

LILIANE EVANGELISTA VISÓTO

PRODUÇÃO DE OCRATOXINA A POR FUNGOS ISOLADOS DE GRÃOS DE  
CAFÉ E POR FUNGOS PRODUTORES DE PECTINASES

Tese apresentada à Universidade  
Federal de Viçosa, como parte das  
exigências do Programa de Pós-  
graduação em Microbiologia  
Agrícola, para obtenção do título de  
*Magister Scientiae*

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2003

LILIANE EVANGELISTA VISÔTTO

PRODUÇÃO DE OCRATOXINA A POR FUNGOS ISOLADOS DE GRÃOS DE  
CAFÉ E POR FUNGOS PRODUTORES DE PECTINASES

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 25 de abril de 2003

---

Prof. Jorge L. Cavalcante Coelho

---

Prof<sup>a</sup> Célia Alencar de Moraes

---

Dr<sup>a</sup> Virgínia Maria Chaves-Alves  
(Conselheira)

---

Prof<sup>a</sup> Maria Cristina D. Vanetti  
(Conselheira)

---

Prof. Maurício Dutra Costa  
(Orientador)

A Deus,  
Aos meus pais Claret e Zetti,  
Aos meus irmãos Leandro, Junior e Tatiane.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus pela proteção e força constante.

A minha família pelo carinho, compreensão, apoio e dedicação que tornaram possível essa conquista.

À Universidade Federal de Viçosa e em particular ao Departamento de Microbiologia, pela oportunidade de realizar o curso.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo.

Ao meu Orientador Jorge Luiz Cavalcante Coelho, pela compreensão, carinho, orientação e ensinamentos.

Ao meu outro Orientador Maurício Dutra Costa, pela paciência, ensinamentos e grande ajuda na finalização da tese.

À Dr<sup>a</sup> Virgínia Maria Chaves-Alves, pelas sugestões e apoio nos experimentos, que foram de enorme importância para a realização desse trabalho.

As Professoras Maria Cristina Dantas Vanetti e Célia Alencar de Moraes, pelas valiosas sugestões. Aos demais professores pelo conhecimento transmitido.

Ao Olinto e a estagiária Lígia, pela ajuda indispensável.

Aos Funcionários do Departamento de Microbiologia, Nilcéia, Laura, Aparecida, Danilo, Evandro, Paulo, Antônio, pela ajuda sempre que necessária.

Aos amigos de mestrado, Alex Botu, André Querido, Tereza, Agenor, Néia, Webel, João, Lú, Francis, Dani, Akihiko, Regiane, pelo companheirismo nas horas de desespero, alegrias e pelos ótimos momentos pós-provas.

A três pessoas indispensáveis para minha vida, Handiara, Dani e Ricardo, pela amizade, pelas palavras incentivadoras e pela presença sempre constante.

À minha grande amiga Denise, pela paciência, amizade, incentivos e pela agradável e insubstituível companhia.

E finalmente a mim pela persistência e a todas as pessoas que indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho.

## **BIOGRAFIA**

LILIANE EVANGELISTA VISÔTTO, filha de Antônio Claret Visôtto e Maria Donizetti Evangelista Visôtto, nasceu em Itajubá, no Estado de Minas Gerais, no dia 6 de julho de 1976.

Em agosto de 1995, iniciou o curso de Farmácia e Bioquímica na Universidade Federal de Juiz de Fora, MG, graduando-se em agosto de 2000.

Em abril de 2001, iniciou o curso de Mestrado em Microbiologia Agrícola, na Universidade Federal de Viçosa, MG.

## CONTEÚDO

RESUMO .....	viii
ABSTRACT .....	x
1- INTRODUÇÃO .....	1
2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	3
3- MATERIAL E MÉTODOS .....	14
3.1- Isolamento da microbiota fúngica de grãos de café .....	14
3.2- Produção de ocratoxina A por fungos filamentosos isolados de grãos de café .....	15
3.2.1- Manutenção de culturas, obtenção de suspensão de esporos e condições de cultivo .....	15
3.2.2- Extração de ocratoxina A .....	16
3.2.3- Cromatografia de camada delgada .....	16
3.2.4- Cromatografia líquida de alta eficiência .....	17
3.3- Identificação dos fungos produtores de ocratoxina A presentes nos grãos de café .....	17
3.4- Produção de ocratoxina A por <i>Aspergillus ochraceus</i> .....	17
3.5- Detecção de ocratoxina A em amostras de café torrado e moído e café solúvel .....	18
3.5.1- Amostras .....	18

3.5.2- Extração e determinação de ocratoxina A .....	18
3.6- Produção de ocratoxina A simultaneamente à produção de poligalacturonase e pectina liase por fungos pectinolíticos ....	19
3.6.1- Ensaio enzimático .....	19
4- RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	21
4.1- Isolamento da microbiota fúngica de grãos de café .....	21
4.2- Produção de ocratoxina A por fungos filamentosos isolados do café .....	23
4.3- Produção de ocratoxina A por <i>Aspergillus ochraceus</i> .....	27
4.4- Detecção de ocratoxina A em amostra de café torrado e moído e de café solúvel .....	32
4.5- Produção de ocratoxina A simultaneamente à produção de poligalacturonase e pectina liase por fungos pectinolíticos ....	33
5- RESUMO E CONCLUSÕES .....	36
6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	38



## RESUMO

VISÔTTO, Liliâne Evangelista, M.S., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2003. **Produção de ocratoxina A por fungos isolados de grãos de café e por fungos produtores de pectinases.** Orientador: Maurício Dutra Costa. Conselheiras: Maria Cristina Dantas Vanetti e Virgínia Maria Chaves-Alves.

Avaliou-se a produção de ocratoxina A por fungos filamentosos isolados de grãos de café e por fungos produtores de pectinases. Cinquenta e seis fungos filamentosos foram isolados dos grãos de café, compreendendo grande variedade de gêneros, dentre os quais o *Penicillium* foi predominante. Dentre os isolados obtidos, apenas um, identificado como *Aspergillus ochraceus*, foi capaz de produzir ocratoxina A. *Aspergillus ochraceus* foi, então, cultivado nos meios de cultura Czapek Dox modificado, extrato de levedura e meio de coco, a 25°C, por 120 horas, com agitação e sem agitação. Constatou-se que a produção de ocratoxina A ocorreu quando o isolado *A. ochraceus* foi cultivado em caldo Czapek Dox modificado e em caldo extrato de levedura, sem agitação. A ocratoxina A não foi detectada nos cultivos sob agitação. A toxina foi identificada por cromatografia de camada delgada e confirmada pela cromatografia líquida de alta eficiência. A ocratoxina A não foi detectada nos sobrenadantes das culturas dos fungos pectinolíticos *Aspergillus niger*, *Penicillium expansum*, *Penicillium griseoroseum* e *Penicillium italicum*, cultivados nos meios minerais tamponados e não-tamponados,

suplementados com pectina cítrica como única fonte de carbono, a 25°C, por 120 horas, com agitação. As atividades das enzimas pectinolíticas foram determinadas nessas condições de cultivo e variaram de 25,51 a 61,31  $\mu\text{mol mL}^{-1} \text{min}^{-1}$ , para poligalacturonase e 9,79 a 34,5  $\text{nmol mL}^{-1} \text{min}^{-1}$ , para pectina liase.

## ABSTRACT

VISÔTTO, Liliane Evangelista, M.S., Universidade Federal de Viçosa, April, 2003.  
**Ochratoxin A production by fungi isolated from coffee beans and by pectinolytic fungi.** Advisor: Maurício Dutra Costa. Committee members: Maria Cristina Dantas Vanetti and Virgínia Maria Chaves-Alves.

In this work, the production of ochratoxin A by filamentous fungi isolated from coffee beans and by pectinolytic fungi was evaluated. Fifty-six isolates were obtained from coffee beans, representing a wide variety of fungal genera within which *Penicillium* was the predominant one. Among all isolates, only one, identified as *Aspergillus ochraceus*, was able to produce ochratoxin A. This fungus was then cultivated in modified Czapek Dox, yeast extract broth, and grated coconut medium, at 25°C for 120 hours, with or without shaking. When grown in modified Czapek medium and yeast extract broth, without shaking, *A. ochraceus* produced ochratoxin A in detectable levels by thin layer chromatography and confirmed by high performance liquid chromatography. Ochratoxin A was not detected in the supernatant of the cultures of the pectinolytic fungi *Aspergillus niger*, *Penicillium expansum*, *Penicillium griseoroseum*, and *Penicillium italicum* cultivated in buffered and unbuffered mineral media, supplemented with citric pectin as the sole carbon source, at 25°C for 120 hours. The activities of pectinolytic enzymes were determined under these cultivation conditions and varied from 9.79 to 34.5 nmol mL<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>, for pectin lyase, and from 25.51 to 61.31 μmol mL<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>, for polygalacturonase.

## 1. INTRODUÇÃO

Fungos toxigênicos são amplamente encontrados na natureza e, em condições favoráveis, são capazes de produzir metabólitos secundários tóxicos para o homem e animais. A ocratoxina A é uma micotoxina presente principalmente em cereais, embora também seja encontrada em frutas secas, vinhos, cervejas, café, grãos armazenados e outros. Devido à sua estabilidade química e à longa meia-vida em tecidos de mamíferos, pode ser encontrada também em carne de animais. A ocratoxina A é um contaminante nefrotóxico, carcinogênico e teratogênico. O Comitê Especializado em Aditivos Alimentares (Joint Expert Committee on Food Additives), órgão internacional encarregado de avaliar os riscos causados à saúde humana por aditivos químicos e contaminantes em alimentos, estabeleceu o limite de 16 ng/Kg de peso corpóreo como ingestão semanal tolerável de ocratoxina A.

O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de café, detendo cerca de 38% do mercado exportador (FAO, 2001). A estimativa da safra 2002/03 é de 44,69 milhões de sacas (Anuário Estatístico do Café, 2003). Em 2001, segundo a associação brasileira de exportadores de café (ABECAFE) foram exportadas 23,4 milhões de sacas, correspondendo a 2,43% das exportações brasileiras. Contudo barreiras comerciais ameaçam esse quadro. Em diversos países, como Grécia, Itália, Hungria, Finlândia e Uruguai, já vigoram limites máximos para ocratoxina A em café.

Algumas bactérias e fungos produzem enzimas pectinolíticas com potencial de uso na indústria têxtil. Enzimas pectinolíticas são, também, empregadas na indústria alimentícia, na produção de sucos e vinhos. Nesse caso, é de interesse que os preparados enzimáticos sejam isentos de micotoxinas, incluindo a ocratoxina A.

O presente trabalho teve como objetivo verificar a presença de fungos produtores de ocratoxina A em grãos de café e avaliar se alguns dos fungos pectinolíticos são capazes de produzir essa toxina nas mesmas condições de produção das enzimas poligalacturonase e pectina liase. Adicionalmente, foi pesquisada a presença da toxina em cafés torrados e moídos produzidos e comercializados na região da Zona da Mata de Minas Gerais e em cafés solúveis.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Micotoxinas são metabólitos secundários resultantes do metabolismo de alguns fungos filamentosos que proliferam em alimentos, em rações animais e, principalmente, em grãos. Como contaminantes tóxicos, despertam grandes preocupações desde 1960, sendo reconhecidas como potencial ameaça para a saúde humana e animal, além de provocarem perdas econômicas devido à deterioração de alimentos (BETINA, 1984).

A intoxicação pode ocorrer de forma direta ou indireta. A forma direta ocorre quando o produto é utilizado na alimentação humana ou de animais, enquanto a forma indireta resulta quando subprodutos de derivados contaminados são empregados (SILVA, 2001).

A ocratoxina A foi detectada pela primeira vez em grãos de sorgo contaminados com *Aspergillus ochraceus* K-804 por SCOTT em 1965 (BETINA, 1984). A primeira espécie de *Penicillium* produtor de ocratoxina A foi estudada por VAN WALBEEK, em 1969, e identificada como *Penicillium viridicatum*.

Os fatores que regulam o crescimento e a produção de ocratoxina A são a atividade de água ( $a_w$ ), a composição química do substrato e a temperatura (JOOSTEN et al., 2001). Grandes quantidades de ocratoxina A podem ser produzidas à umidade relativa de 100% e temperatura de 25°C. Decréscimos na produção de ocratoxina A ocorrem à medida que se reduz a  $a_w$ , embora o crescimento fúngico não seja inibido nessas condições.

A ocratoxina A tem sido encontrada em grande variedade de alimentos e rações, a maioria proveniente de países de clima temperado. Para o homem, as principais fontes da toxina são o milho, o café, os cereais, as frutas secas, os vinhos, a cerveja e a carne de animais contaminados (STUDER-ROHR et al., 1995). A ocratoxina é também encontrada no trigo, no centeio, na aveia, na cevada e em muitos outros produtos agrícolas. A avaliação microbiológica desses produtos evidencia a presença do *A. ochraceus*, *A. niger*, *Aspergillus glaucus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus candidus* e muitas espécies de *Penicillium* (LEVI et al., 1974).

Nas regiões tropicais e semitropicais, *A. ochraceus* e outras espécies do gênero *Aspergillus* são os produtores de ocratoxina de maior significância. Já nas regiões temperadas, particularmente no Canadá, na Dinamarca e na Suécia, há predominância do *P. viridicatum* [Quadro 1] (BETINA, 1984).

*Aspergillus ochraceus* cresce a temperaturas de 8 a 37°C, com ótimo entre 24 e 37°C (SWEENEY e DOBSON, 1998). Já a produção de ocratoxina A ocorre entre 12 e 37°C. O pH ótimo de crescimento varia de 3 a 10, enquanto a  $a_w$  ótima para o crescimento e a produção de ocratoxina A são semelhantes, variando de 0,95 a 0,99. No entanto, *A. ochraceus* é um organismo xerofílico capaz de crescer a valores de  $a_w$  menores do que 0,77 (SWEENEY e DOBSON, 1998).

Há mais de um tipo de ocratoxina. Em geral, são derivadas de isocumarina ligada a uma amida. Esta, por sua vez, está unida a um grupo  $\beta$ -fenilalanina [Figura 1] (MOSS, 1996a). As ocratoxinas são formadas por uma combinação de vias metabólicas. O grupo isocumarínico é um pentacetídeo formado por acetato e malonato por meio da via dos poliacetídeos. A porção heterocíclica das ocratoxinas é semelhante ao metabólito fúngico meleína. O átomo de cloro é incorporado à estrutura do pentacetídeo por meio da ação de uma cloroperoxidase. Uma unidade de um carbono é acrescentada ao grupo carboxílico do carbono 8. A L-fenilalanina, derivada da via do ácido shiquímico, é unida a esse grupo carboxílico adicional. O grupo pentacetídeo da ocratoxina, pode, também, dar origem à citrinina, outra micotoxina (SWEENEY e DOBSON, 1998).

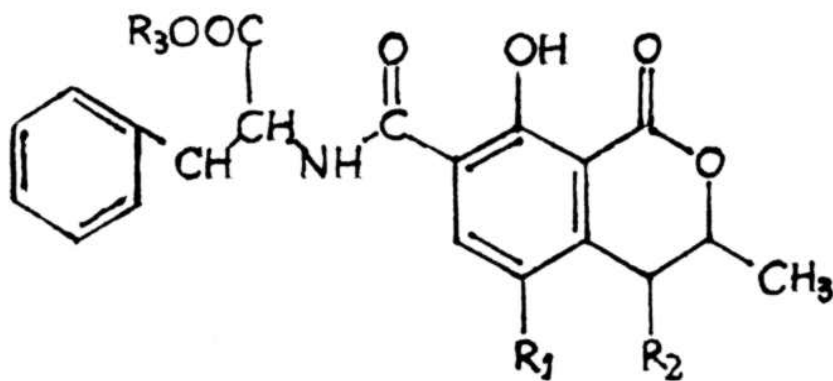
**QUADRO 1-** Espécies fúngicas produtoras de ocratoxina A (BETINA,1984)

---

<b>Espécies de fungos produtoras de ocratoxina</b>	
<i>Aspergillus alliaceus</i>	<i>Penicillium palitans</i>
<i>Aspergillus carbonarius</i>	<i>Penicillium commune</i>
<i>Aspergillus melleus</i>	<i>Penicillium purpurencens</i>
<i>Aspergillus ostianus</i>	<i>Penicillium verrucosum</i>
<i>Aspergillus petrakii</i>	<i>Penicillium variable</i>
<i>Aspergillus sclerotiorum</i>	<i>Penicillium cyclopium</i>
<i>Aspergillus sulphureus</i>	<i>Penicillium chrysogenum</i>
<i>Aspergillus ochraceus</i>	<i>Penicillium viridicatum</i>
<i>Aspergillus glaucus</i>	
<i>Aspergillus. candidus</i>	

---





	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
Ocratoxina A	Cl	H	H
Ocratoxina B	H	H	H
Éster etílico da ocratoxina A (ocratoxina C)	Cl	H	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
Éster metílico da ocratoxina A	Cl	H	CH <sub>3</sub>
Éster etílico da ocratoxina B	H	H	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
Éster metílico da ocratoxina B	H	H	CH <sub>3</sub>
4 hidroxio-ocratoxina A	Cl	OH	H

**FIGURA 1-** Estrutura química das ocratoxinas, segundo MOSS (1996b)

A ocratoxina A é um composto cristalino, mais tóxico do que as outras ocratoxinas (USNTP,1991). Sugere-se que um grupo fenólico livre é o responsável pelos seus efeitos tóxicos. A massa molecular da ocratoxina A é de 403,84. O composto é solúvel em solventes orgânicos e pouco solúvel em água (< 1 mg/mL). Seu ponto de fusão é de 169°C e apresenta forte emissão de fluorescência quando exposta à luz ultravioleta (verde, quando em soluções ácidas, e azul, em soluções alcalinas). Os máximos de absorção, quando dissolvida em ácido acético/benzeno (1:99) ou etanol a 95%, ocorrem a 332 e 333 nm e sua absorvidade molar apresenta os valores de 5550 e 6300 L cm<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>, nesses dois comprimentos de onda, respectivamente.

A ocratoxina A é considerada tóxica por ser carcinogênica, teratogênica e genotóxica em animais de experimentação, sendo os rins o principal alvo de sua atividade. O fígado também pode sofrer danos quando exposto a altas concentrações da toxina (BUSBY e WOGAN, 1981). O efeito carcinogênico da ocratoxina A já foi confirmado em animais (Programa Nacional de Toxicologia dos Estados Unidos, 1989). Quando essa substância é administrada a ratos, ocorre aumento da incidência de adenomas incomuns e carcinomas nas células tubulares. São observados também, alguns carcinomas hepatocelulares em fêmeas de ratos e alterações não-neoplásicas, que incluem hiperplasia, proliferação celular e necrose do epitélio renal.

A ocratoxina A tem efeito direto sobre a tradução, durante a síntese protéica. Atua por inibição competitiva com a fenilalanina-tRNA sintetase, com a conseqüente interrupção do alongamento dos peptídeos. Nessa reação, a ocratoxina A pode ser considerada análogo da fenilalanina e, em culturas de células, a inibição competitiva pode ser revertida com o aumento da concentração desse aminoácido (DIRHEIMER, 1996). A ocratoxina A pode, também, agir sobre outras enzimas que utilizam a fenilalanina como substrato, embora nenhum efeito direto sobre a atividade de outros sistemas enzimáticos tenha sido demonstrado (CREPPY et al., 1983).

Suspeita-se que os radicais superóxido e peróxido são responsáveis, em parte, pelos efeitos da toxina "in vivo". Destarte, as enzimas superóxido

dismutase e catalase podem mitigar os efeitos da nefrotoxicidade da ocratoxina pela remoção desses radicais ativos (BAUDRIMONT et al., 1994).

Não existem dados disponíveis sobre os efeitos da toxina no homem (SCHLATTER et al., 1996). A incidência de tumores uroteliais e a mortalidade por eles causada têm sido correlacionadas com a distribuição geográfica da nefropatia endêmica dos Bálcãs, na Bulgária, Iugoslávia e Romênia (RADOVANOVIC, 1989). Frequência relativamente alta de contaminação de cereais e pães com ocratoxina A foi encontrada nessas áreas, correlacionando-se com a presença da toxina no sangue dos habitantes e com a ocorrência da nefropatia endêmica (PLESTINA, 1996). Essa doença renal crônica atinge indivíduos adultos, sendo caracterizada por lesões bilaterais no córtex renal e fibrose difusa sem inflamação, conseqüente da falha renal, que pode levar à morte (RADOVANOVIC, 1989). Não existe fase aguda. Os primeiros sinais e sintomas são inespecíficos, consistindo de cansaço, cefaléias, perda de peso e palidez. Com o passar do tempo, ocorre proteinúria leve, anemia aplásica e normocrômica, com ausência de hipertensão (RADONIC et al., 1966; VUKELIC et al., 1992).

Os dados obtidos a partir de animais de laboratório não são suficientes para se determinar o grau de carcinogenicidade da ocratoxina A no homem e, por esta razão, a toxina é classificada como possível carcinógeno (grupo B) (AGENCIA DE PESQUISA INTERNACIONAL DO CÂNCER, 1993). Baseado na meia-vida da ocratoxina A no homem, estimada em 35 dias, calcula-se que a média de ingestão diária tolerável seja de 0,1ng/Kg de peso corpóreo (SCHLATTER et al., 1996). Os limites de ingestão toleráveis estabelecidos pela União Européia são variáveis de acordo com o produto (Quadro 2).

A despeito da inexistência de pesquisas conclusivas sobre o assunto, alguns países já aprovaram regulamentos próprios para os limites máximos de ocratoxina A em café verde. Os limites máximos para ocratoxina A sugeridos em diversos países variam de 1 a 5 ng/g para alimentos infantis, 2 a 50 ng/g para cereais e 5 a 300 ng/g para rações (VAN EGMOND, 1996). No Brasil, não há limite determinado como aceitável para ocratoxina A em qualquer alimento ou ração.

**QUADRO 2-** Ingestão de ocratoxina A (OTA) de acordo com dados da União Européia (CHAVES, 2003)  
(WHO- Codex Alimentarius Commission CX/FAC 99/14)

Alimento	Alimento Consumo diário (g/dia)	OTA Ingestão diária (ng/Kg/pc <sup>1</sup> )	% da TDI <sup>2</sup> Nórdica (5 ng/Kg/pc <sup>1</sup> )	% da TDI <sup>2</sup> JECFA <sup>3</sup> (14ng/Kg/pc <sup>1</sup> )	% de Ingestão total
Cereais	226	1,90	38	14	54
Vinho Tinto	171	0,54	11	3,9	15
<b>Café</b>	<b>29</b>	<b>0,43</b>	<b>8,6</b>	<b>3,1</b>	<b>12</b>
Cerveja	234	0,27	5,4	1,9	7,6
Carne Suína	76	0,13	2,6	0,9	3,7
Uva Passa	2,3	0,11	2,2	0,8	3,1
Especiarias	0,5	0,09	1,8	0,6	2,6
Carne de Frango	53	0,03	0,6	0,2	0,9
Sementes/Frutos	12	0,02	0,4	0,1	0,6
Suco de uva	(50)	(0,8)	(16)	(5,7)	(19)
TOTAL		3,5	70	25	

1/ pc = peso corpóreo

2/ TDI = ingestão diária tolerável

3/ JECFA = União de Comitês Especializados em Aditivos Alimentares

Como outros produtos, os grãos de café estão sujeitos à contaminação e, conseqüentemente, à colonização por microrganismos durante diferentes fases de desenvolvimento, colheita, processamento, transporte e estocagem (BATISTA et al., 2003). A atividade microbiana prejudicial à qualidade e à segurança do produto final depende das condições ambientais e do processamento do produto. Análises microbiológicas de grãos de café demonstram que os principais gêneros fúngicos toxigênicos (*Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*) são contaminantes naturais e estão presentes desde o campo até o armazenamento (MISLIVEC et al., 1983; SILVA et al., 2000; JOOSTEN et al., 2001; TANIWAKI et al., 2003). Outros microrganismos comumente encontrados são, *Cladosporium*, *Rhizopus*, *Alternaria* e leveduras, principalmente em café seco, no terreiro (BITANCOURT, 1957).

O predomínio de *Aspergillus* e de algumas espécies do gênero *Penicillium* ocorre devido ao caráter xerofílico desses microrganismos, os quais conseguem se adaptar às condições de baixa umidade dos grãos (BATISTA et al., 2001).

Estudos realizados nos Estados Unidos com grãos de café verde demonstraram que o *A. ochraceus* estava presente na maioria das amostras, mas a presença de ocratoxina A não foi observada com freqüência. Observou-se que, quando o café era inoculado com *A. ochraceus* e mantido em condições favoráveis à produção da toxina, a quantidade de ocratoxina A produzida era menor do que a encontrada em arroz e trigo (LEVI et al., 1974).

No Japão, foram analisadas 68 amostras de café torrado e moído comercializado na cidade de Nagoya (TSUBOUCHI et al., 1988). Desse total, cinco amostras estavam contaminadas com ocratoxina A. Essa foi a primeira vez em que a toxina foi detectada em amostras de café torrado e moído comercializadas.

Dentre 25 amostras de café verde comercializadas na Suíça, 13 continham a ocratoxina A em concentrações de 0,9 a 50 ng/g (STUDER-ROHR et al., 1995). A toxina foi, também, detectada em amostras de café coado, em concentrações que variaram de 0,4 a 7,8 ng/g do café moído (STUDER-ROHR et al., 1995). A presença da toxina foi ainda detectada em

77% das amostras de café solúvel procedentes de diversos países e analisadas por PITTET et al. (1996), com concentrações variáveis de 0,2 a 6,5 ng/g.

Trinta e quatro amostras de café torrado e 14 amostras de café instantâneo foram analisadas na cidade de Campinas (LEONI et al., 2000). A presença de ocratoxina A foi detectada em 23 amostras de café torrado, em concentrações que variaram de 0,3 a 6,5 ng/g. Todas as amostras de café instantâneo continham ocratoxina A em concentrações de 0,5 a 5,1 ng/g. Em Belo Horizonte, 10 marcas comerciais de café solúvel e 47 de café torrado e moído analisadas apresentavam quantidades de ocratoxina A de 0,31 e 1,78 ng/g, respectivamente (PRADO et al., 2000).

Existe uma inconsistência de dados na literatura com relação à estabilidade da ocratoxina A durante a torrefação do café. O trabalho realizado por LEVI et al. (1974) simulou condições de torrefação de café contaminado artificialmente com ocratoxina A em laboratório e relatou perdas que variaram entre 78,6 a 93,3%. Amostras naturalmente contaminadas com ocratoxina A (3,8 e 23 ng/g) foram torradas e, após a torrefação, a toxina não foi detectada (CANTAFORA et al., 1983).

No entanto, outros estudos demonstram que a ocratoxina A resiste à torrefação. As perdas de ocratoxina A variaram de 0 a 12%, para amostras de café artificialmente contaminadas e submetidas a tratamento térmico a 200°C por 10 a 20 minutos. Quase a totalidade da toxina passa para o extrato durante o preparo da bebida com água fervente (TSUBOUCHI et al., 1987).

Os diferentes modos de adição da toxina na amostra podem influenciar os resultados, assim como a utilização de métodos analíticos pouco sensíveis (TSUBOUCHI et al., 1987). Amostras de café preparadas no comércio podem conter ocratoxina A na faixa de 0,4 a 7,8 ng/g de café (STUDER-ROHR et al., 1995). Cerca de 80% da toxina residual no café torrado é transferido para a água fervente da extração e na fase de evaporação do extrato, para a manufatura do café solúvel (BLANC et al., 1998).

O controle do *A. ochraceus* em grãos armazenados consiste na adoção de métodos convencionais de prevenção de fungos em alimentos secos. Os

grãos devem ser secos com rapidez e uniformidade e mantidos nessa condição. A umidade dos grãos deve ser reduzida para que se alcance uma  $a_w$  abaixo de 0,8 a fim de se evitar a produção da toxina. Outras medidas efetivas para o armazenamento dos grãos incluem práticas de fumigação, separação dos grãos, aeração, resfriamento, armazenagem hermética e uso de atmosfera controlada, especialmente em regiões tropicais e subtropicais onde os danos provocados por microrganismos são problemáticos (CHAVES, 2002).

Além da produção de micotoxinas, a presença de microrganismos nos grãos de café acarreta outros danos (SILVA, 2000). Alguns são capazes de secretar enzimas pectinolíticas que degradam a camada mucilaginosa presente nos grãos durante a fermentação, ocorrendo a produção de produtos como etanol, ácido acético, ácido butírico, ácido lático e outros ácidos carboxílicos, que se difundem provocando a má qualidade do produto.

Apesar da síntese de enzimas pectinolíticas em grãos ser extremamente indesejável por acarretar perdas, as pectinases fúngicas apresentam diversas aplicações (PAULA, 2001). Na indústria têxtil, são usadas na desengomagem de fibras vegetais brutas (McKAY, 1988; BAILEY e PESSA, 1990). Na indústria de alimentos, essas enzimas são empregadas no processamento de sucos de frutas, na extração de óleo de oliva, na produção de alimentos para bebês e na degradação de mucilagem, durante a cura do cacau e do café (CHESSON et al., 1980; MANACHINI, 1988; ALANA, et al., 1989).

Foram realizados alguns trabalhos visando averiguar se *P. expansum* VIC, *P. griseoroseum* e outros fungos de interesse para a indústria alimentícia são capazes de produzir micotoxinas, como a patulina (FERREIRA, 2000) e a citrinina (VIVAN, 2002), nas condições de produção de enzimas despolimerizantes da parede celular vegetal. A presença de patulina ou citrinina não foi detectada quando o *P. expansum* Vic e *P. griseoroseum* foram cultivados nos mesmos meios utilizados para produção de poligalacturonase (FERREIRA, 2000; VIVAN, 2002).

Os objetivos deste trabalho foram verificar a presença de fungos produtores de ocratoxina A em grãos de café, avaliar a produção da toxina por fungos pectinolíticos de interesse industrial e pesquisar a presença da toxina em amostras de café torrado e moído e de café solúvel, comercializados na Zona da Mata de Minas Gerais.



### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Fisiologia de Microrganismos do Departamento de Microbiologia, localizado no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agricultura (BIOAGRO) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

#### **3.1. Isolamento da microbiota fúngica dos grãos de café**

Um total de seis amostras com aproximadamente 100 g de grãos de café, consistindo de uma amostra armazenada e deteriorada, três verdes e duas maduras, foram coletadas em fazendas da cidade de Viçosa, de Ervália, MG, e em uma cooperativa do município de Viçosa. Parte dos grãos foram rolados diretamente em placas contendo ágar extrato de malte com cloranfenicol a  $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ , utilizando uma pinça esterilizada, e, a outra parte, foi colocada em tubos contendo 10 mL de água peptonada esterilizada. Cem microlitros desse diluente contaminado foram, então, espalhadas com alça de Drigalsky em placas contendo 20 mL de ágar extrato de malte. As placas foram incubadas a  $25^{\circ}\text{C}$ , durante 7 dias.

Os fungos filamentosos que surgiram nas placas foram isolados no meio ágar extrato de malte por meio de uma única picada no centro da placa de Petri, com auxílio de uma agulha de platina. As placas foram incubadas a  $25^{\circ}\text{C}$ , durante 7 dias, e estocadas em geladeira a  $4^{\circ}\text{C}$ .

Os isolados com características macroscópicas semelhantes foram separados para a montagem de lâminas em lactofenol e observação ao microscópio. Dentre os isolados morfológicamente similares, apenas um foi selecionado para ser submetido à avaliação da produção de ocratoxina A. Os isolados foram estocados em ágar extrato de malte e, a cada 30 dias, foram novamente repicados.

### **3.2. Produção de ocratoxina A por fungos filamentosos isolados de grãos de café**

#### **3.2.1. Manutenção das culturas, obtenção da suspensão de esporos e condições de cultivo**

A avaliação presuntiva da produção de ocratoxina A pelos isolados foi feita observando-se a emissão de fluorescência da toxina ao ser excitada pela luz ultravioleta (UVGL-58 mineral light lamp, multiband, UV- 254-366 nm) em meio ágar de coco. As placas de ágar de coco inoculadas com os isolados foram incubadas, a 25°C, por três a sete dias, no escuro. A partir do terceiro dia de incubação, foram observadas sob luz ultravioleta, no comprimento de onda de 366 nm e 254 nm (DYER e McCAMMON, 1994).

Para avaliação da produção de ocratoxina A por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), os isolados foram cultivados em ágar-aveia inclinado, contendo 40 g/L de farinha de aveia e 15 g/L de ágar, a 25°C, durante 7 dias. Suspensões de esporos foram preparadas raspando-se a superfície do ágar-aveia com a alça de platina. Os esporos obtidos foram transferidos para solução de Tween 80 a 0,2% (v/v), homogeneizados e diluídos 100 vezes para contagem na câmara de Neubauer.

Suspensões contendo  $10^6$  esporos/mL foram inoculadas em 50 mL do meio Czapek Dox modificado suplementado com 0,2% de extrato de levedura (p/v) (CDYE) e incubados a 25°C, no escuro, por sete dias (MANTLE e CHOW, 2000).

Os isolados produtores de ocratoxina A foram, também, cultivados em 50 mL de meio de coco líquido, contendo 100 g/L de coco ralado, pH 6,8, e

em meio extrato de levedura (YES), contendo 2 % de extrato de levedura e 20 % de sacarose (DAVIS et al., 1987). Os frascos Erlenmeyer foram incubados no escuro, a 25°C, por sete dias.

### **3.2.2. Extração da ocratoxina A**

A ocratoxina A foi extraída dos meios de cultura líquidos (CDYE e YES) de acordo com LIN e DIANESE (1976), com algumas modificações. Após 7 dias de crescimento, os micélios fúngicos foram filtrados em tamis de 400 mesh, com poro de 37 µm de diâmetro. Os filtrados foram centrifugados a 8000 g, a 10°C, por 15 minutos, e 10 mL dos sobrenadantes foram novamente filtrados em papel de filtro Whatman nº 42. O filtrado foi extraído duas vezes com 10 mL de clorofórmio, agitando-se vigorosamente a mistura em funil de separação. A mistura foi deixada em repouso para a separação das fases. A fase superior, orgânica, foi retirada e a fase inferior, aquosa, foi extraída novamente com 10 mL de clorofórmio, como descrito acima. As fases orgânicas foram combinadas, desidratadas com sulfato de sódio (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), filtradas em papel de filtro Whatman nº 1 e evaporadas a 40°C para eliminação do clorofórmio. O resíduo foi ressuscendido em 2 mL de clorofórmio, sendo analisado por cromatografia de camada delgada (CCD) em sílica-gel e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

### **3.2.3. Cromatografia de camada delgada**

Para separação da ocratoxina A, a cuba cromatográfica foi saturada por 24 horas com 150 mL de solvente [tolueno: acetato de etila: ácido fórmico 90% (5:4:1)]. Foram aplicados 10 µL do padrão e 200 µL de cada amostra em placas de vidro contendo sílica gel 60 (5 x 20 cm com 0,25 mm de camada de sílica, Macherey-Nagel®). Após o tempo de corrida, as placas foram expostas à luz ultravioleta (UVGL-58 mineral light lamp, multiband, UV- 254-366 nm). A análise em CCD foi realizada comparando os R<sub>f</sub> e a fluorescência das amostras com os do padrão de ocratoxina A.

### **3.2.4. Cromatografia líquida de alta eficiência**

Uma solução estoque de ocratoxina A foi preparada dissolvendo-se 1 mg do composto puro em 9,9 mL de benzeno e 0,1 mL de ácido acético. Essa solução foi estocada em frasco âmbar a 4°C, para evitar sua degradação. Diferentes concentrações desta solução foram preparadas (2,5 µg mL<sup>-1</sup>, 5 µg mL<sup>-1</sup>, 10 µg mL<sup>-1</sup>, 12,5 µg mL<sup>-1</sup>, 15 µg mL<sup>-1</sup>, 20 µg mL<sup>-1</sup>, 25 µg mL<sup>-1</sup> e 50 µg mL<sup>-1</sup>) em acetonitrila. Vinte microlitros dos padrões e das amostras foram injetados no cromatógrafo Shimadzu 10 Ai, com sistema binário de bombas, injetor automático com detector UV 210-280 nm e com coluna C<sub>18</sub> Shimapack (4,6 mm de diâmetro interno x 25 cm), de fase reversa. A fase móvel utilizada foi acetonitrila: água: ácido acético (55:45:2), com fluxo de 1 mL/min (MANTLE e CHOW, 2000). A detecção da ocratoxina A nas amostras foi realizada calculando-se a área do pico de cada amostra e comparando-a com as áreas obtidas para os padrões.

### **3.3. Identificação dos fungos produtores de ocratoxina A presentes nos grãos de café**

Para a identificação dos isolados fúngicos foram preparados microcultivos entre lâmina e lamínula (SUTTOM, 1980). Após incubação por sete dias, a 25°C, as lamínulas foram montadas em lactofenol e observadas sob microscópio óptico (Olympus BX 50). As medidas do conidióforo, vesículas, fiálides e métula foram tomadas, como também as cores e as formas dessas estruturas (SAMSON e HOEKSTRA, 1996). As características de coloração, forma e aspecto colonial foram observadas para colônias cultivadas em ágar extrato de malte, a 25°C, por sete dias.

### **3.4. Produção de ocratoxina A por *Aspergillus ochraceus***

Os isolados produtores de ocratoxina A foram cultivado em frascos Erlenmeyers de 125 mL contendo 50 mL dos meios de cultura CDYE e YES separadamente, sem agitação, no escuro, a 25°C. As culturas foram

incubadas durante 12 dias e, em intervalos de dois em dois dias, os micélios foram retirados e os filtrados usados para extração e detecção da toxina por CCD e CLAE, como descrito anteriormente.

### **3.5. Detecção de ocratoxina A em amostras de café torrado e moído e café solúvel**

#### **3.5.1. Amostras**

Duas amostras de café torrado e moído produzidas no município de Viçosa, duas procedentes de Cajuri e três de Ervália e comercializadas em Viçosa, MG, e três cafés solúveis disponíveis no mercado foram analisadas. Amostras de café torrado e moído contendo 500 g e amostras de café solúvel contendo 100 g foram homogeneizadas e subamostras de 25 g foram utilizadas nas análises de ocratoxina A.

#### **3.5.2 -Extração e determinação de ocratoxina A**

Vinte e cinco gramas das amostras de café foram misturadas com 100 mL de mistura metanol:bicarbonato de sódio 3% (1:1), utilizando-se um liquidificador a média velocidade, durante 3 minutos. O extrato foi filtrado em papel de filtro de microfibras de vidro GF/A de 1,6 µm, a vácuo. A purificação foi realizada em coluna de imunoafinidade (Ochratest da Vicam Inc.,USA), adaptadas a uma seringa de vidro, com fluxo de 2 a 3 mL/minuto. Dez mililitros do extrato filtrado foram passados na coluna que, então, foi lavada com 10 mL de água ultra-pura. A ocratoxina A foi eluída em 4 mL de metanol. O extrato metanólico foi evaporado, seco em rotavapor e ressuspenso imediatamente em 1 mL de acetonitrila. Alíquotas de 20 µL do extrato concentrado e da solução padrão de ocratoxina A foram analisadas por CLAE (PITTEt et al., 1996). Duzentos microlitros dos extratos concentrados e 10 µL do padrão foram aplicados nas placas de CCD e seus  $R_f$  foram comparados .

### **3.6. Produção de ocratoxina A simultaneamente à produção de poligalacturonase (PG) e pectina liase (PL) por fungos pectinolíticos**

Os fungos pectinolíticos, *A. niger*, *P. expansum* VIC, *P. italicum* e *P. griseoroseum* foram testados em relação à produção de ocratoxina A concomitantemente à produção de pectina liase e poligalacturonase. *A. ochraceus*, produtor de ocratoxina A, foi também incluído como controle.

Suspensões de esporos preparadas como descrito anteriormente foram inoculadas em frascos Erlenmeyer de 125 mL, contendo 50 mL de meio mineral não-tamponado, para avaliação da produção de PG, e de meio mineral tamponado, para a avaliação da produção de PL. O meio mineral não-tamponado continha, em 1000 mL, 0,64 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 1,1 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1,0 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , acrescidos de extrato de levedura (0,06%), e pectina (0,5%). O pH do meio foi ajustado para 6,3. O meio mineral tamponado continha, em 1000 mL, 3,4 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 6,8 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 1,1 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e 1,0 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , acrescidos de extrato de levedura (0,06%), e pectina (0,5%) com pH final de 6,3. As soluções de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  a 10%, de extrato de levedura, de fontes de carbono e dos sais  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  e  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  foram autoclavadas separadamente. Os frascos foram incubados em agitador rotacional a 150 rpm, a 25°C, durante 120 horas.

Após a incubação, a massa micelial produzida foi separada do meio de cultura através de filtração, utilizando tamis de 400 mesh, com poro de 37  $\mu\text{m}$  de diâmetro. As atividades enzimáticas e a presença de ocratoxina A foram determinadas nos filtrados das culturas. A presença da toxina foi analisada por cromatografia de camada delgada (CCD) e por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), como descrito acima.

#### **3.6.1. Ensaio enzimáticos**

A atividade de poligalacturonase (PG) foi determinada pela dosagem de açúcar redutor produzido, segundo o método do DNS (ácido 3,5 dinitrossalicílico) descrito por MILLER (1959). A mistura de reação para determinação da PG consistiu de 1,5 mL de substrato composto de tampão

acetato de sódio 50 mmol L<sup>-1</sup>, ácido poligalacturônico a 0,6% e 0,5 mL de filtrado da cultura, a qual foi incubada a 40°C, por 20 minutos. Decorrido esse tempo, 0,25 mL da mistura de reação foi transferida para tubos contendo 1 mL de DNS e 0,75 mL de água destilada, que, em seguida, foram fervidos por 5 minutos. Antes de iniciar a leitura em espectrofotômetro Beckman DU Series 640 a 540 nm, todas as amostras, inclusive o controle, tiveram seus volumes aferidos para 10 mL, com acréscimo de 8 mL de água destilada.

O controle da reação foi feito pela adição da mistura de reação ao reagente DNS no tempo zero. Para confecção da curva padrão, foi utilizado ácido galacturônico p.a. (Sigma). Uma unidade de atividade de PG foi definida como  $\mu\text{mol}$  de açúcar redutor produzido por mililitro da amostra por minuto.

A atividade de pectina liase (PL) foi determinada espectrofotometricamente a 235 nm, como descrito por ALBERSHEIM e KILLIAS (1962). A mistura de reação consistiu de 1 mL de pectina cítrica (Sigma) como substrato, na concentração final de 1,0% (p/v), em tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 80 mmol L<sup>-1</sup>, e pH 6,8, adicionando-se 1,5 mL do sobrenadante da cultura mantidos a 25°C e 40°C por 20 min. Alíquotas de 0,5 mL da mistura de reação foram retiradas nos tempos 0 e 20 min de incubação e adicionadas em 4,5 mL de HCl 0,01 mmol L<sup>-1</sup> para interromper a reação. Uma unidade de atividade de PL foi definida como nanomoles de produto insaturado produzido por mililitro da amostra por minuto, utilizando-se para cálculo a absorvidade molar do produto insaturado de 5.550 L cm<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup> (ALBERSHEIM e KILLIAS, 1962).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Isolamento da microbiota fúngica presente em grãos de café

Cinquenta e seis isolados fúngicos foram obtidos das seis amostras de grãos de café analisadas. Preparações microscópicas de material raspado das colônias, montado em lactofenol, foram observadas ao microscópio permitindo agrupar os isolados em 26 tipos distintos. Os gêneros predominantes foram *Aspergillus* e *Penicillium*. A presença de *Fusarium*, *Mucor* e *Cladosporium* foi também constatada. Os isolados obtidos variaram grandemente nas características culturais, apresentando grande gama de coloração micelial, padrões de crescimento e coloração dos esporos (Figura 2).

Estes resultados são semelhantes aos encontrados em várias pesquisas da biodiversidade microbiana de grãos de café (BITANCOURT, 1957; SILVA et al., 2000; JOOSTEN et al., 2001). Outros estudos visando ao isolamento de fungos toxigênicos presentes nesse material, também, demonstraram que *Aspergillus* e *Penicillium* são os gêneros mais freqüentemente encontrados (MISLIVEC et al., 1983; TANIWAKI et al., 2000; BATISTA et al., 2003).





**FIGURA 2.** Diversidade de fungos filamentosos isolados de grãos de café em diferentes etapas de produção.

## 4.2. Produção de ocratoxina A por fungos filamentosos isolados do café

Os 26 isolados selecionados dos grãos de café foram cultivados em ágar de coco e no meio líquido CDYE, sem agitação, a 25°C por 7 dias e os sobrenadantes das culturas foram avaliados por meio da CCD e CLAE. Um único isolado, de pigmentação amarela, produziu fluorescência no ágar de coco quando exposto à luz ultravioleta (Quadro 3). Os demais isolados analisados não apresentaram fluorescência no mesmo meio e nenhum tipo de banda característica de ocratoxina A nas placas de CCD (Quadro 3). A ausência de ocratoxina A nos meios de cultivo desses isolados foi ainda comprovada pela CLAE (Quadro 3).

O isolado produtor de ocratoxina A foi identificado como *Aspergillus ochraceus*. Este fungo, quando cultivado em ágar extrato de malte, a 25°C, por 7 dias, apresentou densa camada de conidióforos amarelos (Figura 3a). A cabeça conidial amarela é globosa quando jovem e, mais tarde, rompe-se em duas ou mais colunas compactas. O conidióforo mede 1,5 mm de comprimento, apresenta uma coloração amarela, tendendo a marrom claro, e com lados desiguais. As vesículas são globosas, hialinas e têm 35 a 50 µm de diâmetro. As fiáides surgem na métula e medem 7-11 x 2,0-3,5 µm. A métula tem 15-20 x 5-6 µm. Os conídios são globosos, possuem 2,5-3,0 µm de diâmetro, são hialinos e podem apresentar bordas acidentadas ou totalmente lisas. Geralmente, são formados clamidósporos, inicialmente brancos e posteriormente púrpuras, com forma irregular (Figura 4).

Quando a cultura de *A. ochraceus* em meio de ágar de coco foi exposta à luz ultravioleta, fluorescência azulada ao redor da colônia foi observada a partir do terceiro dia de crescimento (Figura 3b). Observou-se, também, forte pigmentação amarela no verso da placa. O isolado utilizado como controle negativo não produziu fluorescência quando exposto à luz ultravioleta (Figura 3c). O ágar de coco é utilizado para a avaliação presuntiva da presença de algumas micotoxinas, como a aflatoxina e ocratoxina A pela emissão de fluorescência (LIN e DIANESE, 1976; DYER e McCAMMON, 1993; JOOSTEN et al., 2001)

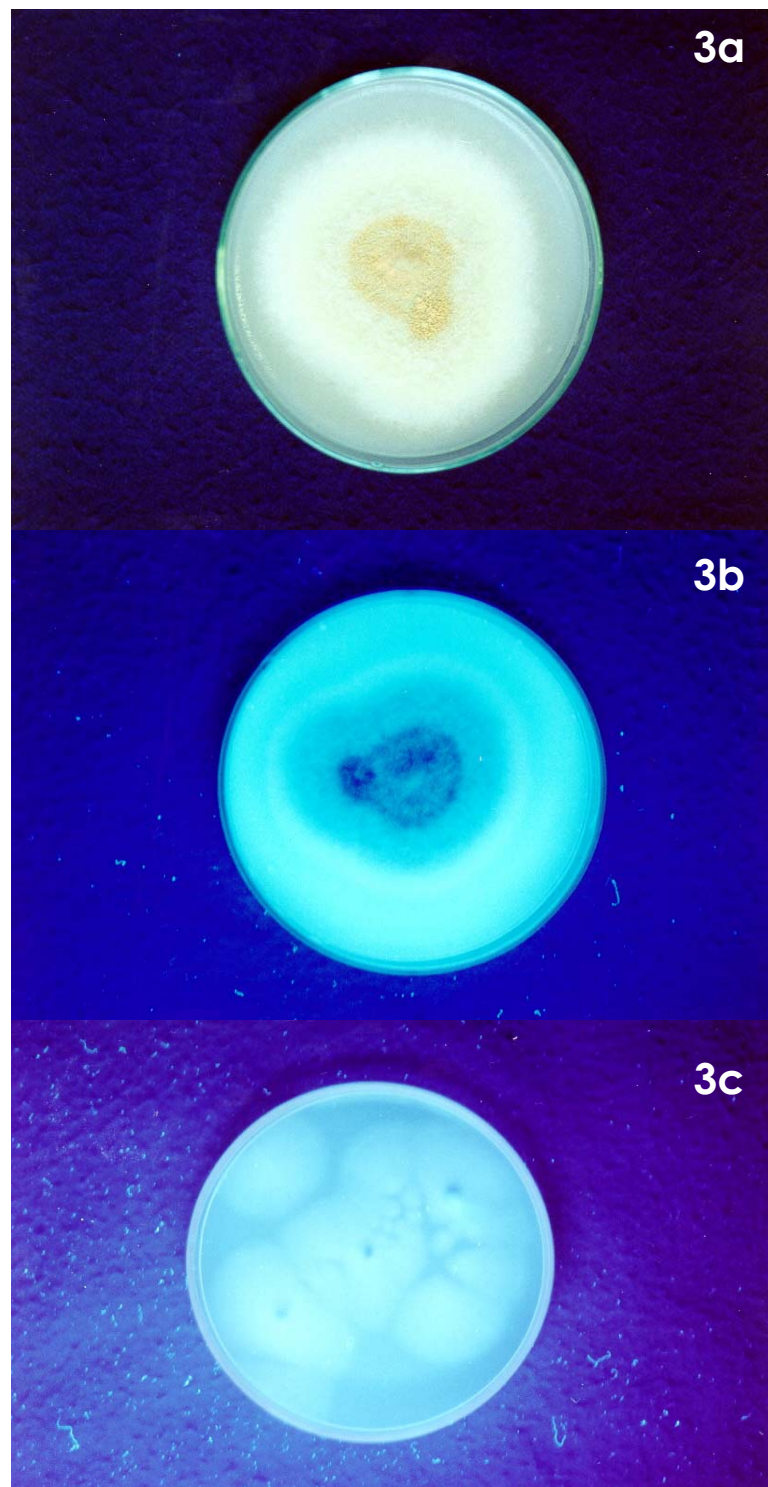
**QUADRO 3.** Produção de ocratoxina A por isolados fúngicos obtidos de grãos de café, em meio agar de coco e Czapek Dox

Isolado	Gênero <sup>1</sup>	Fluorescência <sup>2</sup>	Ocratoxina A <sup>3</sup> (ng/mL)
1	<i>Aspergillus</i>	+	166,0
2	NI	-	< 5
3	NI	-	< 5
4	NI	-	< 5
5	<i>Fusarium</i>	-	< 5
6	NI	-	< 5
7	<i>Penicillium</i>	-	< 5
8	NI	-	< 5
9	NI	-	< 5
10	<i>Penicillium</i>	-	< 5
11	<i>Penicillium</i>	-	< 5
12	NI	-	< 5
13	NI	-	< 5
14	NI	-	< 5
15	NI	-	< 5
16	<i>Aspergillus</i>	-	< 5
17	NI	-	< 5
18	<i>Fusarium</i>	-	< 5
19	NI	-	< 5
20	NI	-	< 5
21	NI	-	< 5
22	ND	-	< 5
23	<i>Rhizopus</i>	-	< 5
24	NI	-	< 5
25	NI	-	< 5
26	NI	-	< 5

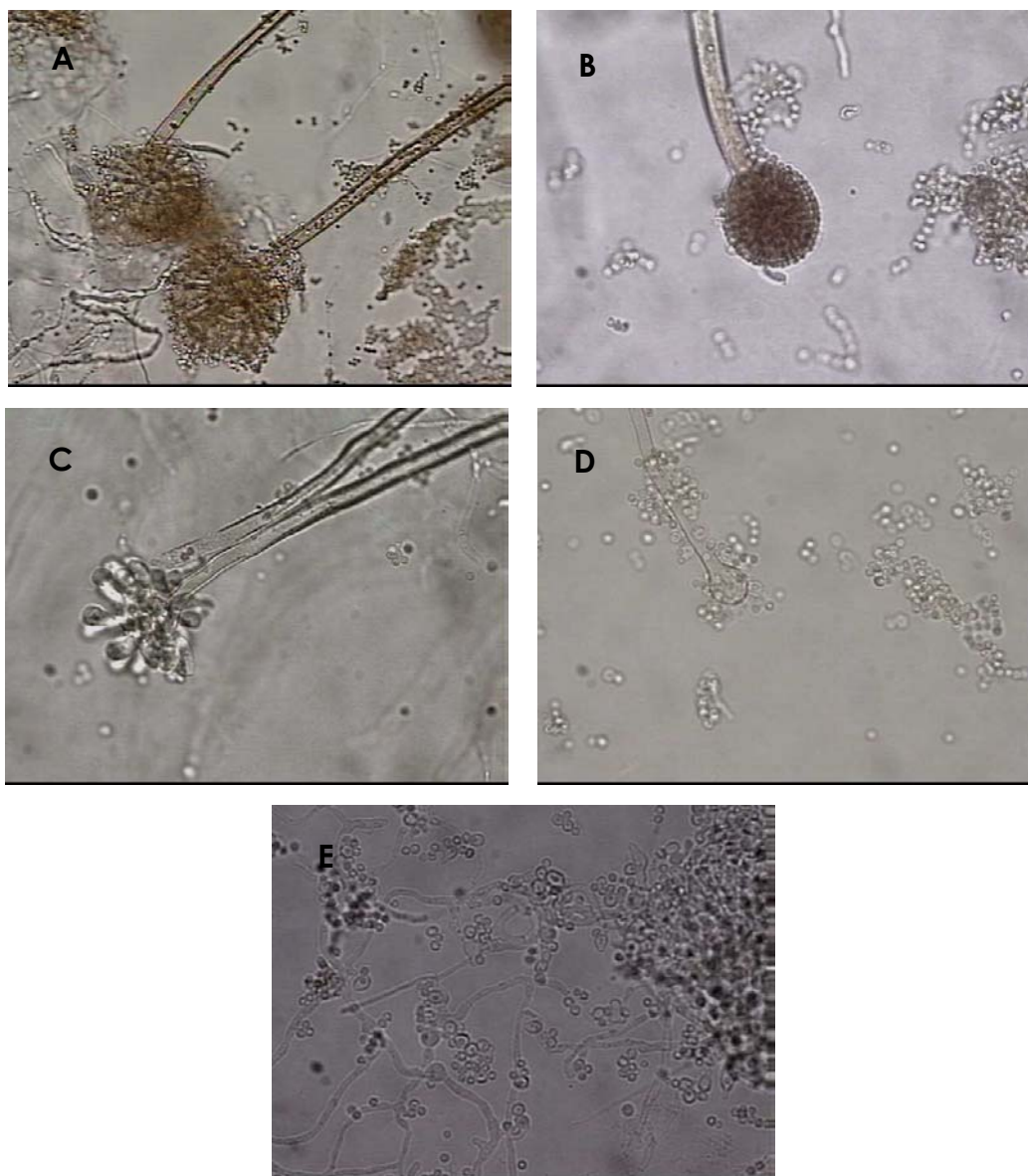
1/ NI = não identificado

2/ Detecção da fluorescência em ágar coco

3/ Detecção de ocratoxina A por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)



**FIGURA 3.** Características culturais de *Aspergillus ochraceus* isolado de grãos de café armazenados deteriorados e cultivado no meio ágar de coco, a 25°C, por 7 dias. (a) *A. ochraceus* observado sob luz branca e (b) sob luz ultravioleta, mostrando a emissão de fluorescência azul devido à presença de ocratoxina A. (c) Isolado fúngico de grãos de café não-produtor de ocratoxina A, observado sob luz ultravioleta, mostrando ausência de fluorescência.



**FIGURA 4.** Características morfológicas de *Aspergillus ochraceus* isolado de grãos de café. (A) Conidióforo amarelo a marrom claro, verrugosos com parede espessada. (B) Vesícula globosa com esporos aderidos. (C) Métulas associadas à vesícula (D) Vesícula hialina. (E) Clamidósporos hialinos a púrpuras, de forma irregular.

A produção de ocratoxina A pelo *A. ochraceus* foi confirmada quando o filtrado do meio CDYE foi analisado por CCD, resultando em valores de  $R_f$  semelhantes ao do padrão de ocratoxina A. A concentração da toxina avaliada pela CLAE foi de 166 ng/mL (Quadro 3).

A ocratoxina A também foi detectada no filtrado da cultura de *A. ochraceus* nos meios CDYE e YES quando o cultivo foi conduzido a 25°C, por 7 dias, no escuro e sem agitação. A produção de ocratoxina A nos meios extrato de levedura e Czapek Dox modificado foi de 426 e 674 ng/mL, respectivamente (Quadro 4).

A análise por CCD mostrou bandas de fluorescência branca, com  $R_f$  semelhante ao do padrão de ocratoxina A usado, quando o *A. ochraceus* foi cultivado no meio Czapek Dox, já no meio extrato de levedura não foi verificado essas bandas (Figura 5). A alta sensibilidade da CLAE comparada a CCD, pode ser a causa da não detecção da toxina por essa técnica. No meio de coco líquido não foi detectada a presença de ocratoxina A em quaisquer condições de incubação (estática ou sob agitação).

O valor de  $R_f$  encontrado para ocratoxina A neste trabalho foi de 0,5. Scott et al. (1977) relatou valor de 0,7. Em ambos os trabalhos, o mesmo sistema de solvente para a separação da ocratoxina A foi utilizado. Esses resultados variáveis podem ser explicados por fatores externos como a própria umidade e a temperatura do ambiente que influenciam a corrida cromatográfica (SCOTT et al., 1977).

### **4.3. Produção de ocratoxina A por *Aspergillus ochraceus***

A análise da produção de ocratoxina A, durante o crescimento de *A. ochraceus*, foi avaliada durante 12 dias de cultivo do fungo nos meios Czapek Dox e extrato de levedura, a 25°C, sem agitação. A toxina foi detectada após o segundo dia de cultivo nos dois meios analisados. No meio extrato de levedura, houve um aumento significativo na produção da toxina, atingindo o máximo de produção no quarto dia de incubação (Figura 6; Quadro 5). Após o quarto dia, observou-se decréscimo acentuado

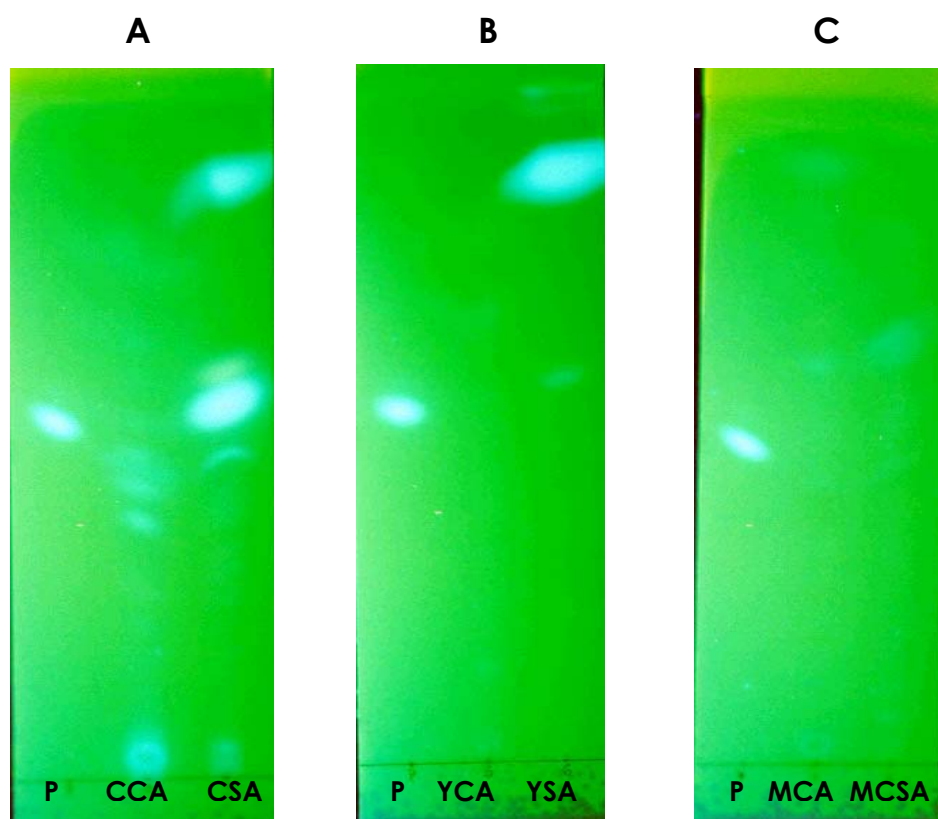
**QUADRO 4.** Produção de ocratoxina A (OTA) por *Aspergillus ochraceus*, cultivado em diferentes meios de cultura, a 25 °C, por 120 horas

<b>MEIOS</b>	<b>PRODUÇÃO DE OTA<sup>1</sup> (ng mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>CCD<sup>2</sup> (R<sub>f</sub>)</b>
Meio de coco com agitação	ND <sup>3</sup>	ND
Meio de coco sem agitação	ND	ND
Extrato de levedura com agitação	ND	ND
Extrato de levedura sem agitação	426	+
Czapek Dox com agitação	ND	ND
Czapek Dox sem agitação	674	+

1/ Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

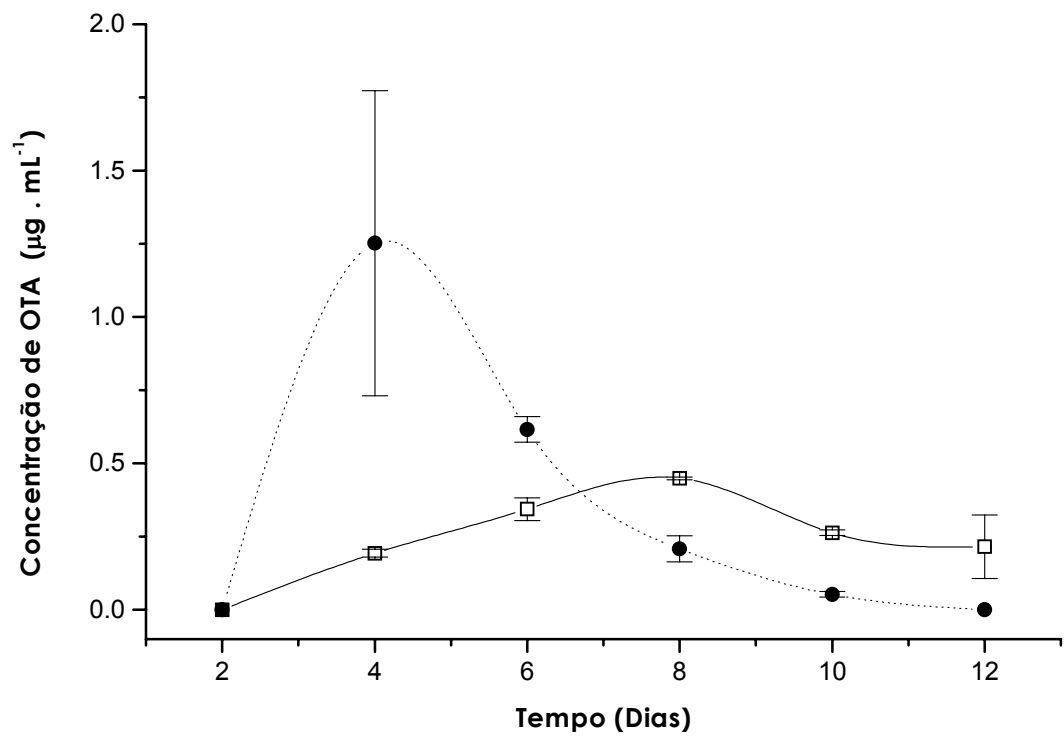
2/ CCD = Cromatografia de camada delgada

3/ ND = Não detectado



**FIGURA 5.** Detecção por CCD da produção de ocratoxina A por *Aspergillus ochraceus* em meio Czapek Dox (CD), extrato de levedura (YE) e meio de coco (MC), com (+) e sem agitação (-), a 25°C. P = padrão de ocratoxina A





**Figura 6.** Curva de produção de ocratoxina A por *Aspergillus ochraceus*, nos meios Extrato de Levedura (●) e Czapek Dox (□), ao longo de 12 dias de incubação a 25°C.

**QUADRO 5.** Produção de ocratoxina A (OTA) por *Aspergillus ochraceus*, cultivado nos meios Extrato de Levedura (YES) e Czapek Dox modificado (CZD), ao longo de 12 dias de incubação, a 25 °C

TEMPO (DIAS)	PRODUÇÃO DE OTA (ng mL <sup>-1</sup> ) <sup>1</sup>		CCD <sup>2</sup> (R <sub>f</sub> )	
	YES	CZD	YES	CZD
2	ND <sup>3</sup>	ND	ND	ND
4	1253	194	+	+
6	616	344	+	+
8	207	449	+	+
10	44	263	+	+
12	6	216	ND	+

1/ Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

2/ CCD = Cromatografia de camada delgada

3/ ND = Não detectado

na quantidade da toxina presente no meio (Figura 6). No décimo segundo dia a toxina não foi mais detectada.

No meio Czapeck Dox modificado houve aumento na produção de ocratoxina A entre os dias 4 e 8, verificando-se a produção máxima no oitavo dia de cultivo (Figura 6). A partir do oitavo dia, houve decréscimo na concentração da toxina, não tão acentuado quanto o observado no meio extrato de levedura. No décimo segundo dia, a ocratoxina A ainda foi detectada no meio de cultivo à concentração de 216 ng mL<sup>-1</sup> (Figura 6). Cerca de três vezes mais ocratoxina A foi detectada no meio extrato de levedura comparado ao Czapek Dox.

Por se tratar de metabólitos secundários, as micotoxinas tendem a ser sintetizadas ao final da fase de crescimento exponencial ou logarítmica, quando alguns nutrientes essenciais tornam-se limitados (DEACON, 1997). A função da produção de ocratoxina A, como outras micotoxinas, é a de favorecer o *A. ochraceus* na competição com outros microrganismos (KENDRICH, 1992).

Segundo DEACON (1997), alterações na composição do meio, assim como temperatura, pH e aeração também podem afetar a quantidade relativa e o tempo de produção das micotoxinas (KENDRICH, 1992).

A diminuição na concentração de ocratoxina A, observada após o pico de produção, não representa, necessariamente, a degradação da toxina. Pode-se sugerir que tenham ocorrido reações entre a ocratoxina A e outros compostos presentes no meio, ou que a mesma tenha se transformado em outras formas menos tóxicas, como sua análoga ocratoxina B, que é um ácido isocumarínico derivado da hidrólise da ocratoxina A (MOSS, 1996a).

#### **4.4. Detecção de ocratoxina A em amostras de café torrado e moído e café solúvel**

A presença de ocratoxina A não foi detectada nas amostras de café torrado e moído e café solúvel analisadas. No entanto, esse resultado não

pode ser considerado como indicativo de ausência de contaminação, uma vez que a validação das colunas de imunoafinidade não foi realizada.

No trabalho de PITTET et al. (1996), 75% das 101 amostras de café solúvel procedentes de vários países estavam contaminadas com ocratoxina A em concentrações variáveis de 0,2 a 6,5 ng/g. A frequência elevada de contaminação dos cafés solúveis por ocratoxina A também foi registrada em Campinas (LEONI et al., 2000). Em 14 amostras analisadas, a presença de ocratoxina A foi detectada em concentrações de 0,5 a 5,1 ng/g. Concentrações de 0,31 a 1,78 ng/g de ocratoxina A foram detectadas também, em 10 marcas comerciais de café solúvel e 47 de café torrado e moído comercializados na cidade de Belo Horizonte (PRADO et al., 2000).

A maioria dos trabalhos sobre ocratoxina A em cafés brasileiros revela baixa incidência de contaminação quando comparado aos dados de outros países (LEONI, et al., 2000; PRADO, et al., 2000; LEONI et al., 2001; TANIWAKI, et al., 2003). A ausência de tal contaminante é desejável, tendo em vista as legislações já vigentes em diversos países importadores desse produto (FURLANI e SOARES, 1999).

#### **4.5. Produção de ocratoxina A nas condições de produção de poligalacturonase (PG) e pectina liase (PL) por fungos pectinolíticos**

Os fungos *P. expansum*, *P. griseoroseum*, *P. italicum* e *A. niger* produziram quantidades significativas das enzimas PG e PL nos meios minerais tamponados e não-tamponados, contendo pectina como única fonte de carbono, a 25°C, com agitação. Nestas mesmas condições a produção de ocratoxina A não foi observada para nenhum isolado (Quadro 6).

A estirpe de *A. ochraceus* produtora de ocratoxina A foi avaliada nos mesmos meios de cultura e condições usadas para a determinação da atividade de PG e PL. A presença da toxina não foi detectada pela CCD. No entanto, quando as mesmas amostras foram analisadas por CLAE, a toxina foi detectada na concentração de 25 ng/ mL de extrato.

**QUADRO 6.** Atividade de pectina liase (PL) e poligalacturonase (PG) e produção de ocratoxina A (OTA) por alguns fungos pectinolíticos e por *Aspergillus ochraceus*, cultivados em meio mineral tamponado (MMT) e meio mineral não-tamponado (MMNT), por 120 h, a 25 °C

FUNGOS	MMT		MMNT	
	PL (nmol mL <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )	OTA (ng mL <sup>-1</sup> )	PG (μmol mL <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )	OTA (ng mL <sup>-1</sup> )
<i>Penicillium expansum</i>	34,50	ND <sup>1</sup>	61,31	ND
<i>P. italicum</i>	23,08	ND	46,80	ND
<i>P. griseoroseum</i>	12,37	ND	39,62	ND
<i>Aspergillus niger</i>	9,79	ND	25,51	ND
<i>A. ochraceus</i>	NA <sup>2</sup>	ND	NA	25

1/ ND = Não detectado

2/ NA = Não analisado

Em geral, a produção de toxinas por fungos produtores de enzimas pectinolíticas parece não ocorrer nas condições ótimas estabelecidas para a produção dessas enzimas (FERREIRA, 2000; VIVAN, 2002). A produção de citrinina e patulina não foi observada para algumas espécies do gênero *Penicillium*, incluindo *P. expansum* e *P. griseoroseum*, em condições idênticas ou semelhantes às aquelas usadas neste trabalho. Os resultados obtidos para ocratoxina A sugerem que o uso desses fungos para produção de enzimas pectinolíticas não traz riscos de contaminação com a toxina, pelo menos nas condições testadas.

## 5. RESUMO E CONCLUSÕES

Cinqüenta e seis fungos filamentosos foram isolados a partir de grãos de café, compreendendo grande variedade de gêneros, dentre os quais o gênero *Penicillium* foi predominante. Dentre os isolados obtidos, apenas um, identificado como *Aspergillus ochraceus*, proveniente de grãos armazenados, foi capaz de produzir ocratoxina A. O *A. ochraceus* foi, então, cultivado nos meios de cultura Czapek Dox modificado, extrato de levedura e meio de coco, a 25°C, por 120 horas, com agitação e sem agitação. Constatou-se que, quando cultivado em Czapek Dox modificado e extrato de levedura, sem agitação, houve a produção de ocratoxina A em quantidades detectáveis pela cromatografia de camada delgada e confirmadas pela cromatografia líquida de alta eficiência.

A ocratoxina A não foi detectada nos sobrenadantes das culturas dos fungos pectinolíticos *Aspergillus niger*, *Penicillium expansum*, *Penicillium griseoroseum* e *Penicillium italicum*, cultivados nos meios minerais tamponados e não-tamponados, suplementados com pectina cítrica como única fonte de carbono, a 25°C, por 120 horas, com agitação. As atividades de poligalacturonase e pectina liase foram determinadas nestas condições de cultivo e variaram de 9,79 a 34,5 nmol mL<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> para pectina liase e 25,51 a 61,31 μmol mL<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> para poligalacturonase. Nas condições em que as enzimas PG e PL são produzidas, não foi verificado a produção de ocratoxina A, provavelmente pelo fato dessas enzimas serem produzidas em condições de agitação, onde se observou que não há produção da toxina

em quantidades muito elevadas. Portanto, em relação a ocratoxina A, os fungos testados não representam riscos para a indústria de alimentos, sendo que, para as espécies *P. expansum* e *P. griseoroseum*, o mesmo foi observado quanto a patulina (FERREIRA, 2000) e citrinina (VIVAN, 2002).

A ocratoxina A também não foi detectada em sete amostras de cafés torrados e moídos produzidos e comercializados na Zona da Mata de Minas Gerais e em três cafés solúveis analisados. A validação do processo de purificação das amostras não foi feito, sendo necessário a realização dessa etapa em pesquisas futuras, para a obtenção de resultados conclusivos para as análises de cafés.



## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALAÑA, A., GABILONDO, A., HERNANDO, F., MORAGUES, M. D., DOMINGUES, J.B., LLAMA, M. J., SERRA, J. L. Pectina lyase production by *Penicillium italicum* strain. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, p. 1612-1616, 1989.
- ALBERSHEIM, P., KILLIAS, U. Studies relating to the publication and properties of pectin transeliminase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 97, p. 107-115, 1962.
- ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO CAFÉ 2002/2003. Rio de Janeiro: IBGE 2003. Edição Especial
- BAILEY, M. J., PESSA, E. Strain and process for production of polygalacturonase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 12, p. 266-271, 1990.
- BATISTA, L. R., CHALFOUN S. M., PRADO, G. Identificação de espécies toxigênicas de *Aspergillus* associados aos grãos de café armazenados. **Revista Brasileira de Armazenamento de Viçosa**, v. 3, p. 11-16, 2001.
- BATISTA, L. R., CHALFOUN S. M., PRADO, G., SCHWAN, R. F., WHEALS, A. F. Toxigenic fungi associated with processed (green) coffee beans (*Coffea arabica* L.). **International Journal of Food Microbiology**, v. 2666, p. 1-8, 2003.
- BAUDRIMONT, I., BETBEDER, A. M., GHARBI, A., PFOHL-LESZKOWICZ, A., DIRHEIMER, G., CREPPY, E. E. Effect of superoxide dismutase and catalase on the nephrotoxicity induced by subchronical administration of ochratoxin A in rats. **Toxicology**, v. 89, p. 101-111, 1994.

- BETINA, V. Ochratoxins and related dihydroisocoumarins. In: BETINA, V. (Ed.) **Mycotoxins – production, isolation, separation and purification**. New York: Elsevier, 1984. p. 183–210.
- BITANCOURT, A. A. O tratamento das cerejas de café para melhorar a bebida. **O Biológico**, v. 23, n. 1, p. 1-11, 1957.
- BLANC, M., PITTET, A., MUNOZ-BOX, R., VIANI, R. Behavior of ochratoxin A during green coffee roasting and soluble coffee manufacture. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 46, p. 673-675, 1998.
- BUSBY, J. R., WOGAN, G. N. Ochratoxins. In: SHANK, R. C. **Mycotoxins and Nitroso compounds: environmental risks**. Boca Raton: CRC Press, 1981. p. 129-136.
- CANTAFORA, A., GROSSI, M., MIRAGLIA, M., BENELLI, L. Determination of ochratoxin A in coffee beans using reversed-phase high performance liquid chromatography. **La rivista della Società Italiana di Scienza dell'Alimentazione**, v. 12, n. 2, p. 103-108, 1983.
- CCFAC (**Codex Alimentarius Comission** cx/ FAC 99/14) Novembro 1998. Disponível em: <http://www.codexalimentarius.net>. Acesso em: 14 de abril de 2003
- CHAVES, G. M. Ocratoxina A (OTA) e a cafeicultura brasileira. Relatório interno, 2002
- CHESSON, A. Maceration in relation to the post harvest handling and processing of plant material. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 48, p. 1-45, 1980.
- CREPPY, E. E., STEYN, P. S., VLEGGAR, R., RÖSCHENTHALER, R., DIRHEIMER, G. Comparative study of the effect of ochratoxin A analogues on yeast aminoacyl-tRNA synthetases and on growth and protein synthesis in hepatoma cells. **Toxicology Letters**, v. 19, p. 217-224, 1983.
- DAVIS, N. D., IYER, K., DIENER, U.L. Improved method of screening for aflatoxin with a coconut agar medium. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n. 7, p. 1593–1595, 1987.
- DEACON, J. W. Metabolism. In: DEACON, J. W. (Ed). **Modern Mycology**. 3 ed. Oxford: Blackwell Science, 1997. p. 104-120.
- DIRHEIMER, G. Mechanistic approaches to ochratoxin toxicity. **Food Additives and Contaminants**, v. 13, p. 45-48, 1996. Supplement.

- DYER, S. K.; MCCMMON, S. Detection of toxigenic Isolates of *Aspergillus flavus* and related species on coconut cream agar. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 76, p. 75-78, 1994.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). Total coffee production of exporting countries crop years 1994/95 to 2000/2001. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/003/x6030e/x6939e07.htm>. Acesso em: 23 abril 2002.
- FERREIRA, G. Produção de patulina por *Penicillium* ssp. Viçosa: UFV, 2000. 52 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola).
- FURLANI, R. P. Z., SOARES, L. M. V. Ocratoxina A em Café. **Brazilian Journal of Food Technology**. n. 2, v. 1/2, p.1-6, 1999.
- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: Some naturally occurring substances. **Food Items and Constituents, Heterocyclic Amines and Mycotoxins**, p. 489-521, 1993.
- JOOSTEN, H. M. L. J., GOETZ, J., PITTET, A., SCHELLENBERG, M., BUCHELI, P. Production of ochratoxin A by *Aspergillus carbonarius* on coffee cherries. **International Journal of Food Microbiology**, v. 65, p. 39-44, 2001.
- KENDRICH, B. Fungal Physiology. In: KENDRICH, B. (Ed). **The Fifth Kingdom**. 2 ed. Waterloo: University of Waterloo Press, 1992. p. 134-138.
- LEONI, L. A. B., SOARES, L. M., OLIVEIRA, P. L. C. Ochratoxin A in Brazilian roasted and instant coffees. **Food Additives and Contaminants**, v. 17, n. 10, p. 867-870, 2000.
- LEONI, L. A. B., FURLANI, R. P. Z., SOARES, L. M. V., OLIVEIRA, P.L. Ochratoxin A in Brazilian green coffee. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 2, p. 105-107, 2001.
- LEVI, C. P., TRENK, H. L., MOHR, H. K. Study of the occurrence of ochratoxin A in green coffee beans. **Journal of Association official of Analytical Chemistry**, v. 57, p. 866-870, 1974.
- LIN, M. T., DIANESE, J.C. A Coconut-agar medium for rapid detection of aflatoxin production by *Aspergillus* spp. **Phytopathology**, v. 66, p. 1466-1469, 1976.
- MANACHINI, P. L., PARINI, C., FORTINA, M. G. Pectic enzymes from *Aureobasidium pullulans* LV 10. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 10, p. 682-685, 1988.

- MANTLE, P.G., CHOW, A.M. Ochratoxin formation in *Aspergillus ochraceus* with particular reference to spoilage of coffee. **International Journal of Food Microbiology**, v. 56, p. 105–109, 2000.
- McKAY, A. M. A plate assay method for the detection of fungal polygalacturonase secretion. **FEMS Microbiology Letters**, v. 56, p. 355-358, 1988.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-431, 1959.
- MISLIVEC, P. B., BRUCE, V. R., GIBSON, R. Incidence of Toxigenic and other molds in green coffee beans. **Journal of Food Protection**. v. 46, n. 11, p. 969-973, 1983.
- MOSS, M.O. Mode of formation of ochratoxin A. **Food Additives and Contaminants**, v. 13, p. 5-9, 1996a. Supplement.
- MOSS, M.O. Mycotoxins. **Mycological Research**, v. 100, p. 513-523, 1996b.
- PAULA, E. M. Crescimento e caracterização de pectina liase de *Paenibacillus amylolyticus* isolado de frutos de café (*Coffea arabica* L.). Viçosa: UFV, 2001. 46 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola).
- PITET, 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 of Agriculture and Food Chemistry**, v. 44, p. 3564-3569, 1996.
- PLESTINA, R. Nephrotoxicity of ochratoxin A. **Food Additives and Contaminants**, v. 13, p. 49-50, 1996. Supplement.
- PRADO, G., OLIVEIRA, M. S., ABRANTES, F. M., SANTOS, L. G., VELOSO, T., BARROSO, R. E. S. Incidência de Ocratoxina A em Café Torrado e Moído e em Café Solúvel Consumido na Cidade de Belo Horizonte, MG. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 20, n. 2, p. 1-12, 2000.
- RADOVANOVIC, Z. A etiology of Balcan nephropathy : a reappraisal after 30 years. **European Journal of Epidemiology**, v. 5, n. 3, p. 372-377, 1989.
- RADONIC, A. M., RADOSVIC, A. Z. E., ZUPANIC, A. V. Endemic Nephropathy in Yugoslavia. In: MOSTOVI, F. K., SMITH, D. E. (Eds). **The Kidney**. Baltimore: Willians e Willians, 1996. p. 522

- SAMSON, R. A., HOEKSTRA, E. S. Introduction to food- Borne fungi. 5 ed In: SAMSON A. R. (Ed). The Netherlands: Centralalbureau Voor Schimmelcultures, 1996. p. 66-67
- SCHLATTER, C. H., STUDER-ROHR, J., RASONYI, T. H. Carcinogenicity and Kinetic aspects of ochratoxin A. **Food Additives and Contaminants**, v. 13, p. 43-44, 1996. Supplement
- SCOTT, P. M., WYLIE, T. D., MOREHOUSE, L. G. Mycotoxic Fungi. In: SCOTT, P. M. (Ed.) **Mycotoxins and Mycotoxicoses**, New York: Marcel Dekker, 1977. p. 283-356
- SILVA, C. F., SCHWAN, R. F., DIAS, S. E., WHEALS, A. E. Microbial diversity during maturation and natural processing of coffee cherries of *Coffea arabica* in Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 60, p. 231-260, 2000.
- SILVA, L. C. Fungos e Micotoxinas em grãos Armazenados, 2001. Disponível em: <http://www.unioeste.br/agais/fungos.html>. Acesso em: 06 maio 2001.
- STUDER-ROHR, J., DIETRICH, D. R., SCHLATTER, C. H. The occurrence of ochratoxin A in coffee . **Food Chemical Toxicology**, v. 33, n. 5, p. 341-355, 1995.
- SUTTON, B. C., **The Coelomycetes**. In: SUTTON B. C. (Ed). United Kingdom: Commonwealth mycological Institute, 1980. p. 696.
- SWEENEY, M. J., DOBSON, A. D. W. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. **International Journal of Food Microbiology**, v. 43, p. 141-158, 1998.
- TANIWAKI, M. H., IAMANAKA, B. T., VICENTINI, M. C. Fungos produtores de ocratoxina e ocratoxina A em cafés, 2000. Disponível em: <http://www.coffeebreak.com.br/ocafezal.asp>. Acesso em: 05 fevereiro 2003
- TANIWAKI, M. H., PITT, J. I., TEIXEIRA, A. A., IAMANAKA, B. T. The source of ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to processing methods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 82, p. 173-179, 2003.
- TSUBOUCHI, H., YAMAMOTO, K., HISADA, K., SAKABE, Y., UDAGAWA, S. Effect of roasting on ochratoxin A level in green coffee beans inoculated with *Aspergillus ochraceus*. **Mycopathologia**, v. 97, p. 111-115, 1987.
- TSUBOUCHI, H., TERADA, H., YAMAMOTO, K., HISADA, K., SAKABE, Y. Ochratoxin A found in commercial roast coffee. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. v. 36, p. 540-542, 1988.

UNITED STATES NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM (USNTP)–Technical Report–358, “Toxicology analyse Carcinogenesis Studies of Ochratoxina A (CASn° 303-47-9) in 344/N Rats (Gavage Studies)”, 1989. Disponível em: <http://ntp-server.niesh.nih.gov/htdocs/LT-studies/tr358.htmf>. Acesso em: 6 maio 2001.

UNITED STATES NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM (USNTP). Chemical repository (Radian Corporation, 29, 1991) Ochratoxin A. Disponível em: <http://ntp.db.niesh.nih.gov/NTP-em-H&S/NTP-Chem3/Radian303-47-9.txt>. Acesso em: 6 maio 2001.

VAN EGMOND, H. P. Analytical Methodology and regulations for ochratoxin A. **Food Additives and Contaminants**, v. 13, p. 11-13, 1996.

VIVAN, J. Produção da micotoxina citrinina por *Penicillium* spp. Viçosa: UFV, 2002. 43p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola)

VUKELIC, A. M., SOSRARIC, A. B., BELICZA, M. Pathomorphology of Balkan endemic nephropathy. **Food and Chemical Toxicology**, v. 30, p. 193-200, 1992.