de Concentração Agroindústria, Departamento de Tecnologia Química, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

- 52 MICCO, C., GROSSI, M., MIRAGLIA, M., BRERA, C. A study of the contamination by ochratoxin A of green and roasted coffee beans. **Food Additives and Contaminants**, v.6, n.3, p.333-339, 1989.
- 53 MINAMI, P.S. **Micologia: métodos laboratoriais de diagnósticos das micoses**. Barueri, SP: Manole, 2003.
- 54 MILISVEC, P.B.; BRUCE, V.R.; GIBSON, R. Incidence of toxigenic and other molds in green coffee beans. **J. Food Protection**, v.46, n.11, p. 969-973, Nov. 1983.
- 55 MOSS, M. Mode of formation of ochratoxin A. **Food Additives and Contaminants**, v.13, Suplem., p.5-9, 1996.
- 56 NAKAJIMA, M.; TERADA, H.; HISADA, K.; TSUBOUCHI, H.; YAMAMOTO, K.; UDA, T.; ITOH, Y.; UENO, Y. Determination of ochratoxin A in coffee beans and coffee products by monoclonal antibody affinity chromatography. **Food Agric. Immunol.**, v.2, p. 189-195, 1990.
- 57 ONO, M.; SAKUDA, S.; SUZUKI, A.; ISOGAI, A. Aflastatin A, a novel inhibitor of aflatoxin production by aflatoxigenic fungi. **The Journal of Antibiotics**, v. 50, n. 2, p. 111-118, Feb. 1997.
- 58 PAGNONCELLI, M.G.B. **Estudo da biodiversidade de bactérias lácticas isoladas de frutos do café no Estado do Paraná: isolamento, identificação e avaliação de seu potencial nos processos de ensilagem da casca de café**. Curitiba, 2002. 102 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Química) - Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná.
- 59 PANDEY, A., SOCCOL, C.R., RODRIGUEZ-LEON, J., NIGAM, P. **Solid-state fermentation in biotechnology: fundamentals and applications**. New Delhi: Asistech, 2001.
- 60 PASTER, N.; DROBY, S.; CHALUTZ, E.; MENASHEROV, M.; NITZAN, R.; WILSON, C.L.; Evaluation of the potential of the yeast *Pichia guilliermondii* as a biocontrol agent against *Aspergillus flavus* and fungi of stored beans. **Mycological Research**, v. 97, p. 1201-1206, 1993.
- 61 PATEL, S.; HAZEL, C.M.; WINTERTON, A.G.M., GLEADLE, A. Survey of ochratoxin A in UK retail coffees. **Food Additives and Contaminants**, v. 14, n. 3, p. 217-222, 1997.
- 62 PEE, W. V.; CASTELEIN, J. The yeast flora of fermenting robusta coffee. **East African Agricultural and Forestry Journal**, v. 36, p. 308-310, Jan. 1971.
- 63 PERRAUD, I.G. **Cultures mixtes en milieu solide de bactéries lactiques et de champignons filamenteux por la conservación et la décaféination de la pulpe de café**. Montpellier, 1996. 210 f. Tese (Doutorado) – Universidade de Montpellier II.

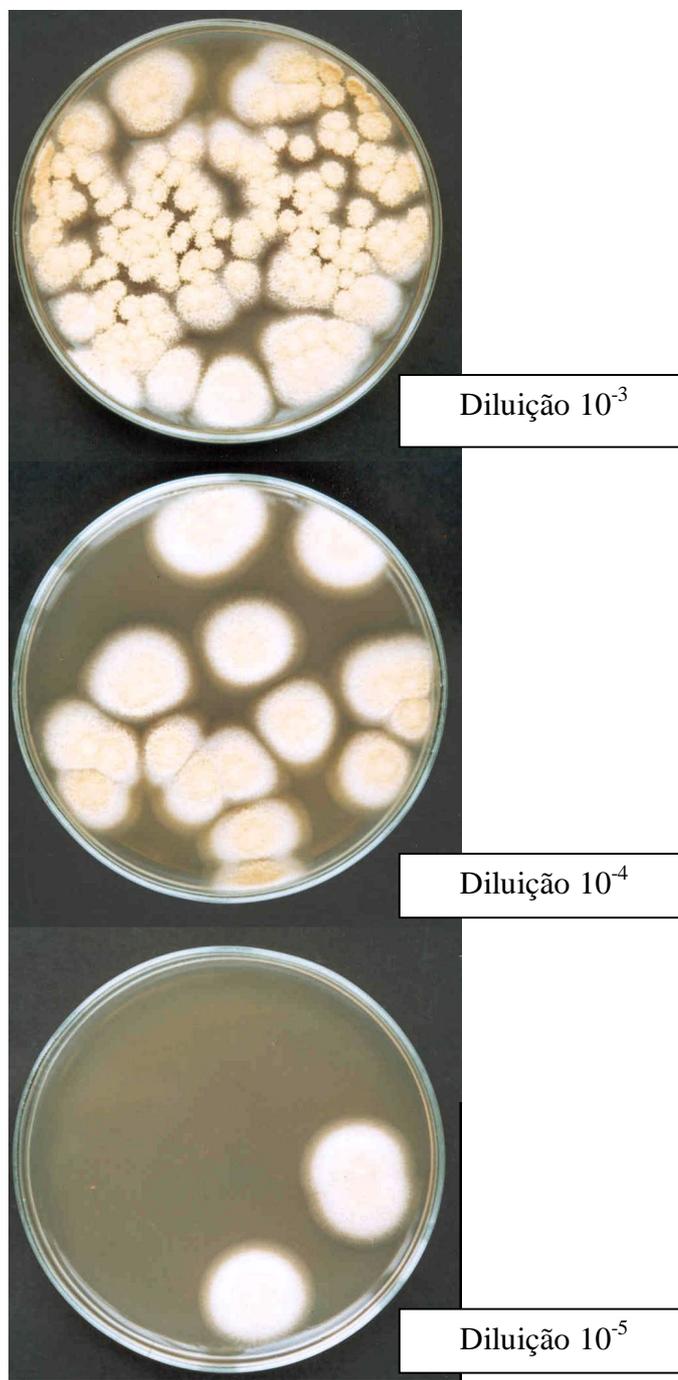
- 64 PETERSSON, S.; SCHNÜRER, J. Biocontrol of mold growth in high-moisture wheat stored under airtight conditions by *Pichia anomala*, *Pichia guilliermondii* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, n.3, 1995.
- 65 PETTIGREW, Jane. **Café**. São Paulo: Nobel, 1999.
- 66 PITET, A.; TORNARE, D.; HUGGET, A.; VIANI, R. Liquid chromatographic determination of ochratoxin A in pure and adulterated soluble coffee using analyse immunoaffinity column cleanup procedure. **J. Agric. Food. Chem.**, v. 44, p. 3564-3569, 1996.
- 67 PITT, J.I.; HOCKING, A.D. **Fungi and food spoilage**. 2<sup>nd</sup> ed. London: Academic Press, 1997.
- 68 POHLAND, A.E.; NESHEIM, S.; FRIEDMAN, L. Ochratoxin A: a review. **Pure & Appl. Chem.**, v. 64, n. 7, p. 1029-1046, 1992.
- 69 PRADO, G. Incidência de ocratoxina A em café torrado e moído e em café solúvel consumido na Cidade de Belo Horizonte, MG. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 20, n.2, p. 192-196, 2000.
- 70 PRADO, G. Ochratoxin A determination in beer by immunoaffinity column cleanup and high-performance liquid chromatography. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, supl., p. 58-61, 2003.
- 71 REQUE, E. de F. **Isolamento, identificação e estudos fisiológicos da bactéria de ação probiótica (*Lactobacillus fermentum* LPB) para uso em frangos de corte**. Curitiba, 1999. p. 12-47. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Química) - Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná.
- 72 RIJ, N.J.W. Kreger-van. **The yeasts: a taxonomic study**. 3<sup>th</sup> ed. Amsterdam: Elsevier Science, 1984. 1082 p.
- 73 ROUSSOS, S. Biotechnological management of coffee pulp-isolation, screening, characterization, selection of caffeine-degrading fungi and natural microflora present in coffee pulp and husk. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 42, n. 5, p. 756-762, 1995.
- 74 SAS INSTITUTE. **Statistics analysis systems (SAS)**. Cary, NC, 2001.
- 75 SCHMIDELL, Willibaldo, LIMA, U., AQUARONE, E., BORZANI, W. (Coord.). **Biotechnologia industrial: engenharia bioquímica**. São Paulo: E. Blücher, 2001. v.2.
- 76 SCUSSEL, Vildes Maria. **Atualidades em micotoxinas e armazenagem de grãos**. Florianópolis: Ed. da Autora, 2000. 382 p.

- 77 SCUSSEL, Vildes Maria. **Micotoxinas em alimentos**. Florianópolis: Insular, 1998. 144 p.
- 78 SILVA, C.F.; SCHWAN, R.F.; DIAS, E.S.; WHEALS, A.E. Microbial diversity during maturation and natural processing of coffee cherries of *Coffea arábica* in Brazil. **Int. J. Food Microb.**, v. 60, p. 251-260, 2000.
- 79 SKINNER, F.A. **Biology and activities of yeasts**. London: Academic Press, 1980. 310 p.
- 80 SOCCOL, C.R. **Contribuição ao estudo da fermentação no estado sólido em relação com a produção de ácido fumárico, biotransformação de resíduo sólido de mandioca por *Rhizopus* e basidiomacromicetos do gênero *Pleurotus***. Curitiba, 1994. 228 f. Tese (Professor Titular), Disciplina de Biotecnologia, Departamento de Tecnologia Química, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.
- 81 SOCCOL, C.R.; RAIMBAULT, M.; PINHEIRO, L.I. Effect of CO<sub>2</sub> concentration on the mycelium growth of *Rhizopus species*. **Arq. Biol. Tecnol.**, Curitiba, v. 37, n. 1, p. 203-210, Mar. 1994.
- 82 SOUZA, S.V.C.; VARGAS, E.A.; JUNQUEIRA, R.G. Eficiência de kits de Elisa na determinação e quantificação de aflatoxina M<sub>1</sub> em leite. In: ENCONTRO NACIONAL DE MICOTOXINAS, 9., 1998; SIMPÓSIO EM ARMAZENAGEM QUALITATIVA DE GRÃOS DO MERCOSUL, 1., 1998, Florianópolis: UFSC/Dep. Ciência e Tecnologia de Alimentos/Centro de Ciências Agrárias; Sociedade Latino-Americana de Micotoxicologia, 1998. p. 77.
- 83 STEGEN, G.V.D.; JÖRISSEN, U.; PITTET, A., SACCON, M., STEINER, W., VINCENZII, M., WINKLER, M., ZAPP, J., SCHLATTER, C. Screening of European coffee final products for occurrence of ochratoxin A (OTA). **Food Additives and Contaminants**, v.14, n. 3, p. 211-216, 1997.
- 84 STUDER-ROHR, I.; DIETRICH, D.R.; SCHLATTER, J.; SCHLATTER, C. The occurrence of ochratoxin A in coffee. **Food Chem. Toxic.**, v. 33, n. 5, p. 341-355, 1995.
- 85 TANIWAKI, Marta Hiromi; BANHE, A.A.; IAMANAKA, Beatriz Thie. **Fungos produtores de ocratoxina em café**. In: ENCONTRO NACIONAL DE MICOTOXINAS, 9., 1998; SIMPÓSIO EM ARMAZENAGEM QUALITATIVA DE GRÃOS DO MERCOSUL, 1., 1998, Florianópolis. UFSC/Dep. Ciência e Tecnologia de Alimentos/Centro de Ciências Agrárias; Sociedade Latino-Americana de Micotoxicologia, 1998. p. 107.
- 86 TANIWAKI, Marta Hiromi; IAMANAKA, Beatriz Thie; VICENTINI, Maria Carolina. **Fungos produtores de ocratoxina e ocratoxina A em cafés**. Disponível em: <<http://www.coffeebreak.com.br/ocafezal.asp?SE=8&ID=119>>. Acesso em 31 jan. 2003.

- 87 TERADA, H.; TSUBOUCHI, H.; YAMAMOTO, K.; HISADA, K.; SAKABE, Y. Liquid chromatographic determination of ochratoxin A in coffee beans and coffee products. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, v. 69, p. 960-964, 1986.
- 88 TORTORA, G. , FUNKE, B., CASE, C. **Microbiologia**. 6.ed. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2000. 827 p.
- 89 TSUBOUCHI, H.; TERADA, H.; YAMAMOTO, K. Ochratoxin A found in commercial roast coffee. **Proceedings of the Japanese Association of Micotoxicology**, n. 1, Supl., p. 87-88, 1988.
- 90 VARGAS, E.A.; SANTOS, E.A. dos; PITTET, A. **Determination of ochratoxin A in green coffee by immunoaffinity column clean up and LC**. [Belo Horizonte: Ministério da Agricultura e do Abastecimento, Lab. de Controle de Qualidade e Segurança Alimentar], [2002].
- 91 WILSON, C.L.; WISNIEWSKI, M.E. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables- an emerging technology. **Annual Review of Phytopathology**, v. 27, p. 425-441, 1989.
- 92 WILSON, C.L.; CHALUTZ, E. Postharvest biological control of *Penicillium* rots of citrus with antagonistic yeasts and bacteria. **Scientia Horticulturae**, v. 40, p.105-112, 1989.
- 93 WOICIECHOWSKI, A.L. **Bioconversão de hidrolisado hemicelulósico de *Pinus taeda* obtido pelo processo de explosão a vapor, na produção de ácido L(+)<sup>o</sup> láctico pelo fungo *Rhizopus oryzae***. Curitiba, 1997. 101 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Química) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

**ANEXOS**

**ANEXO 1 – CONTAGEM DE COLÔNIAS (UFC/mL) DA SUSPENSÃO DE ESPOROS DE *Aspergillus ochraceus***

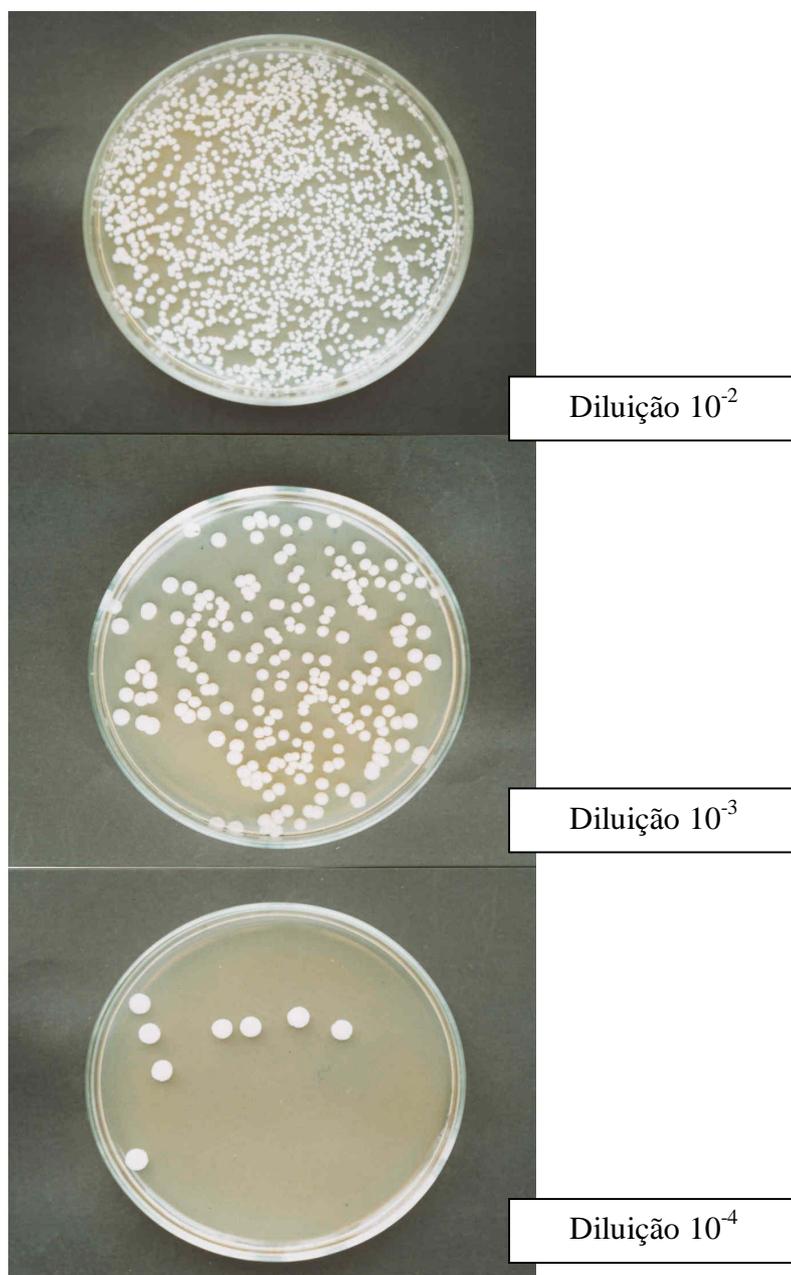


**SUSPENSÃO DE ESPOROS DE *Aspergillus ochraceus* :  $3,1 \times 10^6$  UFC/mL**

A	B	C	Média
$4,0 \times 10^6$	$1,8 \times 10^{6*}$	$3,5 \times 10^6$	$3,1 \times 10^6$

\*Figura

## ANEXO 2 – CONTAGEM DE COLÔNIAS (UFC/mL) DO INÓCULO DAS CEPAS DE LEVEDURAS 7e, 11b e 13b



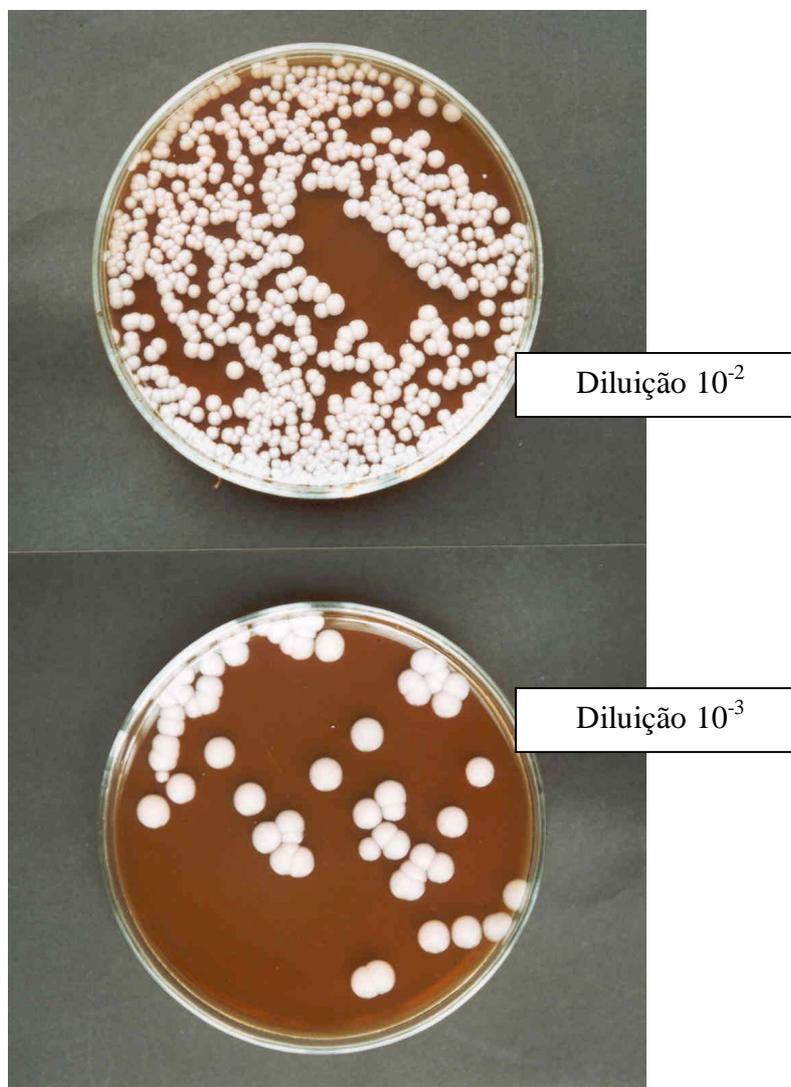
Inóculo cepa 7e (UFC/mL): média  $2,6 \times 10^6$

Inóculo cepa 11b (UFC/mL): média  $2,9 \times 10^6$

Inóculo cepa 13b (UFC/mL): média  $3,2 \times 10^6$

CEPAS	Repetições			
	A	B	C	média
7e	$2,1 \times 10^6$	$1,7 \times 10^6$	$4,2 \times 10^6$	$2,6 \times 10^6$
11b	$2,6 \times 10^6$	$3,8 \times 10^6$	$2,3 \times 10^6$	$2,9 \times 10^6$
13b	$3,6 \times 10^6$	$1,9 \times 10^{6*}$	$4,3 \times 10^6$	$3,2 \times 10^6$

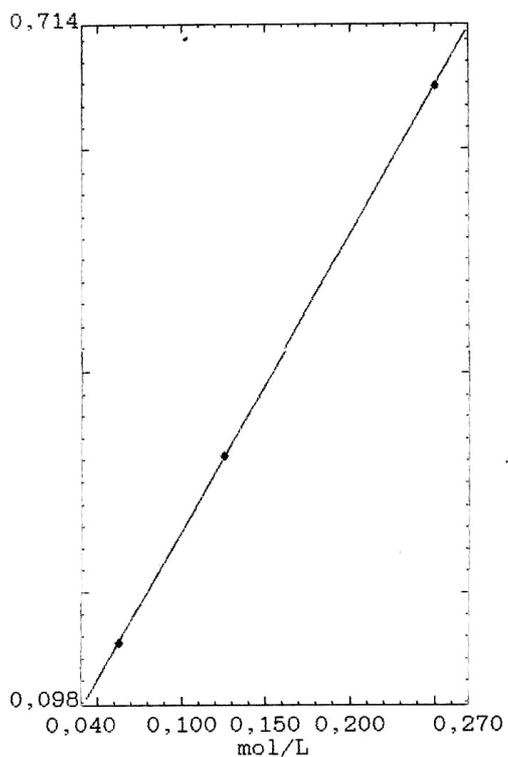
### ANEXO 3 – CONTAGEM DE COLÔNIAS (UFC/mL) DO INÓCULO DA CEPA DE BACTÉRIA LÁCTICA LPB03



Inoculo cepa LPB03 (UFC/mL) : média  $4,2 \times 10^6$

LPB03	$3,2 \times 10^6$	$6,6 \times 10^{6*}$	$2,8 \times 10^6$	<b>Média</b> $4,2 \times 10^6$
-------	-------------------	----------------------	-------------------	-----------------------------------

## ANEXO 4 - CURVA DE CALIBRAÇÃO DO ESPECTROFOTÔMETRO



Std #	Conc.	Abs.
1	0,2500	0,657
2	0,1250	0,323
3	0,06250	0,154

File Name:

CALIBRAÇÃO ESPECTROFOTOMETRO

SOLUÇÃO DE DICROMATO DE POTASSIO

Created: 07:12 06/04/03  
 Data: Modified

DATA: 22/07/2003

Wavelength: 333,0  
 Slit Width: 2,0

MARCIA REGINA BEUX

Multi-Point Working Curve  
 Conc = k1 A + k0  
 k1 = 0,372  
 k0 = 0,00493  
 Chi-Square: 0,00000

Number of Points: 3

## ANEXO 5 - CURVA PADRÃO DA OCRATOXINA A

Method C:\HPCHEM\1\METHODS\OCRA.M

### ===== Calibration Table =====

Análise de Ocratoxina

Calib. Data Modified : 30/07/03 13:30:45

Calculate : External Standard  
Based on : Peak Area

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

Curve Type : Quadratic  
Origin : Included  
Weight : Quadratic

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

Calibration Report Options :

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

Signal 1: FLD1 A, Ex=332, Em=476

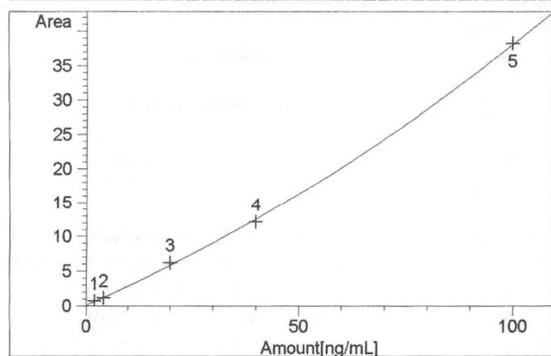
RetTime [min]	Lvl Sig	Amount [ng/mL]	Area	Amt/Area	Ref Grp Name
4.668	1	2.10000	6.44731e-1	3.25717	OCRATOXINA
	2	4.20000	1.08884	3.85732	
	3	20.00000	6.17699	3.23782	
	4	40.00000	12.10945	3.30320	
	5	100.00000	38.22877	2.61583	

### ===== Peak Sum Table =====

\*\*\*No Entries in table\*\*\*  
=====

continua...

C:\HPCHEM\1\METHODS\OCRA.M

=====  
Calibration Curves  
=====

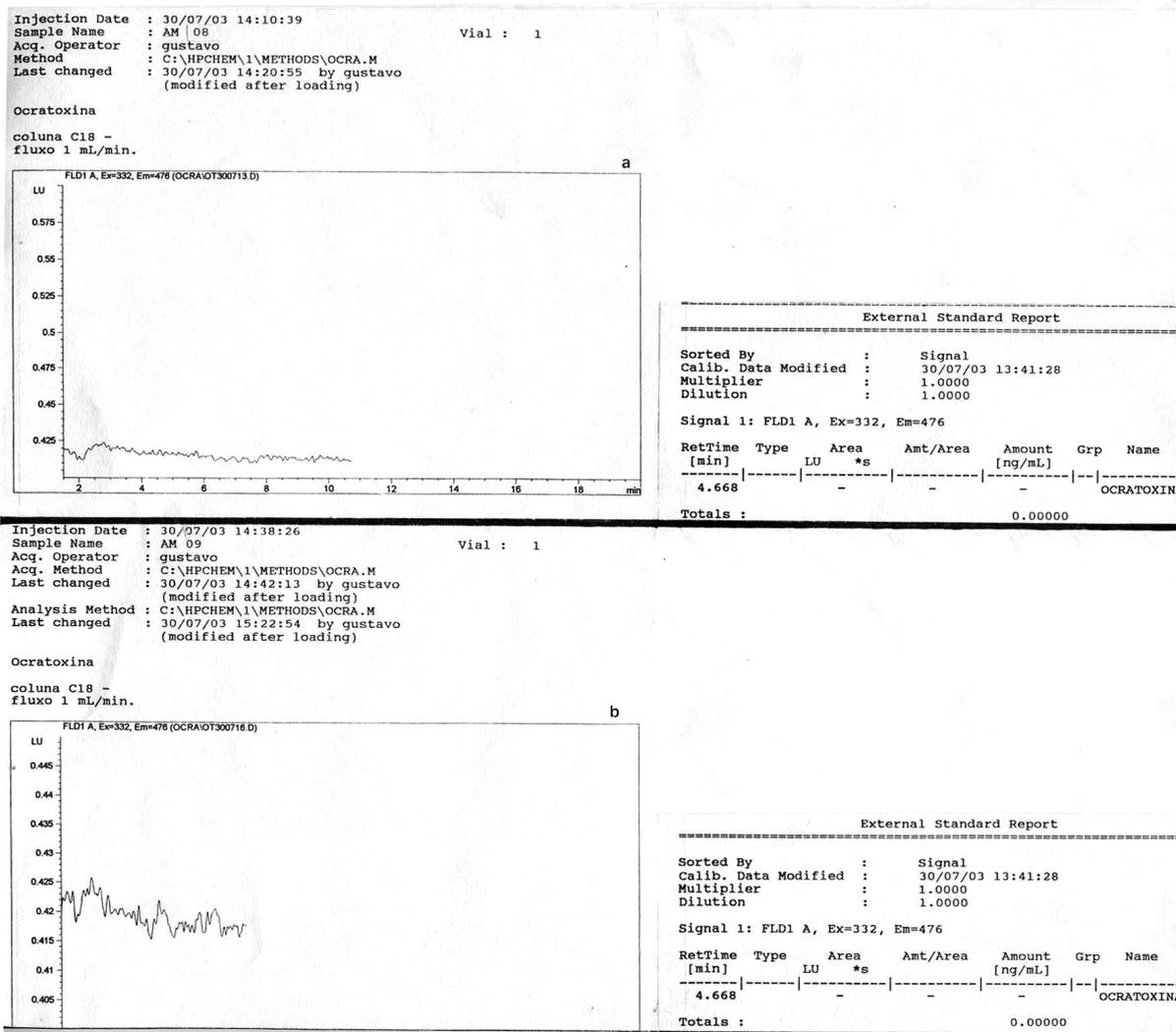
OCRATOXINA at exp. RT: 4.668  
FLD1 A, Ex=332, Em=476  
Correlation: 0.99802  
Residual Std. Dev.: 0.29133  
Formula:  $y = ax^2 + bx + c$   
a: 1.12931e-3  
b: 2.67271e-1  
c: 4.50121e-2  
x: Amount[ng/mL]  
y: Area

Calibration Level Weights:

Level 1	: 1
Level 2	: 0.25
Level 3	: 0.011025
Level 4	: 0.002756
Level 5	: 0.000441

  
=====

## ANEXO 6 – CROMATOGRAMAS DA QUANTIFICAÇÃO DE OCRATOXINA A NOS FRASCOS SUBMETIDOS A CULTURA SUBMERSA CONTENDO ESPOROS DE *Aspergillus ochraceus*, *Candida lambica* E *Lactobacillus brevis*



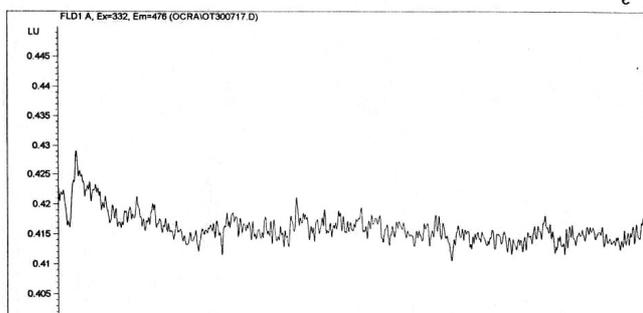
- a - Controle (Caldo extrato de Café inoculado com *Aspergillus ochraceus*)  
 b - Teste (Caldo extrato de café inoculado com a cepa a de *Candida lambica* 13b, cepa de *Lactobacillus brevis* LPB03 e *Aspergillus ochraceus*)

continua...

Injection Date : 30/07/03 14:46:45  
 Sample Name : AM 10 Vial : 1  
 Acq. Operator : gustavo  
 Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OCRA.M  
 Last changed : 30/07/03 14:42:13 by gustavo  
 (modified after loading)  
 Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OCRA.M  
 Last changed : 30/07/03 15:21:58 by gustavo  
 (modified after loading)

Ocratoxina

coluna C18 -  
 fluxo 1 mL/min.



External Standard Report

Sorted By : Signal  
 Calib. Data Modified : 30/07/03 13:41:28  
 Multiplier : 1.0000  
 Dilution : 1.0000

Signal 1: FLD1 A, Ex=332, Em=476

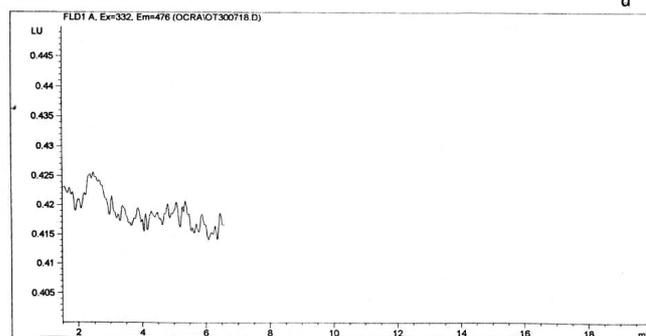
RetTime [min]	Type	Area LU	Area *s	Amt/Area	Amount [ng/mL]	Grp	Name
4.668	-	-	-	-	-	-	OCRATOXINA

Totals : 0.00000

Injection Date : 30/07/03 15:18:13  
 Sample Name : AM 11 Vial : 1  
 Acq. Operator : gustavo  
 Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OCRA.M  
 Last changed : 30/07/03 15:22:54 by gustavo  
 (modified after loading)

Ocratoxina

coluna C18 -  
 fluxo 1 mL/min.



External Standard Report

Sorted By : Signal  
 Calib. Data Modified : 30/07/03 13:41:28  
 Multiplier : 1.0000  
 Dilution : 1.0000

Signal 1: FLD1 A, Ex=332, Em=476

RetTime [min]	Type	Area LU	Area *s	Amt/Area	Amount [ng/mL]	Grp	Name
4.668	-	-	-	-	-	-	OCRATOXINA

Totals : 0.00000

- c - Teste (Caldo extrato de café inoculado com a cepa a de *Lactobacillus brevis* LPB03 e *Aspergillus ochraceus*).
- d - Teste (Caldo extrato de café inoculado com a cepa a de *Candida lambica* 13b e *Aspergillus ochraceus*).

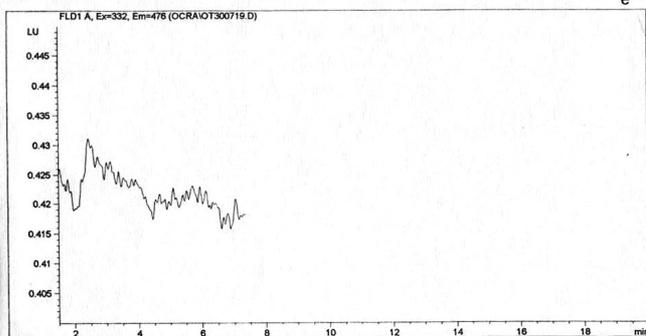
continua...

Injection Date : 30/07/03 15:25:54  
 Sample Name : AM 12  
 Acq. Operator : gustavo  
 Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OCRA.M  
 Last changed : 30/07/03 15:22:54 by gustavo  
 (modified after loading)

Vial : 1

Ocratoxina

coluna C18 -  
 fluxo 1 mL/min.



External Standard Report

Sorted By : Signal  
 Calib. Data Modified : 30/07/03 13:41:28  
 Multiplier : 1.0000  
 Dilution : 1.0000

Signal 1: FLD1 A, Ex=332, Em=476

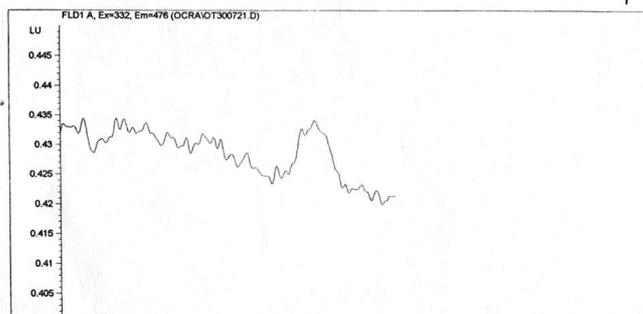
RetTime [min]	Type	Area LU *s	Amt/Area	Amount [ng/mL]	Grp	Name
4.668	-	-	-	-	-	OCRATOXINA
Totals :				0.00000		

Injection Date : 30/07/03 15:41:54  
 Sample Name : AM 13  
 Acq. Operator : gustavo  
 Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OCRA.M  
 Last changed : 30/07/03 15:48:08 by gustavo  
 (modified after loading)  
 Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OCRA.M  
 Last changed : 30/07/03 15:50:13 by gustavo  
 (modified after loading)

Vial : 1

Ocratoxina

coluna C18 -  
 fluxo 1 mL/min.



External Standard Report

Sorted By : Signal  
 Calib. Data Modified : 30/07/03 13:41:28  
 Multiplier : 1.0000  
 Dilution : 1.0000

Signal 1: FLD1 A, Ex=332, Em=476

RetTime [min]	Type	Area LU *s	Amt/Area	Amount [ng/mL]	Grp	Name
4.668	-	-	-	-	-	OCRATOXINA
Totals :				0.00000		

- e - Controle (Caldo extrato de café inoculado com *Candida lambica* 13b.  
 f - Controle (Caldo extrato de café inoculado com *Lactobacillus brevis* LPB03).

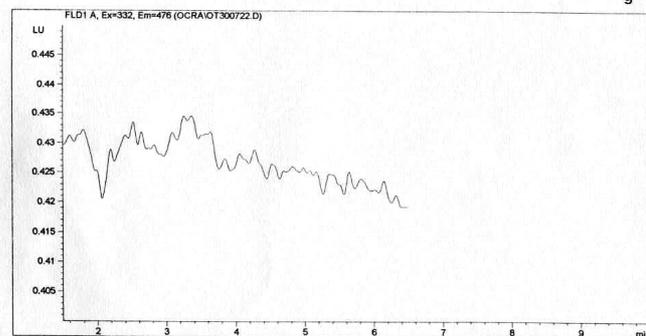
continua...

Injection Date : 30/07/03 15:49:33 Vial : 1  
 Sample Name : AM 14  
 Acq. Operator : Gustavo  
 Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OCRA.M  
 Last changed : 30/07/03 15:50:13 by gustavo  
 (modified after loading)

Ocratoxina

coluna C18 -  
 fluxo 1 mL/min.

9



External Standard Report

Sorted By : Signal  
 Calib. Data Modified : 30/07/03 13:41:28  
 Multiplier : 1.0000  
 Dilution : 1.0000

Signal 1: FLD1 A, Ex=332, Em=476

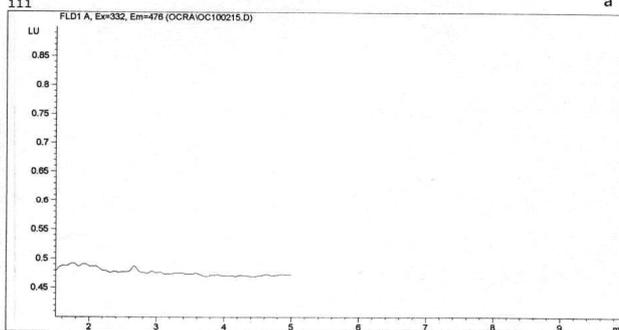
RetTime [min]	Type	Area *s	Amt/Area	Amount [ng/mL]	Grp	Name
4.668	LU	-	-	-		OCRATOXINA
Totals :				0.00000		

g – caldo extrato de café.

**ANEXO 7 – CROMATOGRAMAS DA QUANTIFICAÇÃO DE OCRATOXINA (ng/g) OBTIDA APÓS 10 DIAS DE INCUBAÇÃO DOS GRÃOS DE CAFÉ VERDE ARTIFICIALMENTE CONTAMINADOS COM *Aspergillus ochraceus* E *Candida lambica***

Injection Date : 02/10/03 15:29:40 Vial : 1  
 Sample Name : am A - Ocra  
 Acq. Operator : Luis Gustavo  
 Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OCRA.M  
 Last changed : 02/10/03 16:15:44 by Luis Gustavo  
 (modified after loading)  
 Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OCRA.M  
 Last changed : 03/10/03 10:03:15 by Luis Gustavo  
 (modified after loading)

Ocratoxina  
 coluna C18 -  
 fluxo 1 mL/min.  
 111



External Standard Report

Sorted By : Signal  
 Calib. Data Modified : 02/10/03 13:47:56  
 Multiplier : 1.0000  
 Dilution : 1.0000

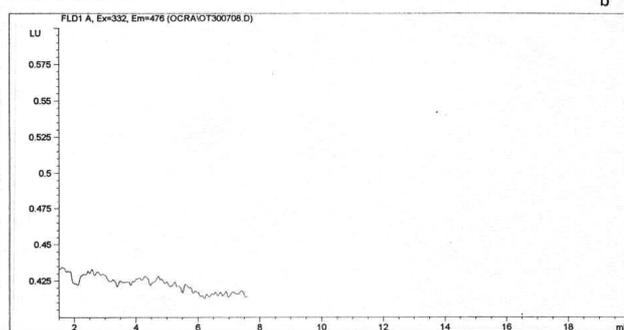
Signal 1: FLD1 A, Ex=332, Em=476

RetTime [min]	Type	Area LU	Amt/Area *s	Amount [ng/mL]	Grp	Name
3.554	-	-	-	-	-	OCRATOXINA

Totals : 0.00000

Injection Date : 30/07/03 13:17:57 Vial : 1  
 Sample Name : AM 01  
 Acq. Operator : gustavo  
 Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OCRA.M  
 Last changed : 30/07/03 13:15:55 by gustavo  
 (modified after loading)  
 Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OCRA.M  
 Last changed : 30/07/03 14:20:55 by gustavo

Ocratoxina  
 coluna C18 -  
 fluxo 1 mL/min.



External Standard Report

Sorted By : Signal  
 Calib. Data Modified : 30/07/03 13:41:28  
 Multiplier : 1.0000  
 Dilution : 1.0000

Signal 1: FLD1 A, Ex=332, Em=476

RetTime [min]	Type	Area LU	Amt/Area *s	Amount [ng/mL]	Grp	Name
4.668	-	-	-	-	-	OCRATOXINA

Totals : 0.00000

a - Controle 1- Grãos de café verde não inoculados.

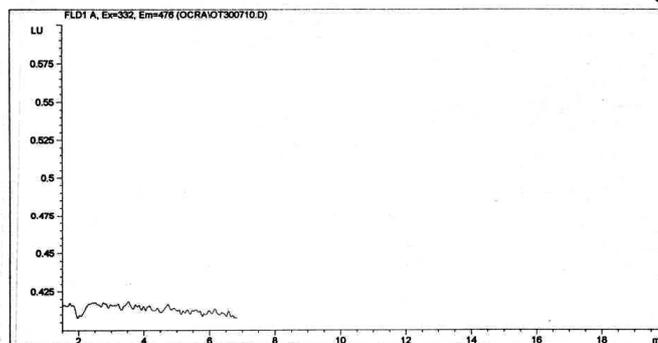
b - Controle 2- Grãos de café verde após 10 dias de incubação.

continua...

Injection Date : 30/07/03 13:34:50 Vial : 1  
 Sample Name : AM 03  
 Acq. Operator : gustavo  
 Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OCRA.M  
 Last changed : 30/07/03 13:41:32 by gustavo  
 (modified after loading)  
 Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OCRA.M  
 Last changed : 30/07/03 14:20:55 by gustavo

Ocratoxina

coluna C18 -  
 fluxo 1 mL/min.



## External Standard Report

Sorted By : Signal  
 Calib. Data Modified : 30/07/03 13:41:28  
 Multiplier : 1.0000  
 Dilution : 1.0000

Signal 1: FLD1 A, Ex=332, Em=476

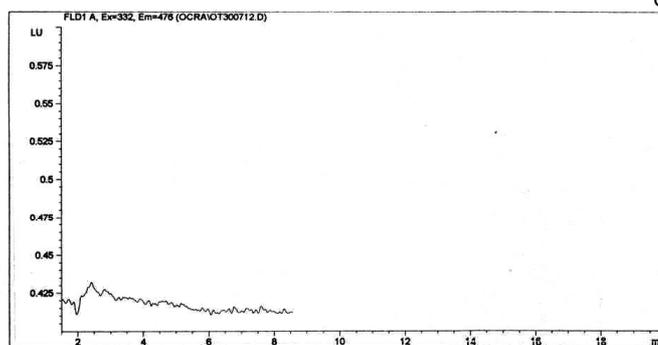
RetTime [min]	Type	Area LU	*s	Amt/Area	Amount [ng/mL]	Grp	Name
4.668							OCRATOXINA

Totals : 0.00000

Injection Date : 30/07/03 14:01:02 Vial : 1  
 Sample Name : AM 05  
 Acq. Operator : gustavo  
 Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OCRA.M  
 Last changed : 30/07/03 14:09:36 by gustavo  
 (modified after loading)  
 Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OCRA.M  
 Last changed : 30/07/03 14:20:55 by gustavo

Ocratoxina

coluna C18 -  
 fluxo 1 mL/min.



## External Standard Report

Sorted By : Signal  
 Calib. Data Modified : 30/07/03 13:41:28  
 Multiplier : 1.0000  
 Dilution : 1.0000

Signal 1: FLD1 A, Ex=332, Em=476

RetTime [min]	Type	Area LU	*s	Amt/Area	Amount [ng/mL]	Grp	Name
4.668							OCRATOXINA

Totals : 0.00000

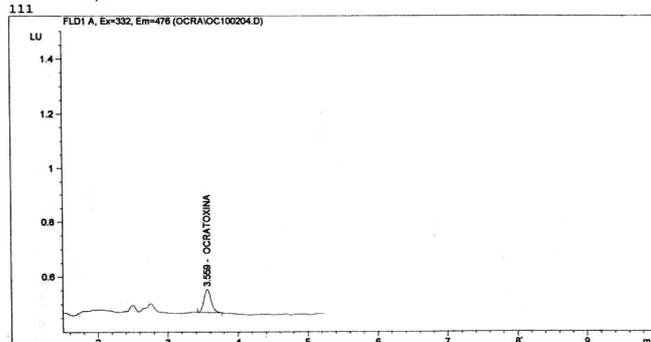
c - Controle 3 - Grãos de café verde inoculados com a cepa de *Candida lambica* 13b.  
 d - Controle 4 - Grãos de café verde inoculados com a cepa de *Lactobacillus brevis* LPB03.

continua...

Injection Date : 02/10/03 14:20:46 Vial : 1  
 Sample Name : am 02-A  
 Acq. Operator : Luis Gustavo  
 Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OCRA.M  
 Last changed : 02/10/03 13:48:45 by Luis Gustavo  
 (modified after loading)  
 Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OCRA.M  
 Last changed : 03/10/03 11:16:57 by Luis Gustavo  
 (modified after loading)

Ocratoxina

coluna C18 -  
 fluxo 1 mL/min.



## External Standard Report

Sorted By : Signal  
 Calib. Data Modified : 02/10/03 13:47:56  
 Multiplier : 1.0000  
 Dilution : 1.0000

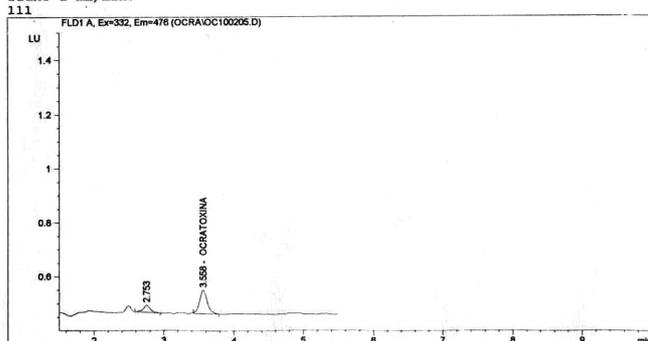
Signal 1: FLD1 A, Ex=332, Em=476

RetTime [min]	Type	Area LU *s	Amt/Area	Amount [ng/mL]	Grp	Name
3.559	BBA	5.96450e-1	3.42952	2.04554		OCRATOXINA

Injection Date : 02/10/03 14:26:46 Vial : 1  
 Sample Name : am 02-B  
 Acq. Operator : Luis Gustavo  
 Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OCRA.M  
 Last changed : 02/10/03 15:31:25 by Luis Gustavo  
 (modified after loading)  
 Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OCRA.M  
 Last changed : 03/10/03 11:16:57 by Luis Gustavo  
 (modified after loading)

Ocratoxina

coluna C18 -  
 fluxo 1 mL/min.



## External Standard Report

Sorted By : Signal  
 Calib. Data Modified : 02/10/03 13:47:56  
 Multiplier : 1.0000  
 Dilution : 1.0000

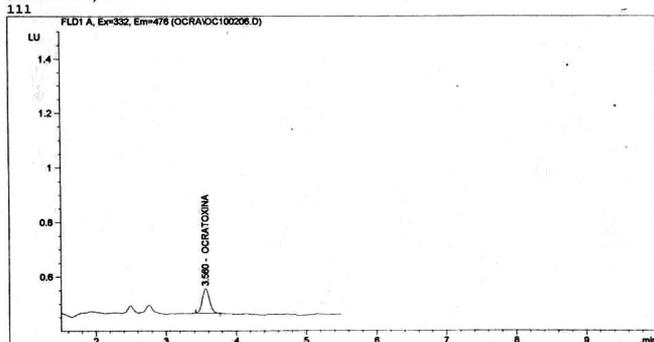
Signal 1: FLD1 A, Ex=332, Em=476

RetTime [min]	Type	Area LU *s	Amt/Area	Amount [ng/mL]	Grp	Name
3.560	BBA	6.47008e-1	3.44871	2.23135		OCRATOXINA

Injection Date : 02/10/03 14:33:06 Vial : 1  
 Sample Name : am 02-C  
 Acq. Operator : Luis Gustavo  
 Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OCRA.M  
 Last changed : 02/10/03 15:31:25 by Luis Gustavo  
 (modified after loading)  
 Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OCRA.M  
 Last changed : 03/10/03 11:16:57 by Luis Gustavo  
 (modified after loading)

Ocratoxina

coluna C18 -  
 fluxo 1 mL/min.



## External Standard Report

Sorted By : Signal  
 Calib. Data Modified : 02/10/03 13:47:56  
 Multiplier : 1.0000  
 Dilution : 1.0000

Signal 1: FLD1 A, Ex=332, Em=476

RetTime [min]	Type	Area LU *s	Amt/Area	Amount [ng/mL]	Grp	Name
3.558	BBA	6.58735e-1	3.45268	2.27440		OCRATOXINA

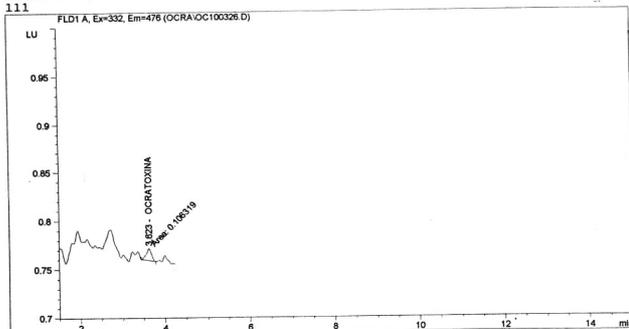
e - Teste 1-Grãos de café verde inoculados com a cepa de *Aspergillus ochraceus* (Amostras 2A, 2B e 2C = repetições).

continua...

Injection Date : 02/10/03 14:46:14 Vial : 1  
 Sample Name : am 04-A  
 Acq. Operator : Luis Gustavo  
 Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OCRA.M  
 Last changed : 02/10/03 15:31:25 by Luis Gustavo  
 (modified after loading)  
 Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OCRA.M  
 Last changed : 03/10/03 11:16:57 by Luis Gustavo  
 (modified after loading)

Ocratoxina

coluna C18 -  
 fluxo 1 mL/min.  
 111



## External Standard Report

Sorted By : Signal  
 Calib. Data Modified : 03/10/03 14:47:13  
 Multiplier : 1.0000  
 Dilution : 1.0000

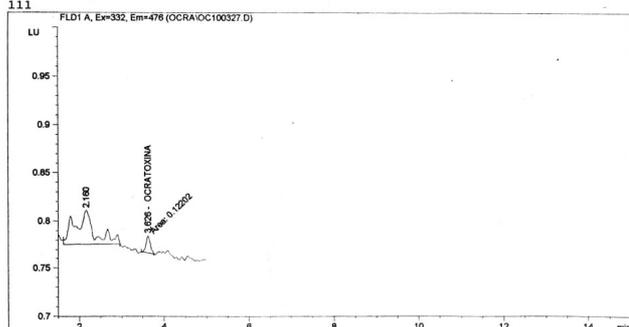
Signal 1: FLD1 A, Ex=332, Em=476

RetTime [min]	Type	Area LU*s	Amt/Area	Amount [ng/mL]	Grp	Name
3.623	MM	1.06319e-1	2.15540	2.29161e-1		OCRATOXINA

Injection Date : 02/10/03 14:52:03 Vial : 1  
 Sample Name : am 04-B  
 Acq. Operator : Luis Gustavo  
 Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OCRA.M  
 Last changed : 02/10/03 15:31:25 by Luis Gustavo  
 (modified after loading)  
 Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OCRA.M  
 Last changed : 03/10/03 11:16:57 by Luis Gustavo  
 (modified after loading)

Ocratoxina

coluna C18 -  
 fluxo 1 mL/min.  
 111



## External Standard Report

Sorted By : Signal  
 Calib. Data Modified : 03/10/03 14:47:13  
 Multiplier : 1.0000  
 Dilution : 1.0000

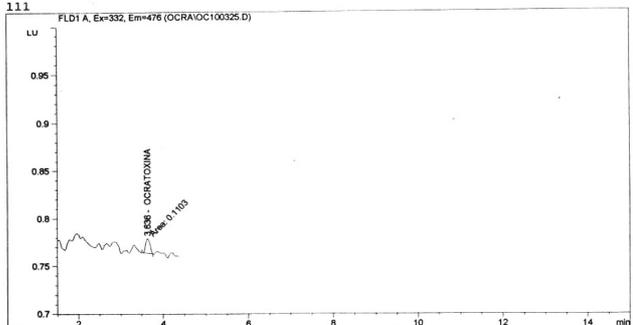
Signal 1: FLD1 A, Ex=332, Em=476

RetTime [min]	Type	Area LU*s	Amt/Area	Amount [ng/mL]	Grp	Name
3.626	MM	1.22020e-1	2.35844	2.87779e-1		OCRATOXINA

Injection Date : 02/10/03 14:58:03 Vial : 1  
 Sample Name : am 04-C  
 Acq. Operator : Luis Gustavo  
 Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OCRA.M  
 Last changed : 02/10/03 15:31:25 by Luis Gustavo  
 (modified after loading)  
 Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OCRA.M  
 Last changed : 03/10/03 11:16:57 by Luis Gustavo  
 (modified after loading)

Ocratoxina

coluna C18 -  
 fluxo 1 mL/min.  
 111



## External Standard Report

Sorted By : Signal  
 Calib. Data Modified : 03/10/03 14:47:13  
 Multiplier : 1.0000  
 Dilution : 1.0000

Signal 1: FLD1 A, Ex=332, Em=476

RetTime [min]	Type	Area LU*s	Amt/Area	Amount [ng/mL]	Grp	Name
3.636	MM	1.10300e-1	2.21238	2.44026e-1		OCRATOXINA

f - Teste 2- Grãos de café verde inoculados com a cepa de *Candida lambica* 13B e *Aspergillus ochraceus* (amostras 4A, 4B e 4C = repetições).

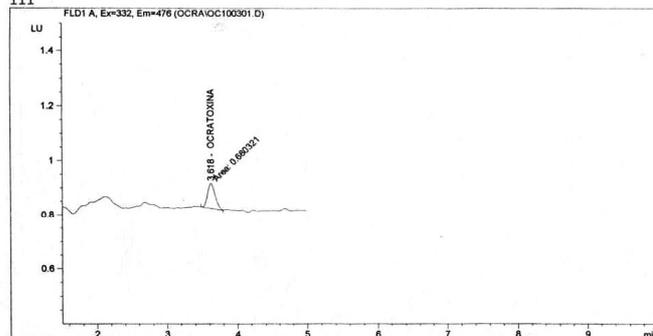
continua...

Injection Date : 03/10/03 11:18:39 Vial : 1  
 Sample Name : café -6-A  
 Acq. Operator : Luis Gustavo  
 Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OCRA.M  
 Last changed : 03/10/03 11:16:57 by Luis Gustavo  
 (modified after loading)

Ocratoxina

coluna C18 -  
fluxo 1 mL/min.

111



## External Standard Report

Sorted By : Signal  
 Calib. Data Modified : 02/10/03 13:47:56  
 Multiplier : 1.0000  
 Dilution : 1.0000

Signal 1: FLD1 A, Ex=332, Em=476

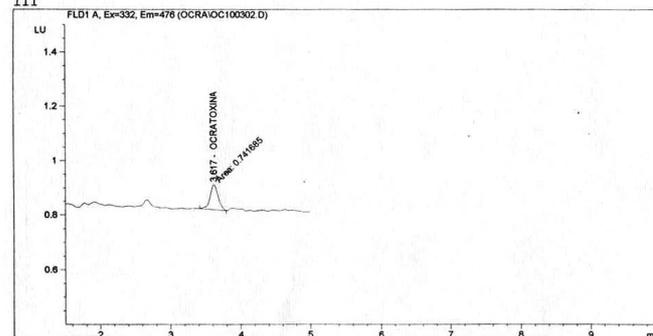
RetTime [min]	Type	Area LU *s	Amt/Area	Amount [ng/mL]	Grp	Name
3.618	MM	6.80321e-1	3.45957	2.35362		OCRATOXINA

Injection Date : 03/10/03 11:25:49 Vial : 1  
 Sample Name : café -6-B  
 Acq. Operator : Luis Gustavo  
 Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OCRA.M  
 Last changed : 03/10/03 11:16:57 by Luis Gustavo  
 (modified after loading)

Ocratoxina

coluna C18 -  
fluxo 1 mL/min.

111



## External Standard Report

Sorted By : Signal  
 Calib. Data Modified : 02/10/03 13:47:56  
 Multiplier : 1.0000  
 Dilution : 1.0000

Signal 1: FLD1 A, Ex=332, Em=476

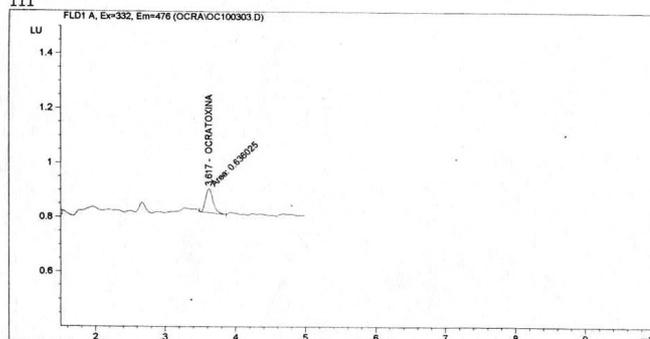
RetTime [min]	Type	Area LU *s	Amt/Area	Amount [ng/mL]	Grp	Name
3.617	MM	7.41685e-1	3.47658	2.57852		OCRATOXINA

Injection Date : 03/10/03 11:31:20 Vial : 1  
 Sample Name : café 6-C  
 Acq. Operator : Luis Gustavo  
 Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OCRA.M  
 Last changed : 03/10/03 11:16:57 by Luis Gustavo  
 (modified after loading)

Ocratoxina

coluna C18 -  
fluxo 1 mL/min.

111



## External Standard Report

Sorted By : Signal  
 Calib. Data Modified : 02/10/03 13:47:56  
 Multiplier : 1.0000  
 Dilution : 1.0000

Signal 1: FLD1 A, Ex=332, Em=476

RetTime [min]	Type	Area LU *s	Amt/Area	Amount [ng/mL]	Grp	Name
3.617	MM	6.36025e-1	3.44484	2.19100		OCRATOXI

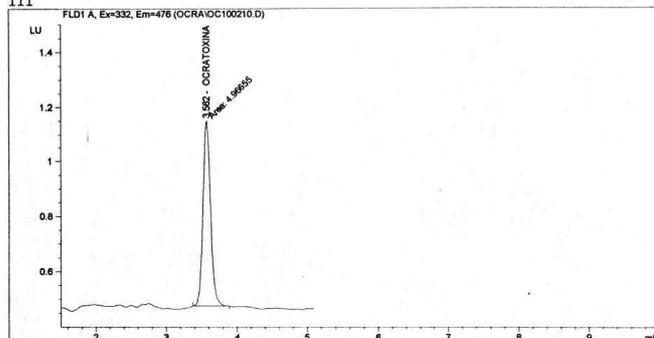
g - Teste 3 - Grãos de café verde inoculados com a cepa de *Lactobacillus brevis* LPB03 e *Aspergillus ochraceus* (amostras 6A, 6B e 6C = repetições).

continua...

Injection Date : 02/10/03 15:04:49 Vial : 1  
 Sample Name : am 07-A  
 Acq. Operator : Luis Gustavo  
 Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OCRA.M  
 Last changed : 02/10/03 15:31:25 by Luis Gustavo  
 (modified after loading)  
 Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OCRA.M  
 Last changed : 03/10/03 11:16:57 by Luis Gustavo  
 (modified after loading)

Ocratoxina

coluna C18 -  
 fluxo 1 mL/min.  
 111



## External Standard Report

Sorted By : Signal  
 Calib. Data Modified : 02/10/03 13:47:56  
 Multiplier : 1.0000  
 Dilution : 1.0000

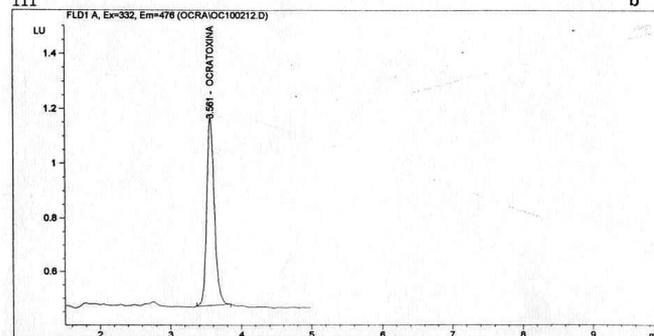
Signal 1: FLD1 A, Ex=332, Em=476

RetTime [min]	Type	Area LU *s	Amt/Area	Amount [ng/mL]	Grp	Name
3.562	MM	4.96655	3.45684	17.16860		OCRATOXINA

Injection Date : 02/10/03 15:11:04 Vial : 1  
 Sample Name : am 07-b  
 Acq. Operator : Luis Gustavo  
 Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OCRA.M  
 Last changed : 02/10/03 16:15:44 by Luis Gustavo  
 (modified after loading)  
 Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OCRA.M  
 Last changed : 03/10/03 11:16:57 by Luis Gustavo  
 (modified after loading)

Ocratoxina

coluna C18 -  
 fluxo 1 mL/min.  
 111



## External Standard Report

Sorted By : Signal  
 Calib. Data Modified : 02/10/03 13:47:56  
 Multiplier : 1.0000  
 Dilution : 1.0000

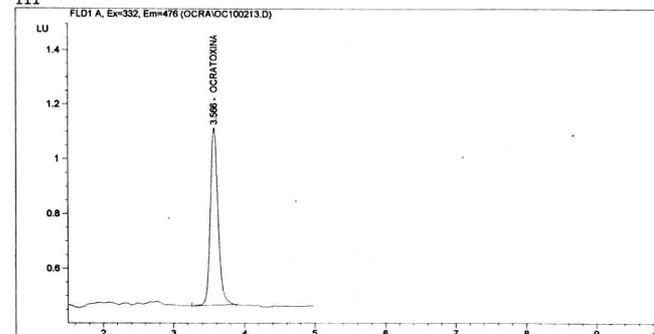
Signal 1: FLD1 A, Ex=332, Em=476

RetTime [min]	Type	Area LU *s	Amt/Area	Amount [ng/mL]	Grp	Name
3.561	BBA	5.18048	3.44868	17.86579		OCRATOXINA

Injection Date : 02/10/03 15:16:44 Vial : 1  
 Sample Name : am 07-c  
 Acq. Operator : Luis Gustavo  
 Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OCRA.M  
 Last changed : 02/10/03 16:15:44 by Luis Gustavo  
 (modified after loading)  
 Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OCRA.M  
 Last changed : 03/10/03 11:16:57 by Luis Gustavo  
 (modified after loading)

Ocratoxina

coluna C18 -  
 fluxo 1 mL/min.  
 111



## External Standard Report

Sorted By : Signal  
 Calib. Data Modified : 02/10/03 13:47:56  
 Multiplier : 1.0000  
 Dilution : 1.0000

Signal 1: FLD1 A, Ex=332, Em=476

RetTime [min]	Type	Area LU *s	Amt/Area	Amount [ng/mL]	Grp	Name
3.566	BBA	4.87710	3.46025	16.87600		OCRATOXINA

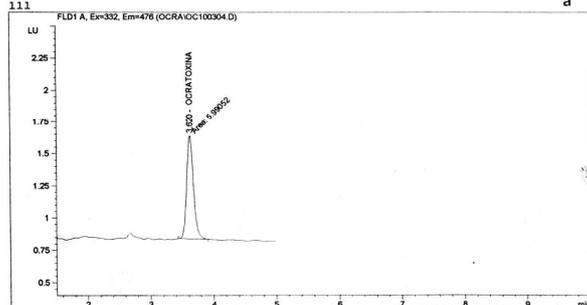
h - Grãos de café verde inoculados com *Candida lambica* 13b, *Lactobacillus brevis* LPB03 e *Aspergillus ochraceus* (amostras 7A, 7B e 7C = repetições).

## ANEXO 8 – CROMATOGRAMAS DA QUANTIFICAÇÃO DE OCRATOXINA (ng/g) OBTIDA APÓS 10 DIAS DE INCUBAÇÃO DOS GRÃOS DE CAFÉ VERDE ARTIFICIALMENTE CONTAMINADOS *Aspergillus ochraceus* E DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE *Candida lambica*

Injection Date : 03/10/03 11:39:10  
 Sample Name : 10e2-A Vial : 1  
 Acq. Operator : Luis Gustavo  
 Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OCRA.M  
 Last changed : 03/10/03 11:16:57 by Luis Gustavo  
 (modified after loading)  
 Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OCRA.M  
 Last changed : 03/10/03 11:47:34 by Luis Gustavo  
 (modified after loading)

Ocratoxina

coluna C18 -  
 fluxo 1 mL/min.  
 111



### External Standard Report

Sorted By : Signal  
 Calib. Data Modified : 02/10/03 13:47:56  
 Multiplier : 1.0000  
 Dilution : 1.0000

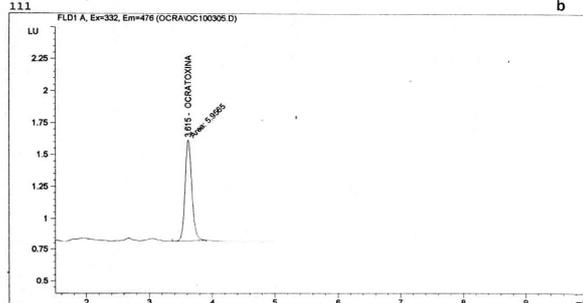
Signal 1: FLD1 A, Ex=332, Em=476

RetTime [min]	Type	Area LU *s	Amt/Area	Amount [ng/mL]	Grp	Name
3.615	MM	5.95650	3.41904	20.36549		OCRATOXINA

Injection Date : 03/10/03 11:44:57  
 Sample Name : 10e2-B Vial : 1  
 Acq. Operator : Luis Gustavo  
 Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OCRA.M  
 Last changed : 03/10/03 11:47:34 by Luis Gustavo  
 (modified after loading)

Ocratoxina

coluna C18 -  
 fluxo 1 mL/min.  
 111



### External Standard Report

Sorted By : Signal  
 Calib. Data Modified : 02/10/03 13:47:56  
 Multiplier : 1.0000  
 Dilution : 1.0000

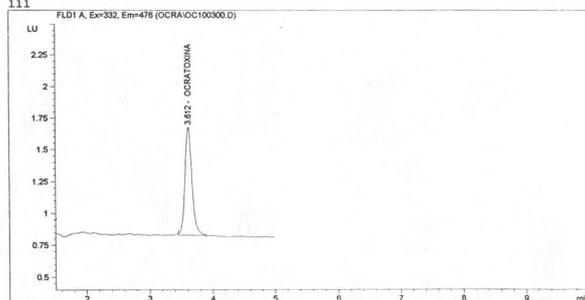
Signal 1: FLD1 A, Ex=332, Em=476

RetTime [min]	Type	Area LU *s	Amt/Area	Amount [ng/mL]	Grp	Name
3.620	MM	5.99052	3.41774	20.47405		OCRATOXINA

Injection Date : 03/10/03 11:11:57  
 Sample Name : am 10e2 - C Vial : 1  
 Acq. Operator : Luis Gustavo  
 Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OCRA.M  
 Last changed : 03/10/03 11:16:57 by Luis Gustavo  
 (modified after loading)  
 Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OCRA.M  
 Last changed : 03/10/03 11:47:34 by Luis Gustavo  
 (modified after loading)

Ocratoxina

coluna C18 -  
 fluxo 1 mL/min.  
 111



### External Standard Report

Sorted By : Signal  
 Calib. Data Modified : 02/10/03 13:47:56  
 Multiplier : 1.0000  
 Dilution : 1.0000

Signal 1: FLD1 A, Ex=332, Em=476

RetTime [min]	Type	Area LU *s	Amt/Area	Amount [ng/mL]	Grp	Name
3.612	BBA	6.46158	3.39987	21.96853		OCRATOXINA

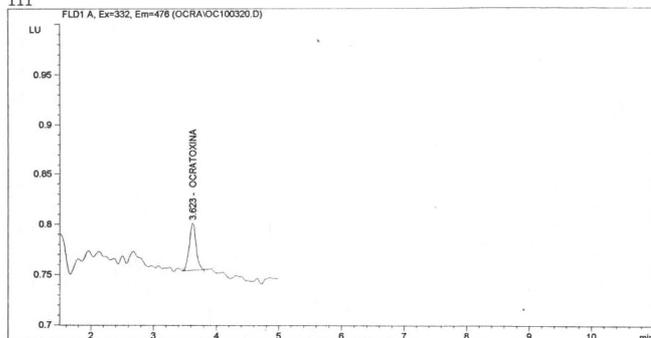
a - Teste 1-Grãos de café verdes inoculados com  $10^2$  UFC/g da cepa 13b e *Aspergillus ochraceus* (amostras 10A, 10B e 10C = repetições).

continua...

Injection Date : 03/10/03 14:54:20  
 Sample Name : 10e3-A Vial : 1  
 Acq. Operator : Luis Gustavo  
 Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OCRA.M  
 Last changed : 03/10/03 14:54:42 by Luis Gustavo  
 (modified after loading)

Ocratoxina

coluna C18 -  
 fluxo 1 mL/min.  
 111



External Standard Report

Sorted By : Signal  
 Calib. Data Modified : 03/10/03 14:47:13  
 Multiplier : 1.0000  
 Dilution : 1.0000

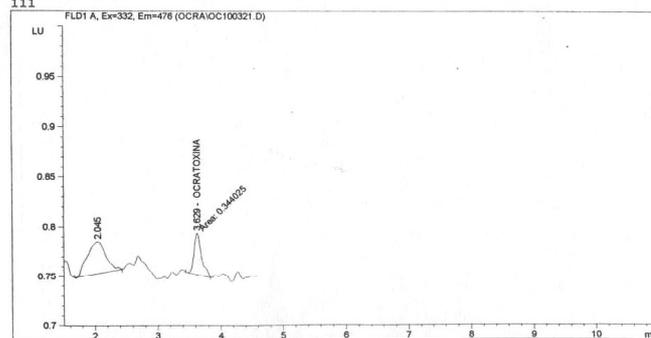
Signal 1: FLD1 A, Ex=332, Em=476

RetTime [min]	Type	Area LU *s	Amt/Area	Amount [ng/mL]	Grp	Name
3.623	PBA	3.46747e-1	3.24044	1.12361		OCRATOXINA

Injection Date : 03/10/03 14:48:27  
 Sample Name : 10e3-B Vial : 1  
 Acq. Operator : Luis Gustavo  
 Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OCRA.M  
 Last changed : 03/10/03 14:47:41 by Luis Gustavo  
 (modified after loading)  
 Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OCRA.M  
 Last changed : 03/10/03 14:54:42 by Luis Gustavo  
 (modified after loading)

Ocratoxina

coluna C18 -  
 fluxo 1 mL/min.  
 111



External Standard Report

Sorted By : Signal  
 Calib. Data Modified : 03/10/03 14:47:13  
 Multiplier : 1.0000  
 Dilution : 1.0000

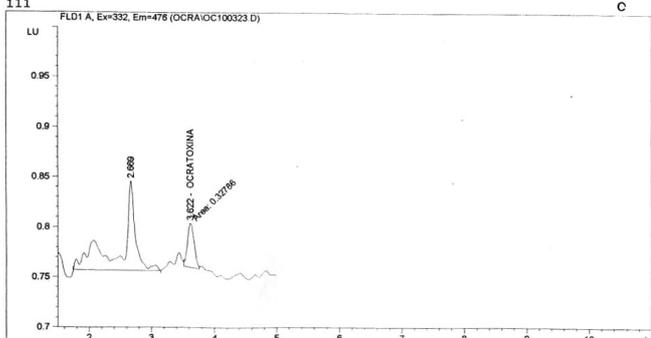
Signal 1: FLD1 A, Ex=332, Em=476

RetTime [min]	Type	Area LU *s	Amt/Area	Amount [ng/mL]	Grp	Name
3.629	MM	3.44025e-1	3.23675	1.11352		OCRATOXINA

Injection Date : 03/10/03 14:42:28  
 Sample Name : 10e3-C Vial : 1  
 Acq. Operator : Luis Gustavo  
 Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OCRA.M  
 Last changed : 03/10/03 14:47:13 by Luis Gustavo  
 (modified after loading)  
 Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OCRA.M  
 Last changed : 03/10/03 14:54:42 by Luis Gustavo  
 (modified after loading)

Ocratoxina

coluna C18 -  
 fluxo 1 mL/min.  
 111



External Standard Report

Sorted By : Signal  
 Calib. Data Modified : 03/10/03 14:47:13  
 Multiplier : 1.0000  
 Dilution : 1.0000

Signal 1: FLD1 A, Ex=332, Em=476

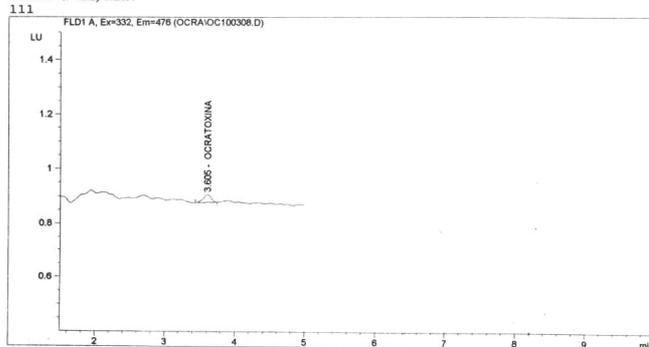
RetTime [min]	Type	Area LU *s	Amt/Area	Amount [ng/mL]	Grp	Name
3.622	MF	3.27860e-1	3.21354	1.05359		OCRATOXINA

b- Teste 2-Grãos de café verdes inoculados com  $10^3$  UFC/g da cepa 13b e *Aspergillus ochraceus* (amostras 10A, 10B e 10C = repetições).  
 continua...

Injection Date : 08/10/03 16:15:27  
 Sample Name : 10e4-A Vial : 1  
 Acq. Operator : Luis Gustavo  
 Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OCRA.M  
 Last changed : 03/10/03 16:11:05 by Luis Gustavo  
 (modified after loading)

Ocratoxina

coluna C18 -  
 fluxo 1 mL/min.



External Standard Report

Sorted By : Signal  
 Calib. Data Modified : 03/10/03 11:54:18  
 Multiplier : 1.0000  
 Dilution : 1.0000

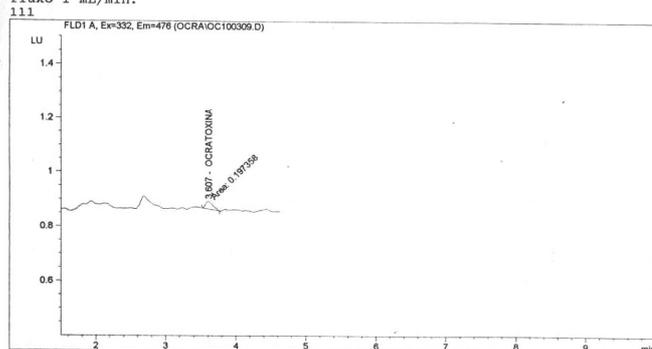
Signal 1: FLD1 A, Ex=332, Em=476

RetTime [min]	Type	Area LU *s	Amt/Area	Amount [ng/mL]	Grp	Name
3.605	PBA	2.15476e-1	2.95200	6.36086e-1		OCRATOXINA

Injection Date : 08/10/03 16:22:04  
 Sample Name : 10e4-B Vial : 1  
 Acq. Operator : Luis Gustavo  
 Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OCRA.M  
 Last changed : 03/10/03 16:11:05 by Luis Gustavo  
 (modified after loading)

Ocratoxina

coluna C18 -  
 fluxo 1 mL/min.



External Standard Report

Sorted By : Signal  
 Calib. Data Modified : 03/10/03 11:54:18  
 Multiplier : 1.0000  
 Dilution : 1.0000

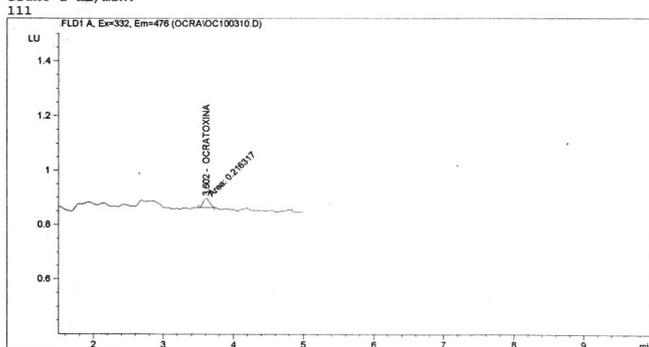
Signal 1: FLD1 A, Ex=332, Em=476

RetTime [min]	Type	Area LU *s	Amt/Area	Amount [ng/mL]	Grp	Name
3.607	MM	1.97358e-1	2.88126	5.68640e-1		OCRATOXINA

Injection Date : 08/10/03 16:09:21  
 Sample Name : 10e4-c Vial : 1  
 Acq. Operator : Luis Gustavo  
 Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OCRA.M  
 Last changed : 03/10/03 16:11:05 by Luis Gustavo  
 (modified after loading)

Ocratoxina

coluna C18 -  
 fluxo 1 mL/min.



External Standard Report

Sorted By : Signal  
 Calib. Data Modified : 03/10/03 11:54:18  
 Multiplier : 1.0000  
 Dilution : 1.0000

Signal 1: FLD1 A, Ex=332, Em=476

RetTime [min]	Type	Area LU *s	Amt/Area	Amount [ng/mL]	Grp	Name
3.602	MM	2.16317e-1	2.95499	6.39216e-1		OCRATOXINA

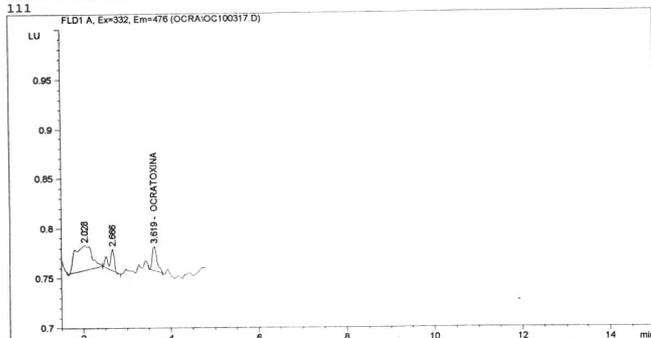
c- Teste 3-Grãos de café verdes inoculados com  $10^4$  UFC/g da cepa 13b e *Aspergillus ochraceus* (amostras 10A, 10B e 10C = repetições).

continua...

Injection Date : 08/10/03 15:05:31 Vial : 1  
 Sample Name : 10e5-A  
 Acq. Operator : Luis Gustavo  
 Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OCRA.M  
 Last changed : 03/10/03 14:51:56 by Luis Gustavo  
 (modified after loading)  
 Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OCRA.M  
 Last changed : 03/10/03 16:11:05 by Luis Gustavo  
 (modified after loading)

## Ocratoxina

coluna C18 -  
 fluxo 1 mL/min.  
 111



## External Standard Report

Sorted By : Signal  
 Calib. Data Modified : 03/10/03 14:47:13  
 Multiplier : 1.0000  
 Dilution : 1.0000

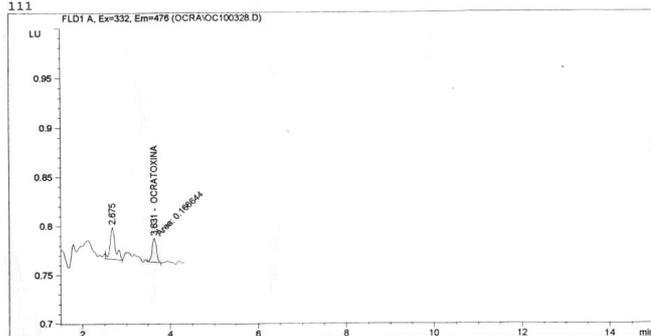
Signal 1: FLD1 A, Ex=332, Em=476

RetTime [min]	Type	LU	Area *s	Amt/Area	Amount [ng/mL]	Grp	Name
3.619	BBA		1.81150e-1	2.80580	5.08271e-1		OCRATOXINA

Injection Date : 08/10/03 16:30:01 Vial : 1  
 Sample Name : 10e5-b  
 Acq. Operator : Luis Gustavo  
 Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OCRA.M  
 Last changed : 03/10/03 16:11:05 by Luis Gustavo  
 (modified after loading)

## Ocratoxina

coluna C18 -  
 fluxo 1 mL/min.  
 111



## External Standard Report

Sorted By : Signal  
 Calib. Data Modified : 03/10/03 14:47:13  
 Multiplier : 1.0000  
 Dilution : 1.0000

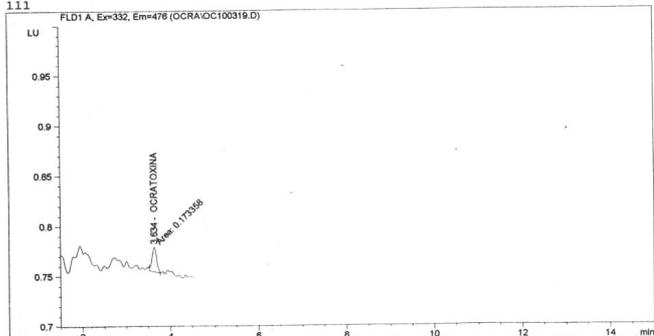
Signal 1: FLD1 A, Ex=332, Em=476

RetTime [min]	Type	LU	Area *s	Amt/Area	Amount [ng/mL]	Grp	Name
3.631	MM		1.66644e-1	2.72567	4.54218e-1		OCRATOXINA

Injection Date : 08/10/03 15:19:10 Vial : . 1  
 Sample Name : 10e5-C  
 Acq. Operator : Luis Gustavo  
 Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OCRA.M  
 Last changed : 03/10/03 15:11:09 by Luis Gustavo  
 (modified after loading)  
 Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OCRA.M  
 Last changed : 03/10/03 16:11:05 by Luis Gustavo  
 (modified after loading)

## Ocratoxina

coluna C18 -  
 fluxo 1 mL/min.  
 111



## External Standard Report

Sorted By : Signal  
 Calib. Data Modified : 03/10/03 14:47:13  
 Multiplier : 1.0000  
 Dilution : 1.0000

Signal 1: FLD1 A, Ex=332, Em=476

RetTime [min]	Type	LU	Area *s	Amt/Area	Amount [ng/mL]	Grp	Name
3.634	FM		1.73358e-1	2.76444	4.79237e-1		OCRATOXINA

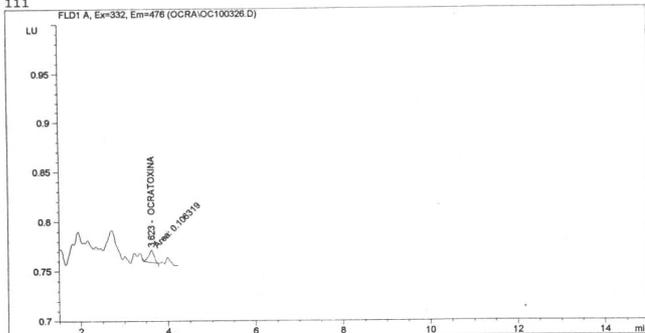
d- Teste 4-Grãos de café verdes inoculados com  $10^5$  UFC/g da cepa 13b e *Aspergillus ochraceus* (amostras 10A, 10B e 10C = repetições).

continua...

Injection Date : 08/10/03 15:26:22 Vial : 1  
 Sample Name : 10e6-A  
 Acq. Operator : Luis Gustavo  
 Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OCRA.M  
 Last changed : 03/10/03 15:11:09 by Luis Gustavo  
 (modified after loading)  
 Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OCRA.M  
 Last changed : 03/10/03 15:35:21 by Luis Gustavo  
 (modified after loading)

Ocratoxina

coluna C18 -  
 fluxo 1 mL/min.  
 111



External Standard Report

Sorted By : Signal  
 Calib. Data Modified : 03/10/03 14:47:13  
 Multiplier : 1.0000  
 Dilution : 1.0000

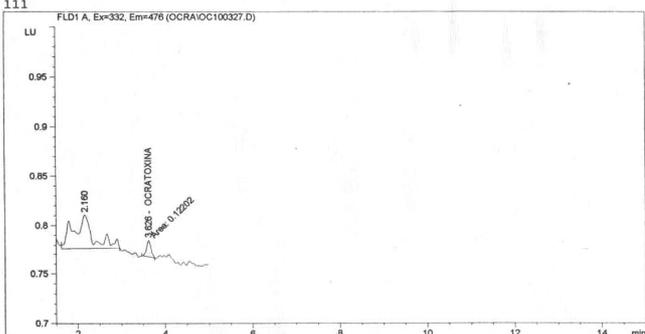
Signal 1: FLD1 A, Ex=332, Em=476

RetTime [min]	Type	Area LU	Area *s	Amt/Area	Amount [ng/mL]	Grp	Name
3.623	MM	1.06319e-1		2.15540	2.29161e-1		OCRATOXINA

Injection Date : 08/10/03 15:38:47 Vial : 1  
 Sample Name : 10e6-B  
 Acq. Operator : Luis Gustavo  
 Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OCRA.M  
 Last changed : 03/10/03 15:35:21 by Luis Gustavo  
 (modified after loading)

Ocratoxina

coluna C18 -  
 fluxo 1 mL/min.  
 111



External Standard Report

Sorted By : Signal  
 Calib. Data Modified : 03/10/03 14:47:13  
 Multiplier : 1.0000  
 Dilution : 1.0000

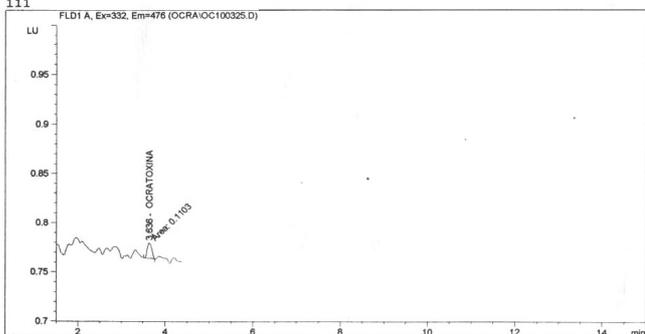
Signal 1: FLD1 A, Ex=332, Em=476

RetTime [min]	Type	Area LU	Area *s	Amt/Area	Amount [ng/mL]	Grp	Name
3.626	MM	1.22020e-1		2.35844	2.87779e-1		OCRATOXINA

Injection Date : 08/10/03 15:51:57 Vial : 1  
 Sample Name : 10e6-C  
 Acq. Operator : Luis Gustavo  
 Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OCRA.M  
 Last changed : 03/10/03 15:35:21 by Luis Gustavo  
 (modified after loading)

Ocratoxina

coluna C18 -  
 fluxo 1 mL/min.  
 111



External Standard Report

Sorted By : Signal  
 Calib. Data Modified : 03/10/03 14:47:13  
 Multiplier : 1.0000  
 Dilution : 1.0000

Signal 1: FLD1 A, Ex=332, Em=476

RetTime [min]	Type	Area LU	Area *s	Amt/Area	Amount [ng/mL]	Grp	Name
3.636	MM	1.10300e-1		2.21238	2.44026e-1		OCRATOXINA

e - Teste 5-Grãos de café verdes inoculados com  $10^6$  UFC/g da cepa 13b e *Aspergillus ochraceus* (amostras 10A, 10B e 10C = repetições).