

FUNGOS PRODUTORES DE OCRATOXINA E OCRATOXINA A EM CAFÉS BRASILEIROS

Marta Hiromi TANIWAKI¹, Beatriz Thie IAMANAKA¹ & Maria Carolina VICENTINI¹

1. Instituto de Tecnologia de Alimentos: mtaniwak@ital.org.br

RESUMO: Amostras de café (*Coffea arabica*) foram coletadas em três regiões do Estado de São Paulo. Os estágios de coleta foram: cerejas, passas e secos no solo e na planta, no terreiro e na tulha. Os grãos de cafés foram desinfetados superficialmente com 0,4% de solução de hipoclorito e transferidos para agar Dicloran 18% Glicerol (DG18), à 25°C por 5 a 7 dias. Os grãos de café de diferentes regiões apresentaram-se infectados por *Penicillium* spp., *Fusarium* spp., *Aspergillus niger* and *Aspergillus ochraceus*. A frequência de *Aspergillus ochraceus* foi menor em grãos da árvore e do solo, contudo no terreiro e na tulha houve um aumento desta espécie. *Aspergillus carbonarius* foi encontrado somente na região oeste do Estado de São Paulo. A maioria das cepas de *A. ochraceus* e *A. carbonarius* foi capaz de produzir ocratoxina A (OA). A análises para OA em todas as amostras de café apresentaram-se em níveis de não detectado (limite de detecção 0,2 µg/Kg) à 19.75 µg/Kg.

PALAVRAS CHAVE: café, ocratoxina, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus carbonarius*, fungos toxigênicos

ABSTRACT: Coffee samples (*C. arabica*) were collected from three region of São Paulo State. Coffee samples were collected at different stage of ripening and processing from soil and from trees, from the drying yard and from storage. Coffee beans were surface disinfected with 0.4% of chlorine (household bleach, diluted 1:10) and transferred on Dichloran 18% Glycerol Agar (DG18), at 25°C for 5-7 days. Coffee beans from different regions were infected with *Penicillium* spp., *Fusarium* spp., *Aspergillus niger* and *Aspergillus ochraceus*. The frequency of *Aspergillus ochraceus* was lower in beans from trees and soil, however from the drying yard and storage area, the presence of this species increased. *Aspergillus carbonarius* was found only in the west of São Paulo State. Most isolates of *A. ochraceus* and *A. carbonarius* were capable of producing OA. The presence of OA in coffee varied from non detected up to 19.75 µg/Kg.

KEY WORDS: Coffee, ochratoxin, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus carbonarius*, toxigenic fungi.

INTRODUÇÃO

O café é um produto agrícola de extrema importância econômica e social para o Brasil. A ocratoxina A, com potencial carcinogênico e nefrotóxico tem sido encontrada em algumas amostras de café provenientes do Brasil e esse fato tem despertado muito interesse, especialmente para os países que importam café do Brasil. Desta forma, este trabalho tem como objetivos principais isolar e identificar fungos produtores de ocratoxina A em café; determinar os fatores que influenciam a produção da toxina neste produto e avaliar a estabilidade desta toxina nas etapas de processamento do café.

MATERIAL & MÉTODOS

1 Coletas das amostras

As amostras foram coletadas no Estado de São Paulo, nas seguintes cidades: Parapuã, Piraju e Franca. As amostras foram coletadas em vários estágios da produção do café: cerejas na árvore, e no chão, passas na árvore e no chão, terreiro e tulha. As amostras foram coletadas em triplicata, tendo cada uma peso médio de 1kg. Foram coletadas aproximadamente 50 amostras por fazenda visitada, sendo que neste período foram visitadas 9 fazendas.

2 Isolamento da microbiota fúngica

Aproximadamente 50g de cada amostra foram desinfectadas pela imersão em solução de hipoclorito 0.4% durante 1 minuto e 50 grãos foram plaqueados em meio de cultura agar Dicloran Glicerol 18% (DG18) com cloranfenicol. A incubação foi à 25°C por 5 a 7 dias. Os resultados foram expressos em porcentagem de sementes infectadas conforme a metodologia de PITT & HOCKING (1997).

3 Identificação dos fungos isolados

As cepas do gênero *Aspergillus* foram isoladas em agar Extrato de Malte (MEA), incubadas por 7 dias à 25°C e identificadas de acordo com a chave de identificação de *Aspergillus* proposta por KLICH & PITT (1988).

4 Avaliação do potencial de produção de ocratoxina A

As espécies de *Aspergillus ochraceus* e *Aspergillus carbonarius* e *Aspergillus niger* foram testadas quanto à produção de ocratoxina A em meio extrato de levedura sacarose (YESA) e extraídas pela técnica do ágar plug (FILTENBORG *et al.*, 1983) e pela extração com clorofórmio, conforme TANIWAKI, (1995). Os extratos fúngicos foram aplicados em placas de cromatografia de camada delgada, utilizando o sistema de solventes tolueno:acetato de etila: ácido fórmico 90% (5:4:1, SCOTT *et al.*, 1970) e observadas à luz ultravioleta de 365 nm, comparando-se qualitativamente com padrões de ocratoxina A.

5 Análise de ocratoxina em café

As amostras de cafés foram analisadas quanto a presença de ocratoxina A, conforme a metodologia desenvolvida por PITTET *et al.* (1996) que utiliza a coluna de imunoafinidade proposta por NAKAJIMA *et al.* (1990). Após vários testes realizados, ele foi aceito como padrão em todas as análises realizadas neste estudo. A ocratoxina A foi quantificada por HPLC fase reversa com detecção de fluorescência. O limite de detecção do método foi de 0,2 µg/Kg para café verde

RESULTADOS

A ocorrência de fungos produtores de ocratoxina em café foi: 2 a 4% de *A. ochraceus* e 2 a 12% de *A. carbonarius* na região de Parapuã. Na região de Franca a ocorrência foi em torno de 2% de *A. ochraceus* e em Pirajú de 2 a 10% de *A. ochraceus*. A frequência destas espécies foi maior no terreiro e na tulha, provavelmente porque estes fungos são xerofílicos e desenvolvem-se quando a umidade do café é menor. Somente na região de Parapuã foi detectada a presença de *A. carbonarius* produtor de ocratoxina A e esta espécie foi isolada pela primeira vez em café no Brasil. Heenan *et al.*, (1998) verificaram que 82% das cepas de *A. carbonarius* e 2% de cepas de *A. niger*, isoladas de passas de uvas da Austrália e do oriente médio foram produtoras de ocratoxina A. Estas duas espécies são do gênero *Aspergillus* e possuem esporos negros que são, facilmente, confundidas. As cepas de *A. niger* isoladas no presente trabalho não apresentaram potencial para produção de ocratoxina nas condições testadas. Os outros gêneros e espécies, frequentemente, encontrados foram: *Cladosporium spp.*, *Penicillium spp.*, *Fusarium spp.*, *Mucor spp.*, *Aspergillus niger*, leveduras e outros, estes dados confirmam os resultados obtidos por MISLEVIC *et al.* (1983) e TANIWAKI *et al.*, (1998) que isolaram estes gêneros e espécies no café. Os níveis de ocratoxina A situaram-se entre não detectado (menor que 0,2 µg/Kg) a 19,75 µg/Kg. Na maioria das amostras não foi detectada a presença de ocratoxina A.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos até o momento revelaram que a presença de fungos potencialmente produtores de ocratoxina A podem ocorrer em café, principalmente na fase de secagem em terreiro e tulha. Embora o café não parece ser um substrato ideal para a produção desta toxina, a presença destes fungos é um fator de risco considerando que em condições favoráveis de umidade e temperatura poderá ocorrer a produção de ocratoxina A.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

FILTENBORG, O; FRISVAD, J.C. & SVENDSEN, J.A. Simple screening method for molds producing intracellular mycotoxins in pure cultures **Applied and Environmental Microbiology**, v.45, p. 581-585, 1983.

- Heenan, C.N., K. J. Shaw, J.I. Pitt. Ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* isolates and detection using coconut cream agar. **Journal of Food Mycology**; v.1, p.67-72, 1998.
- KLICH, M.A. & PITT, J.I. **A Laboratory Guide to Common *Aspergillus* Species and their Teleomorphs**. North Ryde. N.S. W.: CSIRO Division of Food Science and Technology, 1988.
- Mislivec, P.B., R. B. Verneal and R. Gibson. Incidence of toxigenic and other molds in green coffee beans. **Journal of Food Protection**, v. 46, p. 969-973, 1983.
- NAKAJIMA, M.; TEREWDA, H.; HISADA, K.; TSUBOUCHI, H.; YAMAMOTO, K.; UDA, T.; ITOH, Y.; KAWAMURA, O.; & UENO, Y. Determination of ochratoxin A in coffee beans and coffee products by monoclonal antibody affinity chromatography. **Food and Agricultural Immunology**, v.2, p.189-195, 1990.
- PITT, J.I. & HOCKING, A.D. **Fungi and Food Spoilage**. London:Blackie Academic & Professional, 593p, 1997.
- PITTET, A.; TORNARE, D.; HUGGETT, A. & VIANI, R. Liquid chromatographic determination of ochratoxin A in pure and adulterated soluble coffee using an immunoaffinity column cleanup procedure. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v.44, p.3564-3569, 1996.
- SCOTT, P.M.; LAWRENCE, J.W. & Van WALBEEK, W. Detection of mycotoxins by thin-layer chromatography: application to screening of fungal extracts. **Applied Microbiology**, v.20, p.839-842, 1970.
- TANIWAKI, M.H. **Growth and Mycotoxin Production by Fungi under Modified Atmospheres**. Ph.D. Thesis, University of New South Wales, Australia, 1995.
- TANIWAKI, M.H.; BANHE, A.A. & IAMANAKA, B.T. Fungos produtores de ocratoxina em café. **Resumo do IX Encontro Nacional de Micotoxinas & I Simpósio em Armazenagem Qualitativa de Grãos do Mercosul**, Florianópolis, SC, p. 107, 1998.

AVISO

ESTA PUBLICAÇÃO PODE SER ADQUIRIDA NOS
SEGUINTE ENDEREÇOS:

FUNDAÇÃO ARTHUR BERNARDES

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

EMBRAPA CAFÉ

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