



CARACTERIZAÇÃO MICOLÓGICA E MICOTOXICOLÓGICA DE FRUTOS DE CAFEEIROS DA ESPÉCIE *C. CANEPHORA* COM VISTAS À GARANTIA DA SEGURANÇA DO PRODUTO

MATHEUS S. LIMA¹; ALINE S. LOPES²; LARISSA S. FERRANTI²; THAIANE O. CALDERARI²; MARTA H. TANIWAKI³; BEATRIZ T. IAMANAKA⁴

Nº 11238

RESUMO

A problemática da presença de fungos toxigênicos e micotoxinas em grãos de café arábica tem sido estudada e foi elucidada em várias pesquisas realizadas em café arábica. Atualmente sabe-se que *Aspergillus westerdjikiae* é a principal espécie responsável pela produção de ocratoxina A em café arábica e seu desenvolvimento é resultante de um processamento inadequado de grãos, principalmente nas etapas de colheita, secagem, estocagem e transporte. Contudo, estudos sobre a contaminação fúngica em café robusta ainda são bastante restritos. Tendo em vista que atualmente tem havido interesse dos produtores e industriais em aumentar a produção de café robusta no Brasil, considera-se importante o conhecimento das espécies fúngicas contaminantes do produto e das micotoxinas por elas produzidas. Sendo assim os objetivos do trabalho foram avaliar a presença dos fungos produtores de ocratoxina A, bem como avaliar os níveis desta toxina nos grãos de café. Vinte amostras de café robusta cereja e passas, antes e após a secagem, foram avaliadas quanto à infecção fúngica. Foram isoladas 330 espécies do grupo *Circumdati* no total de amostras analisadas e 77% foram produtoras de ocratoxina A. Verificou-se um aumento na infecção destas espécies após a secagem, de 2,4% para 12,8% nas cereja e de 1,4% para 38,8% nas passas. Apenas 2 amostras apresentaram contaminação por ocratoxina A maior que o limite de detecção (0,2µg/Kg).

ABSTRACT

The problem of toxigenic fungi and mycotoxins in raw coffee has been studied and it was elucidated in researches carried out with Arabic coffee. Recently It is known that *Aspergillus westerdjikiae* is the main specie responsible for ochratoxin A in Arabic coffee and its development is a result of an inadequate process of the beans, mainly at

¹Bolsista CNPq: Graduação em Eng. de Alimentos, Faculdade Jaguariúna, Jaguariúna/SP, e-mail: matheussl05@gmail.com.br

²Colaborador: Estagiário CCQA-ITAL

³Colaborador: Pesquisador, CCQA-ITAL, Campinas-SP

⁴Orientador: Pesquisador, CCQA-ITAL, Campinas-SP (beatriz@ital.sp.gov.br)

harvesting, drying, storage and transportation steps. However, studies with fungi contamination in robusta coffee are still restricted. Considering that there are interest from the producers and industrial manufactures to increase the robusta coffee production in Brazil, it is important to know the presence of toxigenic fungi in the product and the mycotoxin produced. Thus the objectives of this work were to evaluate ochratoxin A producing fungi, as well as the presence of this toxin in the coffee beans. Twenty samples of cherries and overripe cherries of robusta coffee, before and after drying, were evaluated in relation to fungal infection. Three hundred and thirty species of *Circumdati* group were isolated from the analyzed samples and 77% were ochratoxin A producers. It was verified an increase of these species infection after drying, from 2.4% to 12.8% for cherries and 1.4% to 38.8% for overripe cherries. Only 2 samples had ochratoxin A higher than the detection limit (0.2µg/Kg).

INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de café cru. A produção nacional de café beneficiado prevista para 2010 pela CONAB foi de 47,04 milhões de sacas de 60 quilos de café beneficiado, representando um acréscimo de 19,2% em relação à safra de 2009. O maior acréscimo (22,3%) se deve à produção de café arábica, estimada em 35,31 milhões de sacas. Para a produção de robusta (conilon) a previsão foi de 11,73 milhões de sacas, correspondendo a um crescimento de 10,7% em relação à safra anterior.

Apesar da menor produção, o café robusta (*Coffea canephora*) vem apresentando grande importância econômica para o país, e tem sofrido um aumento significativo. Por sua bebida apresentar um aroma e sabor pouco acentuado, o café robusta tem sido utilizado na formação de *blends* com o café arábica e na produção de café solúvel e torrado. O aumento da produção de café robusta e utilização dos grãos na indústria de café solúvel atenta para a importância do controle de qualidade microbiológica destes grãos, principalmente em relação aos fungos toxigênicos produtores de micotoxinas.

A ocratoxina A (OTA) é uma micotoxina produzida por fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, que normalmente contaminam o café e outros cereais (LEVI *et al.*, 1974; MICCO *et al.*, 1989. Dentre os fungos ocratoxigênicos, *A. ochraceus* (atualmente subdividido em *A. westerdijkiae* e *A. ochraceus*), *A. carbonarius* e *A. niger* foram encontrados em amostras de café em várias partes do mundo (URBANO *et al.* 2001; TANIWAKI *et al.* 2003; MARTINS *et al.* 2003)

Após vários estudos realizados com café arábica, é reconhecido que a infecção por estas espécies toxigênicas ocorrem após a colheita, quando as práticas adotadas não são adequadas. A fonte de contaminação é o solo, os equipamentos e o terreiro onde é realizada a secagem (URBANO *et al.*, 2001; TANIWAKI *et al.*, 2003; SUARÉZ-QUIROZ *et al.* 2004). Quase a totalidade dos estudos relacionados com a micobiota de café e micotoxinas foi realizado com o café arábica.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Um total de 20 amostras de café robusta, coletadas na fazenda do Instituto Agronômico de Campinas (IAC) foi analisado, sendo 10 cerejas (fruto maduro, vermelho, pronto para ser coletado) e 10 passas (fruto tardio que permaneceu no pé após maturidade).

Avaliação micológica

A análise de micobiota nos grãos foi realizada antes e após a secagem em terreiro suspenso no Instituto Agronômico de Campinas.

Para o isolamento da micobiota dos grãos, 50 grãos foram desinfectados superficialmente com 0,4% de solução de hipoclorito de sódio por 2 minutos e plaqueados em Ágar Dicloran 18% Glicerol (DG18). As placas foram incubadas a 25°C por 5 dias. Os resultados foram expressos em porcentagem de grãos infectados conforme a metodologia de PITT & HOCKING (2009). O plaqueamento dos grãos sem desinfecção também foi realizado com o objetivo de comparar os dois métodos e considerar a contaminação externa dos grãos. Para identificação dos fungos, os isolados foram inoculados em meio CYA (Czapek Extrato de Levedura Ágar) e identificadas de acordo com a chave de identificação para *Aspergillus*, proposta por KLICH & PITT (1988). As demais espécies foram identificadas de acordo com PITT&HOCKING (2009).

Avaliação do potencial de produção de toxinas

Os isolados toxigênicos foram avaliados quando à produção de toxinas de acordo com (FILTENBORG *et al.*, 1983). Cada isolado foi inoculado em meio YESA (Extrato de Levedura Sacarose Ágar) e incubados à 25°C por 7 dias. Pequenos pedaços das cepas dos fungos foram cortados pela técnica do ágar plug e a toxina foi extraída com clorofórmio:metanol (1:1). Os pedaços dos fungos foram aplicados em placas de cromatografia de camada delgada. A seguinte fase móvel foi utilizada: tolueno, acetato de

etila, ácido fórmico 90% e Clorofórmio proporção 7:5:2:5. A leitura dos resultados foi realizada na câmara UV em dois diferentes comprimentos de onda, 356nm e 254 nm.

Análise de ocratoxina A no café robusta

Cerca de 500 g da amostra foi triturada e homogeneizada em moinho até obter uma granulometria de 0,8 – 1,0 mm. A ocratoxina A foi extraída pesando $25\text{g} \pm 0,1\text{ g}$ da amostra de café cru. Foram adicionados 200 mL de metanol:3% da solução de carbonato de sódio hidrogenado e homogeneizado shaker por 30 min. A solução foi filtrada em papel de filtro qualitativo e, em seguida, em membrana de fibra de vidro. Foi tomada uma alíquota de 4 mL do extrato filtrado, transferido para um balão volumétrico e diluído para 100 mL com o tampão fosfato salino (PBS). Foram transferidos 100 mL do extrato diluído da amostra para serem eluídos pela coluna de imunoafinidade. A coluna foi lavada com 10 mL de água deionizada e em seguida, a toxina foi eluída com 4 mL de metanol. Todo o eluato foi levado à secura em fluxo de nitrogênio. O extrato foi redissolvido com 300 μL da fase móvel e homogeneizado em agitador tipo vortex e/ou banho de ultrassom. A coluna utilizada foi C18 fase reversa de 250 X 4,6mm com partículas de 5 μm e fase móvel: acetronitrila:água:ácido acético glacial (51:47:2, v:v:v). Volume de injeção do padrão e da amostra: 20 μL , temperatura da coluna 40°C; fluxo de fase móvel: 0,8 mL/min. Comprimento de onda de excitação: 360nm e comprimento de onda de emissão: 440nm. (VARGAS *et al.*, 2005).

Otimização da metodologia de ocratoxina A

Para otimização do método foram realizados o teste de recuperação em três níveis de concentração: 4,8 $\mu\text{g/Kg}$, 8,0 $\mu\text{g/Kg}$ e 80,0 $\mu\text{g/Kg}$ em triplicata, e determinados os limites de detecção e quantificação. O limite de detecção do método foi determinado pela análise de 10 repetições de amostras de café verde com baixa concentração de ocratoxina A (menor que 1 $\mu\text{g/kg}$). O desvio padrão da média dos resultados foi multiplicado pelo valor t de Student para uma confiabilidade de 99%, segundo graus de liberdade apropriados. O limite de quantificação do método foi calculado como 10 vezes o valor do desvio padrão (Keith et al., 1983, Long & Winefordner, 1983).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

É possível notar na Tabela 1, tanto nas cerejas como passas, uma alta frequência de fungos nas amostras sem desinfecção, com valores variando de 95,8 a 100%. Neste caso, os fungos presentes na superfície dos grãos, provenientes do ambiente, da superfície da área de secagem também foram considerados, implicando assim em uma maior contaminação.

Comparando as amostras cereja e passas desinfectadas, foi possível notar maior contaminação geral por fungos nas amostras passas, tanto antes da secagem (57,2%) como após a secagem (25,6%). A permanência dos frutos no pé possibilita uma maior deposição de matéria orgânica proveniente do solo e do ar ambiente, causando assim uma maior contaminação. Além disso, com a senescência, os frutos vão perdendo a resistência ao ataque de insetos e fungos, ficando mais suscetíveis à contaminação.

Em relação às espécies potencialmente produtoras de ocratoxina A da seção *Circumdati*, é possível notar tanto nas amostras cereja quanto nas passas não desinfectadas, um aumento na ocorrência destas espécies após a secagem (de 2,4% para 12,8% para cereja e de 1,4% para 38,8% para passas). Já as espécies da seção *Nigri* encontraram-se em menor frequência, estando presentes principalmente nas amostras de cereja e passas sem desinfecção, antes da secagem, em porcentagens baixas (8,6% para cereja e 4,4% para passas). Assim como em estudos realizados previamente por outros autores em café arábica (TANIWAKI *et al*, 2003; URBANO *et al*. 2001; SUARÉZ-QUIROZ *et al*. 2004), foi possível verificar uma maior incidência de fungos potencialmente produtores de ocratoxina A da seção *Circumdati* no café robusta produzido no Estado de São Paulo.

A ocorrência de isolados produtores de aflatoxinas, neste caso da seção *Flavi*, foi baixa, estas espécies estando presentes apenas nas amostras cereja sem desinfecção antes da secagem (0,8%) e passas sem desinfecção antes da secagem (0,4%), indicando que, nas amostras analisadas de café robusta, este grupo não foi comum.

Conforme apresenta a Tabela 2 o grupo toxigênico de maior frequência foi pertencente à seção *Circumdati*, com um total de 330 isolados e 77% foram produtores de ocratoxina A. Dentre os isolados deste grupo 22,7% foram identificados como *Aspergillus westerdijkiae*.

Os valores de recuperação da ocratoxina A obtidos para os níveis 4,8µg/Kg, 8,0 µg/Kg e 80,0 µg/Kg foram de 86,5%, 78,0 e 81,0% respectivamente, mostrando que o método mostrou-se satisfatório. O limite de detecção calculado foi de 0,2µg/Kg e o limite de quantificação de 0,6µg/Kg.

Com exceção das amostras passas 6 e 9, todas as demais não apresentaram contaminação por ocratoxina A acima do limite de detecção. Atualmente não há limite na legislação brasileira para este contaminante em café cru (RDC Nº 07, 18/02/11). As amostras passas 6 e 9 apresentaram alta infecção fúngica pelo grupo *Circumdati*, chegando a 100% nas amostras sem desinfecção, relacionando positivamente a presença

Tabela 1: Porcentagem de infecção fúngica (média de 10 amostras) em amostras cereja e passas, antes e após a secagem, com e sem a desinfecção dos grãos

Amostra	Fungos isolados (% infecção)									
	% total	Cladosporium sp	Fungos hifomicetos	Circumdati	Nigri	Flavi	Penicillium sp.	Rhizopus sp.	Leveduras	Eurotium sp.
ANTES SECAGEM										
Cereja – média ¹ CD ²	26,4	4	21,4	0,2	0	0	1	0	0	0,2
Cereja - média SD ³	100	94,6	57,4	2,4	8,6	0,8	64	0,4	5,6	0
APÓS A SECAGEM										
Cereja - média CD	3,2	0	1,4	0,4	0	0	1,4	0	0	0
Cereja - média SD	96	87,2	3,8	12,8	1,6	0	53,8	0	0	1
ANTES SECAGEM										
Passas - média CD	57,2	20	45,8	0	0,4	0	1	0		
Passas - média SD	100	75,8	89,2	1,4	3,2	0,4	47,6	0,6		
APÓS SECAGEM										
Passas - média CD	25,6	1,4	11,8	10,6	0		1,4	0		0,2
Passas - média SD	95,8	73,2	13	38,8	4,4		17,4	0,2		1,2

¹ Média de 10 amostras ² CD = com desinfecção ³ SD = sem desinfecção

Tabela 2: Frequência de isolados produtores de ocratoxina A e aflatoxinas e a porcentagem de cepas toxigênicas.

	Seção <i>Circumdati</i>		Seção <i>Nigri</i>		Seção <i>Flavi</i>	
	Antes secagem	Após secagem	Antes secagem	Após secagem	Antes secagem	Após secagem
Cereja CD ¹ – nº isolados	1	4	0	0	0	0
% produtores	100%	75,0%	0%	0%	0%	0%
Cereja SD ² – nº isolados	12	64	40	8	4	0
% produtores	83,3%	68,8%	0%	0%	25%	0%
Passas CD – nº isolados	0	50	1	0	0	0
% produtores	0%	88,0%	0%	0%	0%	0%
Passas SD – nº isolados	7	192	21	2	2	0
% produtores	100%	75,5%	0%	0%	0%	0%
Total isolados	330		72		6	
% produtores	77% ocratoxina A		0% ocratoxina A		16,7% aflatoxinas	

CD = com desinfecção ² SD = sem desinfecção

destas espécies com a ocratoxina A. A amostra passas 9 já apresentava contaminação por estas espécies mesmo antes da secagem. A amostra 7 apesar da alta infecção por espécies toxigênicas não apresentou contaminação por ocratoxina A.

Tabela 3 – Ocratoxina A nas amostras de café robusta após a secagem em µg/Kg (Média e desvio padrão)

OCRATOXINA A (µg/Kg)							
Amostra	Rep1	Rep 2	Média (desvio padrão)	Amostra	Rep 1	Rep 2	Média (desvio padrão)
Cereja 1	ND ¹	ND	ND	Passas 1	ND	ND	ND
Cereja 2	ND	ND	ND	Passas 2	ND	ND	ND
Cereja 3	ND	ND	ND	Passas 3	ND	ND	ND
Cereja 4	ND	ND	ND	Passas 4	ND	ND	ND
Cereja 5	ND	ND	ND	Passas 5	ND	ND	ND
Cereja 6	ND	ND	ND	Passas 6	4,62	6,85	9,41(6,46) ²
Cereja 7	ND	ND	ND	Passas 7	ND	ND	ND
Cereja 8	ND	ND	ND	Passas 8	ND	ND	ND
Cereja 9	ND	ND	ND	Passas 9	0,46	0,36	0,41(0,07)
Cereja 10	ND	ND	ND	Passas 10	ND	ND	ND

¹ ND = Não detectado (limite de detecção = 0,2µg/Kg) ² Foi calculada média de três repetições (rep 3 = 16,75µg/Kg)

CONCLUSÕES

Verificou-se uma maior infecção fúngica total e por fungos toxigênicos nas amostras sem desinfecção.

A presença de fungos como *Cladosporium* sp., *Penicillium* sp. e hifomicetos foi predominante, principalmente nas amostras não submetidas à secagem, cuja atividade de água era maior. Já para os fungos toxigênicos, neste caso, os pertencentes ao grupo *Circumdati*, produtores de ocratoxina A, a maior ocorrência ocorreu após a secagem.

Das 20 amostras analisadas apenas 2 apresentaram contaminação por ocratoxina A com nível máximo de 16,75µg/Kg. A presença deste contaminante esteve

diretamente relacionada com a presença de fungos do grupo *Circumdati* nos grãos de café robusta avaliados.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ – PIBIC, pela bolsa concedida.

REFERÊNCIAS

- CONAB 2010. 1º Levantamento da safra de café 2010. (http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/5cafe_10.pdf), acesso em 14/02/2011.
- FILTENBORG, O.; FRISVALD, J.C.; SVENDENSEN, J.A. Simple screening method for molds producing intracellular mycotoxins in pure cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, 45: 581-585, 1983.
- KEITH, L.H.; CRUMMETT, W.; DEEGAN J.; LIBBY, R.A.; TAYLOR, J.K.; WENTLER, G. Principles of environmental analysis. **Analytical Chemistry**, Washington, v.55, p.2210-2218, 1983.
- KLICH, M.A. & PITT, J.I. Differentiation of *Aspergillus flavus* from *A. parasiticus* and other closely related species. Transactions of the British Mycological Society 91:99–108. 1988.
- LEVI, C.P., TRENG, H.L. & MOHR, H.K. Study of the occurrence of ochratoxin A in green coffee beans. J. Assoc. Offic. Analyt. Chem., 57: 866-870, 1974.
- LONG, G.L.; WINEFORDNER, J.D. Limit of detection. A closer look at the IUPAC definition. **Analytical Chemistry**, Washington, v.55, p. 712A-724A, 1983
- MARTINS, M.L., MARTINS, H.M. & GIMENO, A. Incidence of microflora and of ochratoxin A in green coffee beans (*Coffea arabica*). Food Addit. Cont., 20: 1127-1131, 2003.
- MICCO, C., GROSSI, M., MIRAGLIA, M. & BRERA, C. A study of the contamination by ochratoxin A of green and roasted coffee beans. Food Addit. Cont., 6: 333-339, 1989.
- PITT, J.I. & A.D. HOCKING (ed). Fungi and Food Spoilage, 3rd ed. New York. Springer. 2009.
- Resolução RDC Nº 7, de 18 de fevereiro 2011 publicado em 22 de fevereiro de 2010 no Diário Oficial da União nº 37, página 72-73
- SUAREZ-QUIROZ, M., GONZALEZ-RIOS, O., BAREL, M., GUYOT, B., SCHORR-GALINDO, S. & GUIRAUD, J.P. Study of ochratoxin A producing strains in coffee processing. Intern. J. Food Sci. Technol., 39: 501-507, 2004.
- TANIWAKI, M.H., PITT, J.I., TEIXEIRA, A.A. & IAMANAKA, B.T. 2003. The source of ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to processing methods. Intern. J. Food Microbiol., 82: 173-179, 2003.
- URBANO, G.R., TANIWAKI, M.H., LEITÃO, M.F. & VICENTINI, M.C. Occurrence of ochratoxin A producing fungi in raw Brazilian coffee. J. Food Prot., 64: 1226-1230, 2001.
- VAN DER STEGEN, G., JORISSEN, U., PITTET, A., SACCON, M., STEINER, W.; VINCENZI, M., WINKLER, M., ZAPP, J., & SCHLATTER, C. Screening of European coffee final products for occurrence of ochratoxin A (OTA). Food Addit. Cont., 14: 211-216, 1997.
- VARGAS, E.A.; SANTOS, E.A. & PITTET, A. Determination of ochratoxin A in green coffee by immunoaffinity column cleanup and liquid chromatography collaborative study. J. AOAC International 58: 773-779, 2005.