



**THAIANA MARINHA DE ALMEIDA SOUSA**

**INCIDÊNCIA DE FUNGOS TOXIGÊNICOS EM  
GRÃOS DE CAFÉ EM MINAS GERAIS E  
PROJEÇÃO DE RISCO DE OCRATOXINA A EM  
FUNÇÃO DO POSSÍVEL AUMENTO DA  
TEMPERATURA UTILIZANDO UM MODELO  
MATEMÁTICO**

**LAVRAS - MG**

**2014**

**THAIANA MARINHA DE ALMEIDA SOUSA**

**INCIDÊNCIA DE FUNGOS TOXIGÊNICOS EM GRÃOS DE CAFÉ EM  
MINAS GERAIS E PROJEÇÃO DE RISCO DE OCRATOXINA A EM  
FUNÇÃO DO POSSÍVEL AUMENTO DA TEMPERATURA  
UTILIZANDO UM MODELO MATEMÁTICO**

Dissertação apresentada à Universidade  
Federal de Lavras, como parte das  
exigências do Programa de Pós-  
Graduação em Ciência dos Alimentos,  
para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Luís Roberto Batista

Coorientadora

Dra. Sara Maria Chalfoun

**LAVRAS - MG**

**2014**

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e  
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Sousa, Thaiana Marinha de Almeida.

Incidência de fungos toxigênicos em grãos de café em Minas Gerais e projeção de risco de Ocratoxina A em função do possível aumento da temperatura global / Thaiana Marinha de Almeida Sousa. – Lavras: UFLA, 2014.

88 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.

Orientador: Luís Roberto Batista.

Bibliografia.

1. *Aspergillus ochraceus*. 2. *Aspergillus carbonarius*. 3. HPLC.  
I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 664.07

**THAIANA MARINHA DE ALMEIDA SOUSA**

**INCIDÊNCIA DE FUNGOS TOXIGÊNICOS EM GRÃOS DE CAFÉ EM  
MINAS GERAIS E PROJEÇÃO DE RISCO DE OCRATOXINA A EM  
FUNÇÃO DO POSSÍVEL AUMENTO DA TEMPERATURA  
UTILIZANDO UM MODELO MATEMÁTICO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 26 de fevereiro de 2014.

Dra. Sara Maria Chalfoun EPAMIG

Dra. Margareth Marin LordeloVolpato EPAMIG

Dr. Luís Roberto Batista

Orientador

**LAVRAS - MG**

**2014**

*Aos meus pais, Gilberto e Isabel,*

DEDICO.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela dádiva da existência.

Ao meu orientador, Dr. Luís Roberto Batista, por ter me concedido a oportunidade, pela confiança e pela amizade. Agradeço também por compartilhar sua sabedoria com paciência e generosidade.

À Dra. Sara Maria Chalfoun, pelos ensinamentos, pela paciência e pela amizade. Aprendi muito com suas virtudes.

Aos meus pais, Gilberto e Isabel, que sempre foram meus exemplos de honestidade e disciplina, que foram responsáveis pela construção do meu caráter e me criaram com a maior dedicação e amor incondicional.

Às minhas queridas irmãs, Andressa e Luiza, minhas verdadeiras amigas, meu porto seguro.

Ao Bruno, pelo incentivo, companheirismo, paciência, compreensão e carinho nesta etapa de minha vida.

Agradeço a Vânia, por seu imenso amor, presente em todos os momentos da minha vida. Minha segunda mãe.

Agradeço aos meus avós, Manuel e Marinha, pelos ensinamentos da vida, pelo amor e carinho sempre.

Às minhas amigas de república que estiveram presentes em minha estadia em Lavras, pela compreensão, companheirismo, ajuda e amizade.

A minha amiga Larissa, que me acompanhou durante todo o mestrado e foi minha grande incentivadora, obrigada pelo companheirismo e amizade.

As colegas de laboratório, pela boa convivência, pela troca de conhecimentos e pela amizade.

Agradeço À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), À Universidade Federal de Lavras (UFLA), ao Departamento de Ciência dos Alimentos (DCA), à Empresa de Pesquisa

Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) e à Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPMIG), pelo apoio financeiro e a oportunidade de fazer o mestrado e realizar o presente estudo.

Agradeço a todos que participaram, de forma direta ou indireta, desta conquista.

## RESUMO

As condições climáticas, a geografia da região produtora e os processos envolvidos na produção de café podem influenciar as características dos frutos e dos grãos de café, podendo torná-los susceptíveis à contaminação fúngica. Este estudo foi realizado com o objetivo de avaliar grãos de café (*Coffea arabica* L.) beneficiados, de três regiões produtoras do estado de Minas Gerais, com relação à incidência de fungos toxigênicos do gênero *Aspergillus*, pertencentes às Seções *Circumdatti* e *Nigri*. As amostras de grãos beneficiados foram coletadas em cooperativas. A técnica utilizada foi de plaqueamento direto em meio DRBC, sendo os resultados expressos em percentual de grãos contaminados. A quantificação da OTA foi realizada por CLAE. O modelo matemático proposto por Maiorano et al. (2009) foi adaptado para avaliar as condições ótimas para o desenvolvimento de *A. ochraceus* e *A. carbonarius*, utilizando dados ecofisiológicos dos fungos, condições ambientais das regiões avaliadas e projeções de elevação da temperatura simuladas pelo IPCC (2001), comparando-se as regiões. Para as regiões foram obtidas diferenças estatísticas significativas entre si para a incidência de fungos. A região da Zona da Mata, segundo o modelo matemático nas condições de temperatura atuais, é a mais próxima das condições ótimas para o desenvolvimento e a produção de OTA por *A. ochraceus*. Para o desenvolvimento e a produção de *A. carbonarius*, a região do Cerrado se adapta melhor às condições atuais de temperatura, corroborando os estudos feitos em laboratório.

Palavras-chave: *Aspergillus ochraceus*. *Aspergillus carbonarius*. HPLC. Modelo matemático.

## ABSTRACT

Climatic conditions, the geography of the producing region and the processes involved in the production of coffee can influence the characteristics of the fruit and coffee beans, which may make them susceptible to fungal contamination. The aim of this study was to evaluate processed coffee beans (*Coffea arabica* L.) from 3 producing regions of the state of Minas Gerais, with regard to the incidence of toxigenic fungi of the genus *Aspergillus*, belonging to Sections *Circumdatti* and *Nigri*. Samples of processed grains were collected in cooperatives. The technique used was the direct plating amid DRBC, and the results expressed no percentage of contaminated grains. Quantification of OTA was performed by HPLC. The mathematical model proposed by Maiorano et al., (2009) was adapted to assess the optimal conditions for the development of *A. ochraceus* and *A. carbonarius* using ecophysiological data of the fungi, environmental conditions of the regions evaluated and rising temperature projections simulated by the IPCC (2001) comparing regions. The regions have statistically significant differences between them for the incidence of fungi. The Zona da Mata region, according to the mathematical model under the conditions of current temperature, is the region closest to the optimum conditions for the development and production of OTA by *A. ochraceus*. For development and production of *Aspergillus carbonarius*, the Cerrado best fits the current temperature conditions, corroborating the laboratory studies .

Keywords: *Aspergillus ochraceus*. *Aspergillus carbonarius*. HPLC. Mathematical model.

## SUMÁRIO

	<b>CAPÍTULO 1</b> Introdução geral .....	10
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	10
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	12
<b>2.1</b>	<b>O café no Brasil</b> .....	12
<b>2.2</b>	<b>Impacto das mudanças climáticas na produção de café</b> .....	15
<b>2.3</b>	<b>Fungos toxigênicos na produção de café</b> .....	18
<b>2.4</b>	<b>Ocratoxina A em café</b> .....	19
<b>2.5</b>	<b>Fatores que interferem no desenvolvimento de fungos toxigênicos e produção de micotoxinas</b> .....	23
<b>2.6</b>	<b>Utilização de modelos matemáticos</b> .....	25
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	28
	<b>CAPÍTULO 2</b> Distribuição de espécies toxigênicas e produção de ocratoxina a em grãos crus de café ( <i>Coffea arabica</i> L.) de diferentes regiões de minas gerais.....	38
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	40
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	42
<b>2.1</b>	<b>Condução do experimento</b> .....	42
<b>2.2</b>	<b>Isolamento de fungos potencialmente ocratoxigênicos</b> .....	45
<b>2.3</b>	<b>Avaliação do potencial ocratoxigênico dos isolados pelo método Plug Agar</b> .....	46
<b>2.4</b>	<b>Análise de ocratoxina A em grãos de café por CLAE</b> .....	47
<b>2.5</b>	<b>Aplicação de modelo matemático</b> .....	49
<b>2.6</b>	<b>Análises estatísticas</b> .....	50
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	52
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	76
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	77
	<b>ANEXOS</b> .....	87

## CAPÍTULO 1

### INTRODUÇÃO GERAL

#### 1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de café e, a partir da década de 1960, a cafeicultura brasileira passou por uma grande transformação, garantindo participação no mercado mundial. As mudanças que ocorreram a partir desta época focaram, principalmente, na elevação da produtividade e também nos aspectos relacionados com a qualidade final do produto (CORTEZ, 1997). Devido à grande demanda e às maiores exigências do mercado consumidor por cafés com qualidade superior, muitos esforços têm sido feitos, no que diz respeito ao conhecimento dos fatores que influenciam a produção de cafés de melhor qualidade (GIOMO; BORÉM, 2011).

Segundo Chalfoun (2011), apesar de os estudos sobre a microbiota do café e a sua influência na qualidade da bebida serem antigos, somente a partir dos anos 1990 eles foram aprofundados em relação às populações de microrganismos. Desde então, inúmeros gêneros de fungos filamentosos foram identificados e relacionados com a produção de café e sua qualidade (FREITAS, 2000).

Algumas das espécies de fungos filamentosos que podem sintetizar metabolitos tóxicos são dos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*. Estes metabólitos são denominados micotoxinas e a ingestão deles, por animais ou humanos, mesmo em baixas concentrações, pode causar danos à saúde. De acordo com características ambientais e químicas do café, a micotoxina de maior interesse na produção cafeeira é a ocratoxina A (CHALFOUN; BATISTA, 2003; BATISTA et al., 2003). De acordo com Taniwaki et al. (2003), a produção de micotoxinas

por fungos toxigênicos depende de fatores intrínsecos e extrínsecos, como substrato, umidade e temperatura.

Os parâmetros macroclimáticos considerados ideais para a obtenção de bebida de qualidade podem ser facilmente influenciados pelas mudanças climáticas, visto que o aumento da temperatura e de umidade pode afetar a composição química da mucilagem do café, o tipo de atividade microbiana e a intensidade do processo fermentativo (ALVES; VOLPATO; VIEIRA, 2011). Portanto, mesmo as regiões consideradas aptas à produção de café de boa qualidade têm diferenças climáticas que acarretam em variações nas características do produto e também na incidência de fungos produtores de micotoxinas.

O estado de Minas Gerais, devido à sua extensão territorial, destaca-se por apresentar grande diversidade de climas (CUPOLILLO, 1997) e regiões cafeeiras bastante distintas, podendo apresentar, conseqüentemente, características microbiológicas também diferentes (POZZA; ALVES, 2008). Conhecer o potencial toxigênico do café proveniente de cada uma das regiões produtoras do estado torna-se fundamental para apoiar as pesquisas sobre a qualidade dos cafés do Brasil.

A partir do exposto, o estudo foi realizado com os objetivos de avaliar a distribuição das espécies toxigênicas e a produção da ocratoxina A em grãos de café produzidos nas regiões Sul de Minas, Cerrado e Zona da Mata, do estado de Minas Gerais, avaliar a concentração de OTA das amostras, bem como estimar, por meio de um modelo matemático, a influência da temperatura na germinação, no crescimento e na síntese de OTA por *A. ochraceus* e *A. carbonarius*, com relação à média de temperatura atual das regiões estudadas e em função das possíveis mudanças climáticas estimadas pelo *Intergovernmental Panel on Climate Change* (IPCC), ou Painel Internacional sobre Mudanças Climáticas.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 O café no Brasil

O café foi introduzido no Brasil em 1727, trazido da Guiana Francesa. Já naquela época, tinha grande valor comercial, justificando o interesse pelo seu cultivo e se tornando um dos principais produtos agrícolas no mundo, sendo produzido por mais de 50 países em diversos continentes (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2010). Durante toda a sua história, o café tem absorvido grande quantidade de mão de obra, sendo uma importante fonte de renda para a economia do país e contribuído significativamente como uma *commodity* na formação do capital no setor agrícola brasileiro (VILELA, 2011).

Devido às condições climáticas favoráveis, o cultivo do café se espalhou rapidamente pelo Brasil. Em sua trajetória pelo país, passou por Maranhão, Bahia, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Minas Gerais (MATIELLO et al., 2005). Atualmente, a produção de café concentra-se em São Paulo, Minas Gerais, Paraná, Bahia e Espírito Santo (ALVES; VOLPATO; VIEIRA, 2011)

As duas principais espécies comercialmente importantes dentro do gênero *Coffea* são *Coffea arabica* L. e *Coffea canephora* Pierre. Cerca de 70% dos plantios comerciais são do tipo arábica, devido, principalmente, à qualidade superior de sua bebida, conduzindo, assim, para a valorização significativa do mercado (POZZA; ALVES, 2008; MEDINA FILHO; BORDIGNON, 2003).

A maior produção de café arábica no Brasil, hoje, se concentra no estado de Minas Gerais, com produção equivalente a 27,9 milhões de sacas no ano de 2013, que representa 50% da safra nacional (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2010). De acordo com o Instituto Mineiro de Agropecuária (INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA, 1995), o estado

apresenta um parque cafeeiro com cerca de 1 milhão de hectares de lavouras divididas em regiões muito bem estabelecidas: Sul de Minas (sul/sudoeste), Matas de Minas (Zona da Mata/Rio Doce), Cerrado de Minas (Triângulo Mineiro/Alto Paranaíba) e Chapadas de Minas (Vale do Jequitinhonha/Mucuri).

As regiões cafeeiras no estado de Minas Gerais apresentam características distintas em relação às condições climáticas. Quanto à temperatura, as diversas regiões produtoras de café sofrem a influência das interações entre latitude e longitude, devido à sua grande extensão territorial, que vai do extremo sul, com temperaturas mais amenas, ao extremo norte, com temperaturas mais quentes (ALVES; VOLPATO; VIEIRA, 2011).

Segundo Barbosa et al. (2011), as variações nas condições ambientais ocorridas na produção de café no país afetam significativamente a qualidade dos grãos e, conseqüentemente, da bebida.

Na Tabela 1 estão dispostos os valores de volume em mil sacas de 60 kg, para exportação mundial de café pelos principais países produtores, nos anos de 2011, 2012 e 2013 (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ, 2014).

Tabela 1 Principais países produtores de café (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ, 2014)

<b>Países</b>	<b>2013</b>	<b>2012</b>	<b>2011</b>
<b>Brasil</b>	<b>32.010</b>	<b>28.735</b>	<b>33.610</b>
Vietnã	26.000	25.475	17.675
Indonésia	11.000	10.614	6.159
Colômbia	7.200	7.170	7.734
Honduras	5.600	5.508	3.947
Índia	5.300	5.288	5.840
Peru	4.400	4.310	4.697
Guatemala	400	3.750	3.697
México	3.500	3.556	2.907
Etiópia	2.300	3.203	2.675
Uganda	2.700	2.685	3.142
Nicarágua	2.000	1.987	1.468
Costa do Marfim	1.730	1.712	772
Costa Rica	1.380	1.374	1.243
El Salvador	1.050	1.044	1.826

Os valores, em volume de mil sacas de 60 kg de café beneficiado, produzidos nos estados brasileiros, na safra de 2013, estão dispostos na Tabela 2 (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ, 2014).

Tabela 2 Produção de café beneficiado no Brasil (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ, 2014)

Região	Produção	
	Arábica	Robusta
<b>Minas Gerais</b>	<b>27.380</b>	280
Sul -Centro-Oeste	<b>13.355</b>	-
Triângulo, Alto Paranaíba e Noroeste	<b>5.213</b>	-
Zona da Mata, Rio Doce e Central	<b>8.133</b>	182
Norte, Jequitinhonha e Mucuri	679	98
<b>Espírito Santo</b>	3.486	8.211
<b>São Paulo</b>	4.010	-
<b>Paraná</b>	1.650	-
<b>Bahia</b>	1.080	723
Cerrado	399	-
Planalto	681	-
Atlântico	-	723
<b>Rondônia</b>	-	1.357
<b>Mato Grosso</b>	2	170
<b>Pará</b>	-	122
<b>Rio de Janeiro</b>	281	-
Outros	132	3
<b>Brasil</b>	<b>38.286</b>	<b>10.866</b>

## 2.2 Impacto das mudanças climáticas na produção de café

O efeito acumulativo contínuo das emissões excessivas de gases de efeito estufa e aerossóis é responsável pelas mudanças climáticas. A concentração destes gases aumentou significativamente durante os últimos 150 anos e, com isso, causando um aquecimento incomum no planeta (POZZA; ALVES, 2008). Os problemas com as mudanças climáticas levaram a *United Nations Environment Programme* (UNEP) e a Organização Meteorológica Mundial (OMM) desenvolverem o *Intergovernmental Panel on Climate Change* (IPCC), no ano de 1988.

O Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas (ou IPCC, sigla em inglês) tem como missão analisar as informações científicas relacionadas às mudanças climáticas, para avaliar as consequências ambientais e socioeconômicas das alterações climáticas, e formular estratégias de resposta reais. O IPCC, desde então, desempenha papel importante, ajudando os governos a adotar e a implementar políticas em resposta às mudanças climáticas (INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE, 2007). Desde a sua criação, o IPCC produziu uma série de relatórios de avaliação especiais, documentos técnicos e relatórios de metodologia que se tornaram trabalhos de referência padrão, amplamente utilizada por políticos, cientistas, outros especialistas e estudantes.

No século XX, a temperatura média global aumentou 0,65 °C. O aumento mais evidente ocorreu na década de 1990, ocasionando mudanças no movimento atmosférico, na precipitação e na umidade, tendo como consequência mudanças nos agroecossistemas. A elevação da precipitação foi de 0,2% a 0,3%, na região tropical, compreendida entre 10° de latitude Sul e 10° de latitude Norte. As possíveis causas dessas alterações compreendem fatores de ordem natural ou antropogênica, sendo um ou outro fator ou a soma dos dois (INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE, 2004).

Simulações de modelos globais, com diferentes cenários, concordam com um aumento na média das concentrações de vapor d'água na atmosfera e também com um aumento nas precipitações até o final do século XXI. Prevê-se, ainda, um aumento de 9 a 88 cm do nível médio do mar, no período de 1990 a 2100. Com a temperatura elevada, aumenta a capacidade do ar de reter vapor d'água e a consequência é uma maior demanda hídrica. Portanto, havendo alterações, os ecossistemas de plantas poderão aumentar sua biodiversidade ou sofrer influências negativas (ASSAD et al., 2004).

Segundo Alves, Volpato e Vieira (2011), o Brasil é um país com grande dimensão territorial e conta com diversidade de solo, de topografia e heterogeneidade climática. Para Pellegrino, Assad e Marin (2007), ao considerar os prognósticos de aumento das temperaturas, admite-se que as regiões nas quais o clima é o limite à delimitação de cultivo adequado de certas culturas serão desfavoráveis ao desenvolvimento das mesmas, porém, culturas tolerantes a altas temperaturas serão beneficiadas até ao seu limite de tolerância ao estresse térmico. Em regiões de baixas temperaturas, que atualmente são limitantes ao desenvolvimento de culturas suscetíveis a geadas, se houver um aumento do nível térmico sob influência do aquecimento global, haverá condições favoráveis ao desenvolvimento. Nas plantas, a atividade fotossintética é diretamente proporcional ao aumento da temperatura (ABMED et al., 2012; CARAMORI et al., 2001).

Camargo (1985) afirma que, ao se tratar de café, para a espécie *Coffea arabica*, as médias anuais ótimas de temperatura situam-se entre 18 °C e 22 °C; com a ocorrência frequente de temperaturas máximas superiores a 34 °C poderão ocorrer abortamento de flores e, conseqüentemente, diminuição na produtividade. Temperaturas entre 28 °C e 33 °C provocam redução na produção de folhas e na atividade fotossintética do cafeeiro (DRINNAN; MENZEL, 1995). Segundo Marengo e Nobre (2001), o número de frentes frias relacionadas às geadas intensas no sul do Brasil diminuiu com o decorrer do tempo, havendo uma tendência de invernos mais quentes. Apesar disso, entre os anos de 1882 e 2000, foram identificadas 42 geadas prejudiciais ao cafeeiro, nas regiões sul e sudeste, com 35% dos eventos provocando perdas na produção.

Em estudo realizado por Assad et al. (2004), avaliando o impacto das mudanças climáticas no efeito do zoneamento agroclimático do café no Brasil, foi demonstrado que, com o aumento da temperatura média anual do ar de 1 °C, 3 °C e 5,8 °C, haverá grande alteração nas regiões consideradas aptas para o

cultivo do cafeeiro. Em Minas Gerais, foram identificadas cinco condições: região para cafeicultura com irrigação necessária, região com aptidão natural, região inapta por excesso térmico (temperatura média anual maior que 23 °C), região apta, mas com risco de geada e região inapta.

### 2.3 Fungos toxigênicos na produção de café

Os fungos que produzem micotoxina (ocratoxina A), cuja ingestão é considerada grave para a saúde humana, são um grande problema para a indústria de café (GAMA; TEIXEIRA; GARCIA, 2006). O potencial toxigênico de um fungo está ligado à habilidade de certa linhagem em produzir metabólitos tóxicos. Dois fatores ligados à presença da micotoxina no alimento são: fatores intrínsecos, que dependem da linhagem ou das espécies dos fungos e os fatores extrínsecos, que dependem do ambiente (BARS; BARS, 2000). De acordo com Batista et al. (2003), é atribuído às espécies do gênero *Aspergillus*, pertencentes às Seções *Circumdatti* e *Nigri*, a presença de OTA em café.

As principais espécies de fungos toxigênicos isoladas de grãos de café são pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* e *Cladosporium* (MARTINS; MARTINS; GIMENO, 2003). A presença do fungo *Aspergillus ochraceus* está associada à ocratoxina A, principal micotoxina estudada em grãos de café (CAMPOS et al., 2009; CHALFOUN; BATISTA, 2003).

A ocratoxina A tem sido encontrada como metabólito de muitas espécies diferentes de *Aspergillus*, incluindo *Aspergillus alliaceus*, *Aspergillus auricomus*, *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus melleus* e, raramente, *Aspergillus niger* e, como os *Aspergillus niger* são muito utilizados na produção de enzimas e do ácido cítrico, é importante garantir que não sejam contaminados (BAYMAN et al., 2002). Chalfoun e Batista (2003) afirmam que a principal

micotoxina estudada em café é a ocratoxina A, atribuída especialmente ao fungo *Aspergillus ochraceus* e espécies relacionadas, *Aspergillus carbonarius* e, raramente, por *Aspergillus niger*.

As espécies *A. ochraceus*, *A. melleus*, *A. auricomus*, *A. ostianus*, *A. petrakii*, *A. sclerotiorum* e *A. sulfureus* pertencem à secção *Circumdati*, também chamada de grupo *A. ochraceus*; as espécies *A. alliaceus* e *A. albertensis*, anteriormente colocadas na secção *Circumdati*, foram recentemente relacionadas com a secção *Flavi*. As espécies *A. niger* e *A. carbonarius* pertencem à *Seção Nigri* (PETERSOM, 2000). No entanto, poucas destas espécies são conhecidas por contaminar produtos alimentícios com ocratoxina A.

As espécies de *Aspergillus* da seção *Nigri* possuem conídios de cor preta ou próxima ao preto; já as de seção *Circumdati* apresentam conídios variando do amarelo ao ocre (PERRONE et al., 2007).

De acordo com Pitt (2000), a ocratoxina A é produzida por *Penicillium verrucosum* em grãos de cereais em climas frios, por *A. carbonarius* em uvas, vinhos e frutos de videira e por *Aspergillus ochraceus*, nos grãos de café.

## 2.4 Ocratoxina A em café

O café pode conter compostos indesejáveis que podem estar presentes intrinsecamente no grão, na produção primária ou no processo industrial. Um dos mais relevantes e prejudiciais compostos no café é a ocratoxina A (OTA) (FERRAZ et al., 2010). Chalfoun e Carvalho (1998) observaram, nos frutos cereja de maturação, predominância de fungos toxigênicos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, em que a contaminação foi superficial, verificando-se que, mesmo presente nesta etapa, ainda não infectavam os grãos.

A ocratoxina A tem fórmula empírica  $C_{20}H_{18}O_6NC_1$  (Figura 1), com peso molecular de 403.822 Da. É altamente solúvel em solventes orgânicos

polares, solúvel em solução aquosa de hidrogenocarbonato, fracamente solúvel em água e termoestável (ABRUNHOSA, 2008).

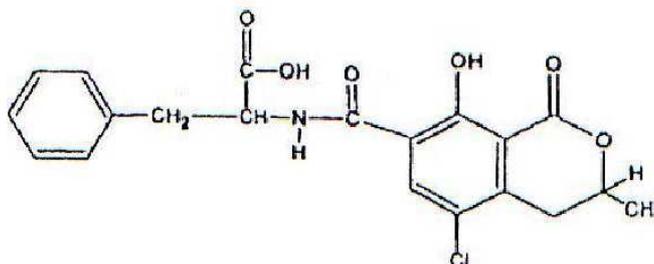


Figura 1 Estrutura química da ocratoxina A

O grupo das micotoxinas designadas como ocratoxinas (ocratoxina A, B e C) é caracterizado por apresentar estrutura molecular que consiste, basicamente, de uma  $\beta$ -fenilalanina ligada a uma isocumarina, mediante uma ligação amida. A ocratoxina A (OTA) apresenta fluorescência verde, quando exposta a luz ultravioleta e tem uma molécula de cloro em sua estrutura, responsável pelo caráter tóxico (EDWARDS; O'CALLAGHAN; DOBSON, 2002).

Segundo Bennett e Klich (2003), não é apenas difícil definir as micotoxinas; a dificuldade está também em classificá-las. Por terem muitas estruturas químicas e biossintéticas e várias origens, sua infinidade de efeitos biológicos é produzida por várias espécies de fungos diferentes. Para os médicos, as micotoxinas podem ser hepatotoxinas, neurotoxinas, imunotoxinas e nefrotóxicas, dentre outras. Já para os biólogos e os grupos genéricos, as micotoxinas podem ser mutagênicas, alergênicas, teratogênicas e cancerígenas.

Joosten et al. (2001) afirmam, de forma abrangente, que a ocratoxina A é uma micotoxina nefrotóxica e nefrocarcinogênica, encontrada em variados

produtos alimentícios, incluindo cereais, nozes, grãos de café, frutas secas, pimentas, vinhos e cervejas.

A absorção da ocratoxina é feita pelo trato gastrointestinal e, posteriormente, entra na corrente sanguínea e liga-se a proteínas do soro, principalmente a albumina. Por ocorrer uma reabsorção ativa pelo túbulo proximal no sistema de transporte de ânions, acumulam-se altas concentrações de OTA nos rins. Então, em mamíferos, a maior toxicidade de ocratoxina está relacionada a este órgão (FUNGARO et al., 2004).

De acordo com Miraglia et al. (1998), a detecção de ocratoxina A no sangue humano serve como um indicador de risco de contaminação. Resultados das análises de amostras de soro humano atestam uma grande e contínua exposição à micotoxina e ingestão de alimento contaminado.

Steyn (1984) sugere que a OTA ainda pode ser relacionada ao desenvolvimento de tumores do trato urinário e a outra nefropatia endêmica nos Balkans, que é considerada uma doença renal crônica. Essa micotoxina inibe a síntese proteica tanto *in vitro* como *in vivo*, por meio de competição com a fenilalanina e, ainda, aumenta a peroxidação lipídica, o que leva a célula a ter um dano mitocondrial (GOLLUCKE; TANIWAKI; TAVARES, 2004). Ainda pode induzir mutações gênicas por meio de mecanismos genotóxicos ainda não muito claros (RINALDI et al., 2007). Höhler (1998) ainda sugere que a OTA parece ser capaz de induzir mecanismos de estresse oxidativo, com a formação de radicais livres e de espécies reativas de oxigênio, responsáveis pela citotoxicidade. A peroxidação dos ácidos gordos poli-insaturados membranares leva à alteração da permeabilidade iônica da membrana. Este mecanismo interfere também nas membranas mitocondriais, sendo o suposto responsável pelos efeitos observados nas mitocôndrias.

A FAO/OMS e o JECFA estabeleceram uma dose provisória semanal admissível de 100 ng por peso corporal. Apesar de um contribuinte menor para a

ingestão de OTA, o café tem recebido atenção especial, nos últimos anos. Alguns países, como Itália, Suíça, Finlândia e Grécia, já estabeleceram limites regulamentares com valores máximos de OTA que vão de 4 a 20 ppb (ng/g) (GOLLUCKE; TANIWAKI; TAVARES, 2004).

O café merece atenção por ser um produto cujos limites de níveis de ocorrência de micotoxina podem criar barreias em sua comercialização (PIMENTA; VILELA, 2003). E, como a torrefação do grão não consegue reduzir significativamente a concentração de OTA, a bebida final também pode ser uma importante fonte da micotoxina na dieta. Studer-Rohr et al. (1995) afirma que a ligeira redução da micotoxina entre o grão de café verde e torrado pode ser devido à remoção física com a palha e, ainda, à degradação térmica da OTA.

Na legislação que vigora no Brasil desde 18 de fevereiro de 2011, a RDC n° 7 estabeleceu limites máximos toleráveis (LMT) de ocratoxina A para alguns alimentos, como café, feijão, especiarias e vinho, conforme publicado no Diário Oficial da União n.7, Seção 1, p.756 de 18 de fevereiro de 2011 (Tabela 3).

Para a determinação da OTA em alimentos existem vários métodos, dentre eles cromatografia de camada delgada, cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), cromatografia líquida de massa espectroscopia (LC-MS) e o teste imunoenzimático *enzyme-linked immunosorbent assay*, ou Elisa (TURNER; SUBRAHMANYAM; PILETSKY, 2009).

Tabela 3 Limite máximo tolerável (LMT) para ocratoxina A no Brasil, segundo RDC n° 7, de 18 de fevereiro de 2011

Alimento	MT ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) <sup>L</sup>
Cereais e produtos de cereais, incluindo cevada malteada	10
Feijão	10
Café torrado (moído ou em grão) e café solúvel	10
Vinho e seus derivados	2
Suco de uva e polpa de uva	2
Especiarias	30
Alimentos à base de cereais para alimentação infantil	2
Produtos de cacau e chocolate	5
Amêndoa de cacau	10
Frutas secas e desidratadas	10

## 2.5 Fatores que interferem no desenvolvimento de fungos toxigênicos e produção de micotoxinas

Bars e Bars (2000) afirmam que o fungo *A. ochraceus* desenvolve-se em uma grande faixa de temperatura que vai de 8 °C a 30 °C, porém, a temperatura ótima de crescimento está na faixa de 25 °C a 30 °C e  $a_w$  mínima para o desenvolvimento é de 0,76; para a produção de ocratoxina A, atividade de água mínima de 0,85 e ótima variando de 0,95 a 0,99.

Para que haja a produção das micotoxinas, o substrato tem que ser ideal para o crescimento, bem como o teor de umidade, a temperatura e a presença da

microflora competitiva devem interagir para influenciar o nível de toxina produzida (SAVA et al., 2006).

As condições climáticas que ocorrem em diversas altitudes constituem um importante fator no processamento do café e influenciam a qualidade do mesmo. As regiões cujos altos níveis de umidade relativa do ar são elevados nos períodos de pré-colheita, colheita e pós-colheita apresentam bebidas de pior qualidade, pois essas condições favorecem o crescimento microbiano (MATIELLO, 1991).

De acordo com Batista (2003), os fungos toxigênicos produtores de micotoxinas podem estar presentes desde o ambiente das lavouras até o preparo e o armazenamento do café. Além disso, as condições ambientais, bem como o manejo da cultura e o processamento pós-colheita, irão interferir diretamente na qualidade e na segurança do produto final.

A invasão de insetos em um lote de grãos de café pode predispor o desenvolvimento de fungos, pois, pela sua atividade metabólica, aumenta o teor de umidade e a temperatura da massa do grão (PEZZINI; VALDUGA; CANSIANI, 2005).

Suárez-Quiroz et al. (2004) pesquisaram o efeito da atividade água ( $A_w$ ) na produção de OTA, sendo este um dos principais fatores relacionados ao crescimento dos fungos e à produção de toxina. A atividade de água ótima para o crescimento do fungo e a produção de toxina foi de 0,95. A secagem foi a fase crítica do processamento do café; nesta etapa, as condições são propícias para *A. ochraceus* por até 2 dias. Os autores obtiveram resultados semelhantes aos publicados por Taniwaki et al. (2003). Nas  $A_w$  de 0,80, 0,87 e 0,95, observou-se produção de OTA de 0; 15; 2.500 e 7.200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , respectivamente.

A contaminação dos grãos de café pode ocorrer em ambas as fases do processamento, principalmente na lavagem, na fermentação e na secagem. Espécies de *Aspergillus* ocratoxigênicos infestam os grãos também na etapa de

secagem e, conseqüentemente, podem ser contaminadas pela ocratoxina A (BUCHELI; TANIWAKI, 2002).

Vários fatores, dentre eles umidade, temperatura e tipo de substrato, desempenham importante papel no desenvolvimento de linhagens produtoras de OTA. Os fatores que afetam o desenvolvimento dos fungos durante o armazenamento são atividade da água ( $A_w$ ) e temperatura. As condições para o crescimento de fungos e a produção de OTA nos grãos de café, tais como o teor de umidade dos grãos, temperatura, tempo, condição física (grãos danificados), sanitização do grão, inóculo do fungo, conteúdo de oxigênio e tempo de armazenamento dos grãos, têm sido descritos (TANIWAKI et al., 2001 apud SUÁREZ-QUIROZ et al., 2004).

Várias espécies de *Penicillium* e *Aspergillus* crescem em ambientes com baixa umidade, onde podem crescer e multiplicar em qualquer matéria orgânica que contenha grau de umidade que equilibre com a umidade do ambiente entre 65% e 90%. Os microrganismos estão entre os mais bem sucedidos e abundantes organismos vivos, sendo, normalmente, associados a grãos armazenados ou danificados (CHALFOUN; BATISTA, 2003).

## **2.6 Utilização de modelos matemáticos**

Em vários estudos utilizam-se os modelos matemáticos como forma preditiva para resultados futuros. No que se refere ao crescimento das plantas, que obedece a certos princípios fisiológicos, ele pode ser descrito, em termos quantitativos, até certo ponto, por equações matemáticas (VISMARA; OLIVEIRA; KARAMAM, 2007). Dada a complexidade dos sistemas de manejo e os riscos ambientais, a modelagem matemática é uma ferramenta possivelmente valiosa (DOYLE, 1997).

De acordo com Rockland (1957), uma das vantagens da utilização de modelos matemáticos na predição das isotermas de adsorção de umidade está no fato de que, com poucos pontos experimentais, pode-se construir uma isoterma, a qual pode ser facilmente interpolada ou extrapolada para a obtenção de pontos nas regiões de baixas e altas  $A_w$ , pontos estes de difícil determinação experimental, devido à limitação das baixas  $A_w$  e o desenvolvimento de fungos.

Maiorano et al. (2009) utilizaram um modelo matemático que estimava produção de fumonisina por *F. verticillioides*, na Itália e, depois, ele foi aplicado em situações na Holanda, somente para predições sobre micotoxinas. Análogo ao modelo de Maiorano et al. (2009), foi descrito um modelo utilizando temperatura cardinal, proposto por Rosso et al. (1993) e adaptado para germinação, crescimento e síntese de zearalanona e desoxinivalenol.

Outro modelo foi descrito, utilizando conceitos de temperatura, por Zwietering, Wit e Notermans (1996), e trouxe resultados ótimos para germinação, utilizando dados do *F. graminearum* (BEYER et al., 2004), comparado também ao modelo Maiorano et al. (2009).

Atualmente, existem poucos modelos que preveem níveis de micotoxinas (VAN DER FELS-KLERX et al., 2010).

Sabe-se que os efeitos das mudanças climáticas podem ser aumento de latência, mudanças nas taxas de crescimento populacional, aumento do número de gerações e extensão da temporada de desenvolvimento (PORTER et al., 1991). Temperatura e umidade são os principais fatores climáticos que influenciam a infecção fúngica e o crescimento na cultura do milho (DOOHAN; BRENNAN; COOKE, 2003).

Um modelo mecanicista, ou mecânico, é construído a partir do conhecimento do processo biológico subjacente, que representa as relações de causa e efeito entre as variáveis (GARCIA et al., 2009). No entanto, os modelos empíricos se desenvolvem utilizando dados do local e explorando as

dificuldades da região, são preditivos e relatam parâmetros agronômicos, climáticos e condições climáticas para a germinação, o crescimento e a síntese de toxina pelo fungo (PRANDINI et al., 2009; ARINO et al., 2009).

De acordo com o nosso conhecimento, o atual modelo, adaptado ao modelo proposto por Maiorano et al. (2009) e utilizado no presente estudo, será a primeira tentativa de quantificar OTA em parâmetros meteorológicos e em condições fenológicas.

## REFERÊNCIAS

- ABMED, S. A. et al. Agriculture and trade opportunities for Tanzania: past volatility and future climate change. **Policy Research Working Paper**, Helsinck, v. 16, n. 3, p. 1-32, Aug. 2012.
- ABRUNHOSA, L. J. **Estratégias para o controle de ocratoxina A em alimentos**. 2008. 236 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química e Biológica) - Escola de Engenharia, Universidade do Minho, Portugal, 2008.
- ABRUNHOSA, L.; FERNANDES, A.; VENÂNCIO, A. Ochratoxin A removal during the main steps of wine making. In: ENCONTRO DE QUÍMICA DOS ALIMENTOS, 7., 2005, São Paulo. **Anais...** São Paulo: IPV, 2005. p. 13-16.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 22 fev. 2011.
- ALVES, H. M. R.; VOLPATO, M. M. L.; VIEIRA, T. G. C. Características ambientais e qualidade da bebida dos cafés do estado de Minas Gerais. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 32, n. 261, p.18-29, abr. 2011.
- ARINO, A. et al. Aflatoxins in bulk and pre-packed pistachios sold in Spain and effect of roasting. **Food Control**, Guildford, v. 20, n. 9, p. 811–814, Sept. 2009.
- ASSAD, E. D. et al. Impacto das mudanças climáticas no zoneamento agroclimático do café no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 11, p. 1057–1064, nov. 2004.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ. Indicadores da indústria. Brasília: ABIC, 2014. Disponível em: <[www.abic.com.br](http://www.abic.com.br)>. Acesso em: 07 jan. 2014.

BARBOSA, J. N. et al. Distribuição espacial de cafés do estado de Minas Gerais e sua relação com a qualidade. **Coffee Science**, Lavras, v. 5, n. 3, p. 237-250, set./dez. 2011.

BARS, L. L.; BARS, P. L. Mycotoxigenic in grains application to mycotoxic prevention in coffee. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL SOBRE BIOTECNOLOGIA NA AGROINDUSTRIA BRASILEIRA, 3., 2000, Londrina. **Anais...** Londrina: IAPAR, 2000.

BATISTA, L. R. et al. Toxigenic fungi associated with processed (green) coffee beans (*Coffea arabica* L.). **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 85, n. 3, p. 293-300, Aug. 2003.

BATISTA, L. R.; CHALFOUN, S. M. Incidência de ocratoxina A em diferentes frações do café (*Coffea arabica* L.): bóia, mistura e varrição após secagem em terreiros de terra, asfalto e cimento. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 3, p. 804-813, maio/jun. 2007.

BAYMAN, P. J. L. et al. Ochratoxin production by the *Aspergillus ochraceus* group and *Aspergillus alliaceus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 5, p. 2326–2329, May 2002.

BENNET, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Review**. Washington, v.16, n. 3, p. 497-516, July 2003.

BEYER, M. et al. Germination and survival of *Fusarium graminearum* macroconidia as affected by environmental factors. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 152, n. 2, p. 92-97, Feb. 2004.

BUCHELI, P.; TANIWAKI, M. H. Research on the origin, and the impact of post-harvest handling and manufacturing on the presence of ochratoxin A in coffee. **Review Food Additives and Contaminants**, London, v. 19, n. 7, p. 655-665, July 2002.

CAMARGO, A. P. C. Clima e a cafeicultura no Brasil. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, n. 126, p. 13-26, 1985.

CAMPOS, R. da S. et al. Fungos micotoxigênicos e ocratoxina A em cafés com permanência prolongada na planta e no solo, colhidos nas regiões do cerrado mineiro e baiano. **Coffee Science**, Lavras, v. 4, n. 2, p. 136-148, jul./dez. 2009.

CARAMORI, P. H. et. al. Zoneamento de riscos climáticos para a cultura de café (*Coffea arábica*) no Estado do Paraná. **Revista Brasileira de Agrometeorologia**, Fortaleza, v. 41, n. 3, p. 486-494, jul./set. 2001.

CHAUFOUN, S. M.; BATISTA, L. R. **Fungos associados a frutos e grãos de café *Aspergillus* & *Penicillium***. Brasília: Embrapa, 2003.

CHAUFOUN, S. M. Microrganismos e qualidade do café. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, n. 261, p. 94-100, 2011.

CHAUFOUN, S. M.; CARVALHO, V. D. **Cafeicultura empresarial: produtividade e qualidade: colheita e preparo do café**. Lavras: Editora da UFLA, 1998.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira: café levantamentos de safra**. Brasília: CONAB, 2010. Disponível em: <[www.conab.gov.br](http://www.conab.gov.br)>. Acesso em: 12 dez. 2013.

CORTEZ, J. G. Aptidão climática para a qualidade da bebida nas principais regiões cafeeiras de Minas Gerais. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 18, n. 187, p. 27-31, 1997.

CUPOLILLO, F. **Períodos de estiagem durante a estação chuvosa no Estado de Minas Gerais: espacialização e aspectos dinâmicos relacionados**. 1997. 134 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1997.

DOOHAN, F. M.; BRENNAN, J.; COOKE, B. M. Influence of climatic factors on *Fusarium* species pathogenic EUR. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 109, p. 755-768, 2003.

DOYLE, C. J. A review of the use of models of weed control in integrated crop protection. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, Amsterdam, v. 64, n. 2, p. 165-172, July 1997.

DRINNAN, J. E.; MENZEL, C. M. Temperature affects vegetative growth and flowering of coffee (*Coffea arabica* L.). **Journal of Horticultural Science**, London, v. 70, n. 1, p. 25-34, Jan. 1995.

EDWARDS, S. G.; O'CALLAGHAN, J.; DOBSON, A. D. W. PCR-based detection and quantification of mycotoxigenic fungi. **Mycological Research**, London, v. 106, n. 6, p. 1005- 1025, Sept. 2002.

FERRAZ, M. B. M. et al. Kinetics of ochratoxin A destruction during coffee roasting. **Food Control**, Guildford, v. 21, n. 6, p. 872-877, June 2010.

FREITAS, R. F. **Fungos associados a grãos de café (*Coffea arabica* L.) beneficiado em diversos municípios da região sul de Minas Gerais**. 2000. 72 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000.

FUJII, S. **Imuno ensaio na detecção de ocratoxina A e efeito de cafeína sobre microbiota fúngica**. 2002. 108 p. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, 2002.

FUNGARO, M. H. P. et al. A Molecular method for detection of *Aspergillus carbonarius* on coffee beans. **Current Microbiology**, New York, v. 49, n. 2, p. 123-127, Aug. 2004.

GAMA, F. C.; TEIXEIRA, C. A.; GARCIA, A. Diversidade de fungos filamentosos associados a *hypothermushampeii* (Ferrari) (Coleoptera:

Scolytidae) e suas galerias em frutos de coffeacanephora (Pierre). **Neotropical Entomology**: ecology, behavior and bionomics, Porto Velho, v. 5, n. 35, p. 573-578, out. 2006.

GARCIA, D. et al. Predicting mycotoxins in foods: a review. **Food Microbiology**, London, v. 26, n. 8, p. 757-769, Dec. 2009.

GIOMO, G. S.; BORÉM, F. M. Cafés especiais no Brasil: opção pela qualidade. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 32, n. 261, p.7-16, mar. 2011.

GOLLÜCKE, A. P. B.; TANIWAKI, M. H.; TAVARES, D. Q. Survey on ochratoxin a in Brazilian green coffee destined for exports 1. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 4, p. 641-645, out./dez. 2004.

HÖHLER, D. Ochratoxin A in food and feed: occurrence, legislation and mode action. **Zeitschrift für Ernährungswissenschaft**, Darmstadt, v. 37, n. 1, p. 2-12, Mar. 1998.

INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. Portaria 165, de 27 de abril de 1995. Delimita regiões produtoras de café do estado de Minas Gerais para a instituição do certificado de origem. **Diário Oficial da União**, Brasília, 27 abr. 1995.

INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE. **Climate change 2007**: synthesis report: contribution of working groups I, II and III to the fourth assessment report of the intergovernmental panel on climate change. Cambridge University Press, 2007.

INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE. **Intergovernmental panel on climate change**: the scientific basis-contribution of working group 1 to the IPCC third assessment report. Cambridge University Press, 2004.

INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE. **IPCC climate change 1995**: the science of climate change-summary for policymakers and

technical summary of the working group I report. Cambridge University Press, 1996.

JOOSTEN, H. M. et al. Production of ochratoxin A by *Aspergillus carbonarius* on coffee cherries. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 65, n. 1-2, p. 39-44, Apr. 2001.

MAIORANO, A. et. al. A dynamic risk assessment model (FUMAGrain) of fumonisin synthesis by *fusariumverticillioides* in maize grain in Italy. **Crop Protection**, Amsterdam, v. 28, n. 3, p. 243-256, Mar. 2009.

MALAVOLTA, E. **História do café no Brasil**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 2000.

MARENCO, J.; NOBRE, C. A. The hydro clima to logical framework in Amazonia. In: RICHEY, J.; MCCLAIN, M.; VICTORIA, R. (Ed.). **Biogeochemistry of Amazonia**. New York: UNDP, 2001. p. 17-42.

MARTINS, M. L.; MARTINS, H. M.; GIMENO, A. Incidence of microflora and of ochratoxin A in green coffee beans (*Coffea arabica*). **Food Additives and Contaminants**, London, v. 20, n. 12, p. 1127-1131, Dec. 2003.

MATA, F. M. da. Ecophysiological constraints on the productions of shaded and Unshaded coffee: a review. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 86, n. 2-3, p. 99-114, Mar. 2004.

MATIELLO, J. B. Fatores que afetam a produtividade do café no Brasil. In: RENA, A. B. et al. (Ed.). **Cultura do cafeeiro**: fatores que afetam a produtividade. Piracicaba: POTAFOS, 1986. p. 88-113.

MATIELLO, J. B. Fatores que afetam a produtividade. In: RENA, A. B. et al. (Ed.). **Cultura do cafeeiro**: fatores que afetam a produtividade. Piracicaba: POTAFOS, 1986. p. 1-11.

MATIELLO, J.B et al. **Cultura de café no Brasil: novo manual de recomendações**. Rio de Janeiro: Bom Pastor, 2005.

MATTIELO, J. B. **O café: do cultivo ao consumo**. Rio de Janeiro: Globo, 1991.

MEDINA FILHO, H. P.; BORDIGNON, R. Arabustas: interessantes híbridos dos cafés Arábica e Robusta. **O Agrônomo**, Campinas, v. 55, n. 2, p. 8-9, 2003.

MIRAGLIA, M. et al. The evaluation of major sources of ochratoxin A (OA) intake through the analysis of OA in biological fluids in Italy. **Revue de Médecine Vétérinaire**, Toulouse, v. 149, p. 711, 1998.

MORAES, M. L. P.; LUCHESE, R. H. Ochratoxin A on green coffee: influence of harvest and drying processing procedures. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 51, n. 19, p. 5824-5828, 2003.

PELLEGRINO, G. Q.; ASSAD, E. D.; MARIN, F. R. Mudanças climáticas globais e a agricultura no Brasil. **Multiciência**, São Carlos, n. 8, p. 139-162, maio 2007.

PERRONE, G. et al. Biodiversity of Aspergillus species in some important agricultural products. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 59, p. 53-66, 2007.

PETERSON, S. W. Phylogenetic relationships in Aspergillus based on rDNA sequence analysis. In: SAMSON, R. A.; PITT, J. I. (Ed.). **Classification of Penicillium and Aspergillus: integration of modern taxonomic methods**. Kingdom: Harwood Publishers, 2000. p. 323-356.

PEZZINI, V.; VALDUGA, E.; CANSIANI, R. L. Incidência de fungos e micotoxinas em grãos de milho e armazenados sob diferentes condições. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 64, n. 1, p. 91-96, jan./jun. 2005.

PEZZOPANE, J. R. M. **Avaliação microclimáticas, fenológicas e agronômicas em café arábica cultivado a pleno sol e consorciado com banana “prata anã”**. 2004. 136 p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

PIMENTA, C. J.; VILELA, E. R. Composição microbiana e ocratoxina no café (*Coffea arabica* L.) submetido a diferentes tempos de espera antes da secagem. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 6, p. 1315–1320, nov./dez. 2003.

PITT, J. I. Toxigenic fungi: which are important? **Medical Mycology**, Oxford, v. 38, supl. 1, p. 17–22, 2000.

PORTER, A. et al. **Forecasting and management of technology**. New York: John Wiley & Sons, 1991.

POZZA, E. A.; ALVES, M. C. Impacto potencial das mudanças climáticas sobre doenças fúngicas do cafeeiro no Brasil. In: GHINI, R.; HAMADA, E. (Ed.). **Mudanças climáticas: impactos sobre doenças de plantas no Brasil**. Brasília: Embrapa, 2008, p. 215-233.

PRANDINI, A. et al. Review of predictive models for *Fusarium* head blight and related mycotoxin contamination in wheat. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 47, n. 5, p. 927-931, May 2009.

RINALDI, G. et al. Effect of red wine on ochratoxin A toxicity in intestinal Caco-2/TC7 cells. **Toxicology In Vitro**, Oxford, v. 21, n. 2, p. 204-210, Mar. 2007.

ROCKLAND, L. B. A new treatment of hygroscopic equilibria: application to Walnuts (*Juglans regia*) and other foods. **Food Research**, Chicago, v. 22, n. 6, p. 604-628, Nov. 1957.

ROSSO, L. et al. An unexpected correlation between cardinal temperatures of microbial growth highlighted by a new model. **Journal of Theoretical Biology**, London, v. 162, n. 4, p. 447-463, June 1993.

SAVA, V. et al. Acute neurotoxic effects of the fungal metabolite ochratoxin A. **Neurotoxicology**, v. 27, n. 1, p. 82-92, Jan. 2006.

STEYN, P. S. Ochratoxins and related Dihydroisocoumarins. **Developments in Food Science**, Amsterdam, v. 8, p. 183-216, 1984.

STUDER-ROHR, I. et al. The occurrence of ochratoxin A in coffee. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 33, n. 5, p. 341-355, May 1995.

SUÁREZ-QUIROZ, M. L. et al. Effect of chemical and environmental factors on *Aspergillus ochraceus* growth and toxigenesis in green coffee. **Food Microbiology**, London, v. 21, n. 6, p. 629-634, Dec. 2004.

TANIWAKI, M. H. et al. The source of ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to processing methods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 82, n. 2, p. 173-179, Apr. 2003.

TRINDADE, A. V.; SILVEIRA, J. J.; DIAS, A. P. Micorrizas arbusculares na produção de mudas de plantas frutíferas e café. In: SIQUEIRA, J. O. et al. **Micorrizas: 30 anos de pesquisas no Brasil**. Lavras: Editora da UFLA, 2010. Cap. 14, p. 415-439.

TURNER, N. W.; SUBRAHMANYAM, S.; PILETSKY, S. A. Analytical methods for determination of mycotoxins: a review. **Analitica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 632, n. 2, p. 168-180, 2009.

VAN DER FELS-KLERX, H. J. et al. Perspectives for geographically oriented management of *Fusarium* mycotoxins in the cereal supply chain. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 73, n. 6, p. 1153-1159, June 2010.

VAN der MERWE, K. J. et al. Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus*. **Nature**, London, v. 205, n. 976, p. 1112-1113, Mar. 1965.

VILELA, M. D. **Seleção in vitro de culturas iniciadoras para fermentação de fritos de café (*Coffea arabica* L.) processados via seca e semi-seca**. 2011. 80 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras 2011.

VISMARA, L. S.; OLIVEIRA, V. A.; KARAMAM, D. Revisão de modelos matemáticos da dinâmica do banco de sementes de plantas daninhas em agrossistemas. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 25, n. 1, p. 1-11, jan./mar. 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Evaluation of certain food additives and contaminants**. Geneva: WHO Technical Report Series, 1995.

ZAMBOLIM, L. (Ed). **O estado da arte e tecnologia na produção de café**. Viçosa: Editora da UFV, 2002.

ZWIETERING, M. H.; WIT, J. C. de; NOTERMANS, S. Application of predictive microbiology to estimate the number of *Bacillus cereus* in pasteurized milk at the point of consumption. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 30, n. 1-2, p. 55-70, June 1996.

## CAPÍTULO 2

### DISTRIBUIÇÃO DE ESPÉCIES TOXIGÊNICAS E PRODUÇÃO DE OCRATOXINA A EM GRÃOS CRUS DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.) DE DIFERENTES REGIÕES DE MINAS GERAIS

#### RESUMO

O café é um substrato de grande importância para a produção desta micotoxina, sendo produzida, principalmente, pelas espécies *A.ochraceus* e *A. carbonarius*. O estudo foi realizado com os objetivos de avaliar a distribuição de espécies toxigênicas em três regiões produtoras de café do estado de Minas Gerais, a produção de ocratoxina A por parte dos fungos identificados e também o efeito das condições climáticas, com a utilização de um modelo matemático para projeção de risco. Foram coletadas, em cooperativas, amostras de grãos de café beneficiados das regiões do Cerrado, Zona da Mata e Sul de Minas. A identificação foi feita de acordo com Klich (2002); o potencial toxigênico, pelo método plug Agar; a concentração de OTA foi analisada por CLAE e o modelo matemático foi aplicado, utilizando temperaturas atuais das regiões avaliadas, projeções do IPCC (2004) e dados ecofisiológicos dos fungos estudados. A espécie da Seção *Nigri* mais incidente foi *A. niger*, da Seção *Circumdatti* e a espécie mais incidente foi *A. ochraceus*. Não foi detectada OTA por CLAE em nenhuma amostra analisada. De acordo com o modelo matemático proposto por Maiorano et al. (2009), a região mais apta para o desenvolvimento e a síntese de OTA por *A. ochraceus*, nas condições de médias de temperaturas atuais, é a Zona da Mata. Com relação ao *A. carbonarius*, nas condições de temperaturas atuais, a região do Cerrado é a que mais se adapta às condições ótimas, o que corrobora o estudo feito em laboratório. Porém, com o aumento da temperatura previsto, esta região se tornaria menos favorável para o desenvolvimento e a produção de OTA por *A. carbonarius*. Os resultados obtidos por meio deste estudo, segundo o modelo matemático, demonstram que a influência da temperatura poderá oferecer uma projeção de risco na distribuição de espécies toxigênicas das diferentes regiões cafeeiras no estado de Minas Gerais.

Palavras-chave: Regiões cafeeiras. *Coffea arabica* L.. IPCC. Modelo matemático.

## ABSTRACT

Coffee is a substrate of great importance for the production of this mycotoxin, mainly produced by the species *A.ochraceus* and *A carbonarius*. The aim of this study was to evaluate the distribution of toxigenic species in three coffee producing regions of Minas Gerais, the production of ochratoxin A by the fungi identified and also to assess the effect of climate through the use of a mathematical model for projection risk. Samples of processed coffee beans were collected in cooperatives in the regions of the Cerrado, Zona da Mata and the southern Minas Gerais Area. The identification was made according to Klich 2002, toxigenic potential by agar plug method, the OTA concentration was analyzed by HPLC and the mathematical model was applied using current temperatures of the evaluated regions, projections of the IPCC (2004) and ecophysiological data of the fungi studied. The most incident species of the *Nigri* Section was *A. niger*, that of the *Circumdatti* Section, was *A. ochraceus*. OTA was not detected by HPLC in the samples analyzed. According to the mathematical model proposed by Maiorano et al., (2009) the region most suitable for the development and synthesis of OTA by *A. ochraceus* in terms of average current temperature is the Zona da Mata. With respect to *A. carbonarius* under current temperature conditions, the Cerrado most fits the optimum conditions which corroborates with laboratory study, but with the predicted increase in temperature, this region would become less favorable for the development and production of OTA by *A. carbonarius*. The results obtained in this study, according to the mathematical model, shows that the influence of temperature may provide a projection of the distribution of toxigenic risk of different coffee regions in Minas Gerais species.

Keywords : Regions coffee. *Coffea arabica* L.. IPCC. Mathematical model.

## 1 INTRODUÇÃO

O café é um produto de importância agrícola no mundo, produzido em 78 países, representando grande parte dos recursos de países em desenvolvimento. Cerca de 80% desta produção são exportados para os países desenvolvidos e somente parte deste café retorna aos países produtores, na forma de café solúvel e de café torrado (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006; KONISHI et al., 2006).

O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de café e, embora seja líder no mercado desse produto, é reconhecido no mercado internacional como um fornecedor de cafés comuns e de baixo preço, enquanto Colômbia, Guatemala, Costa Rica e Quênia são reconhecidos pela produção de cafés de melhor qualidade (SAES; NAKAZONE, 2004). Para se desprender dessa imagem negativa, nos últimos anos tem ocorrido uma busca intensa pela melhoria da qualidade, principalmente no que diz respeito às etapas de colheita e de pós-colheita do café (GIOMO; BORÉM, 2011).

Dentre os fatores que interferem na qualidade final do produto estão as diferenças genéticas das plantas; as técnicas de preparo, colheita e secagem dos grãos, assim como as diferenças climáticas das regiões produtoras (TANIWAKI et al., 2003). A perda de qualidade dos grãos, em qualquer uma das etapas de produção, pode estar relacionada com a incidência de microrganismos, principalmente por fungos (SOUZA; CARVALHO, 1997). Segundo Moss (1996), a presença de fungos pode causar efeitos indesejáveis tanto na agricultura quanto indústria de alimentos, devido à sua grande capacidade de adaptação.

As micotoxinas são metabólitos secundários produzidos principalmente por espécies de *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, e fatores como umidade,

condições geográficas, susceptibilidade das variedades e condições de armazenamento interferem na produção de micotoxinas (CHALFOUN; BATISTA, 2003; BULLERMAN; TSAI, 1994).

A micotoxina de maior importância em café é a ocratoxina A, que é produzida, principalmente, pelas espécies *A. ochraceus*, *A. carbonarius* e, raramente, *A. niger*. Ela causa toxicidades ao organismo, por sua característica teratogênica, imunossupressora, nefrotóxica e hepatotóxica. No Brasil, existe uma legislação que vigora desde o ano de 2011, a RDC nº 7, a qual determina o limite máximo de ocratoxina A em grãos de café, torrado e solúvel em 10 µg.kg (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2011).

Segundo Pellegrino, Assad e Marin (2007), é preciso avançar nas simulações de cenários agrícolas que sejam mais próximos do futuro real e, além disso, processos fisiológicos, desenvolvimento de pragas e doenças com base na alteração climática, mudanças de métodos nos sistemas produtivos e projeções de avanços tecnológicos devem ser passíveis de modelagem matemática e incorporáveis aos modelos hoje utilizados. Nesse sentido, estudos simulando os impactos sobre a agricultura por meio de modelos matemáticos foram realizados por Siqueira, Steinmetz e Salles (2001), para o trigo, milho e soja, e por Marengo e Nobre (2001) e Assad et al. (2004), para o café.

Os objetivos, neste estudo, foram avaliar a distribuição de espécies toxigênicas em grãos de cafés arábica de três regiões cafeeiras de Minas Gerais, avaliar o potencial toxigênico das espécies identificadas, analisar a concentração de OTA nas amostras e avaliar o efeito do aumento da temperatura projetada com mudanças climáticas para o risco de micotoxinas em grãos de café no estado, utilizando um modelo matemático que leve em consideração dados fisiológicos dos fungos toxigênicos, dados de médias de temperaturas atuais das regiões estudadas e projeções de aumento de temperatura propostas pelo IPCC.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Condução do experimento**

Foram coletadas amostras de grãos crus de café arábica (*Coffea arabica*), da safra 2012-2013, classificados como bebida dura, em três cooperativas das principais regiões produtoras de café em Minas Gerais: Zona da Mata de Minas, Sul de Minas e Cerrado de Minas.

A coleta foi padronizada em uma amostra por cidade com o conteúdo de 500 g cada, totalizando 30 amostras, considerando 10 cidades por região produtora.

As amostras foram devidamente codificadas e embaladas em sacos plásticos e armazenadas ao abrigo da luz e à temperatura ambiente, para posterior realização das análises. Na Figura 1 estão dispostos os municípios dentro de cada região avaliada.

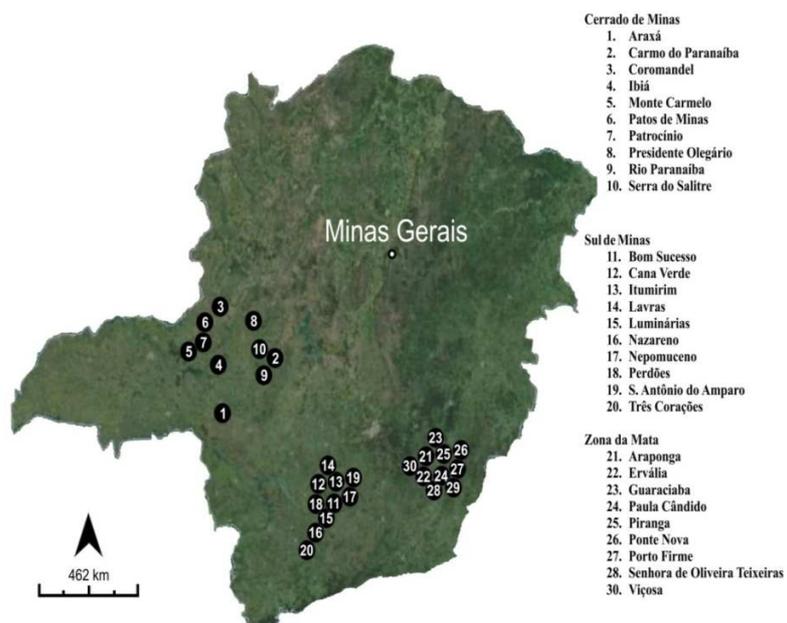


Figura 1 Distribuição amostral das coletas de café nas regiões Cerrado, Sul e Zona da Mata de Minas, anos 2012/2013

Na Tabela 1 estão representadas as coordenadas geográficas dos municípios estudados, separadas por cada região avaliada.

Tabela 1 Municípios avaliados em cada região cafeeira do estado de Minas Gerais e suas respectivas coordenadas geográficas (latitude e longitude). Dez cidades por três regiões

Sul de Minas			Zona da Mata			Cerrado		
Municípios	Latitude S	Longitude O	Municípios	Latitude S	Longitude L	Municípios	Latitude S	Longitude O
Lavras	21° 14' 42"	45° 00' 00"	Viçosa	20° 45' 14"	42° 52' 55"	Carmo do Paranaíba	19° 00' 03"	46° 18' 57"
Cana Verde	21° 01' 15"	45° 10' 55"	Ponte Nova	20° 24' 57"	42° 54' 32"	Araxá	19° 35' 34"	46° 56' 27"
Luminárias	21° 30' 39"	44° 54' 10"	Paula			Rio Paranaíba	19° 11' 38"	46° 14' 49"
Bom Sucesso	21° 01' 58"	44° 45' 28"	Cândido	20° 52' 26"	42° 58' 48"	Patrocínio	18° 56' 38"	46° 59' 34"
Perdões	21° 05' 27"	45° 05' 27"	Ervália	20° 50' 24"	42° 39' 25"	Ibiá	19° 28' 40"	46° 32' 20"
Nazareno	21° 12' 57"	44° 36' 39"	Teixeiras	20° 39' 03"	42° 39' 03"	Monte Carmelo	18° 43' 30"	47° 29' 56"
St. Ant.			Sra.de					
Oliveira			Oliveira	20° 47' 38"	43° 20' 38"	Serra do Salitre	19° 06' 39"	46° 41' 24"
Amparo	20° 56' 45"	44° 55' 08"	Guaraciaba	20° 34' 15"	43° 00' 28"	Coromandel	18° 28' 22"	47° 12' 00"
Itumirim	21° 19' 01"	44° 52' 15"	Araponga	20° 40' 01"	42° 31' 15"	Presidente Olegário	18° 25' 04"	46° 25' 04"
Nepomuceno	21° 14' 09"	45° 14' 09"	Piranga	20° 41' 06"	43° 18' 00"	Patos de Minas	18° 34' 44"	46° 31' 04"
Três Corações	21° 41' 41"	45° 15' 19"	Porto Firme	20° 40' 22"	43° 05' 02"			

## 2.2 Isolamento de fungos potencialmente ocratoxigênicos

Para o isolamento dos fungos associados a frutos e a grãos de café beneficiado, foi utilizada a técnica de plaqueamento direto. De cada amostra foram coletados 100 grãos, aleatoriamente e, posteriormente, foi realizada uma desinfecção com hipoclorito de sódio a 1%, visando à identificação dos fungos presentes no interior dos grãos.

Durante o processo de desinfecção, inicialmente, foi feita uma imersão das amostras em álcool 70% para diminuir a tensão superficial do grão, permitindo melhor contato entre a solução de hipoclorito de sódio a 1%, durante 30 segundos. Como última etapa do processo, foram três realizadas lavagens sucessivas com água destilada e esterilizada, com a finalidade de retirar resíduos do hipoclorito de sódio.

Após a desinfecção dos grãos, 100 grãos de cada amostra foram transferidos para placas de Petri de vidro com 13 cm de diâmetro, contendo meio de cultura dicloran rosa de bengala cloranfenicol (DRBC), conforme descrito por Samson et al. (2000). As placas foram incubadas, por 7 dias, a 25 °C, e os resultados expressos em porcentagem de grãos contaminados por fungos filamentosos, de acordo com Pitt e Hocking (1997).

O isolamento dos fungos foi realizado com o auxílio de palitos de madeira esterilizados, transferindo-os com um leve toque na cabeça conidial dos fungos que cresceram na superfície do grão.

Posteriormente, foram realizadas sucessivas repicagens em meio extrato de malte (*malt Agar*, ou MA), para a purificação das culturas de fungos toxigênicos. As culturas purificadas das espécies do gênero *Aspergillus* foram incubadas em meio *czapek yeast Agar* (CYA), a 25 °C e a 37 °C, e extrato de malte ágar, ou MEA, a 25 °C, durante sete dias, para a observação das características microscópicas e macroscópicas descritas por Klich (2002), sendo:

- a) características macroscópicas: coloração (massa conidial) e diâmetro das colônias, presença ou ausência e coloração dos escleródios e coloração MP reverso das colônias, em todos os meios de cultura;
- b) características microscópicas: o arranjo entre fiálides ligadas à vesícula, comprimento do conidióforo, forma e tamanho dos conídios, vesículas, métulas e fiálides, textura dos conídios e do conidióforo;
- c) para a realização da identificação microscópica, foram preparadas lâminas coradas, observadas em microscópio.

### **2.3 Avaliação do potencial ocratoxigênico dos isolados pelo método Plug Agar**

Todos os isolados identificados pertencem às Seções *Circumdatti* e *Nigri*. Para serem testados, foram inoculados em meio *yeast extract sucrose agar* (YES), composto de extrato de levedura, 20,0 g; sacarose, 150 g; ágar 20,0 g;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,5 g e água destilada, 1 litro, adicionado de solução metálica e em meio CYA, respectivamente, a 25 °C, por 7 dias, conforme Filtenborg & Frisvad (1980). Um corte circular de, aproximadamente, 0,5 cm do micélio do fungo com ágar foi colocado sobre a placa de CCD (Merk-Sílica), junto com o micélio dos demais isolados, um ao lado do outro, com 1,5 cm de distância. O micélio, então, foi retirado e, após 15 minutos, foi feita a eluição em cuba de vidro, utilizando como fase móvel tolueno acetato de étila (TEF) e ácido fórmico 90% (50:40:10). Este método conta com o fato de que muitas micotoxinas são extracelulares, difundindo-se no substrato. A toxina é transferida para a placa de CCD pelo micélio do fungo colocado diretamente sobre a placa. Foram utilizados 10 µL de solução padrão de OTA (Sigma-Aldrich), adicionados em um ponto pré-determinado da placa de cromatografia de camada delgada.

Após a eluição, a placa foi colocada para secar em capela de fluxo laminar. A confirmação quanto à produção das micotoxinas foi feita sob luz ultravioleta de  $\lambda$  366 nm, em cromatovisor CAMAG (UF-Betrachter). Os isolados considerados produtores de OTA foram aqueles que apresentaram fator de retenção (RF) e spot de fluorescência semelhantes aos do padrão da ocratoxina A.

#### **2.4 Análise de ocratoxina A em grãos de café por CLAE**

As análises de ocratoxina A por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram realizadas no Laboratório de Análises Físico-Químicas de Aguardente de Cana, no Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras. Utilizou-se a metodologia descrita por Vargas e Santos (2005), para realizar a extração e a purificação da OTA.

##### **Extração, purificação e eluição da OTA**

Em 25 g da amostra moída à temperatura ambiente, foram adicionados 200 ml de metanol-bicarbonato de sódio 3% (1:1), agitando-se por 5 minutos, em agitador mecânico. Após a filtração em papel Whatman 4 e refiltração em papel de filtro GB/B de 47 mm de diâmetro de microfibras de vidro em pressão reduzida, 10 mL do segundo filtrado foram transferidos para um balão de 100 mL e completados com 90 mL de solução tampão PBS.

Foram aplicados 100 mL de extrato diluído na coluna de imunoafinidade (Ochraperp®-Rhône), a um fluxo de 2-3 mL.min<sup>-1</sup>, para purificação. Posteriormente, a coluna foi lavada com 10 mL de água ultrapura (UP-900 Scholar UV-integrate Biohuman®) e a secagem foi realizada sob vácuo, por 30 segundos.

Adaptou-se à coluna de imunoafinidade uma seringa de vidro com capacidade para 20 mL, a qual foi adicionado 1 mL de metanol, para o procedimento de eluição. O procedimento de *back-flushing* foi realizado e o metanol mantido em contato com a coluna por 3 minutos. Foram realizadas duas repetições e, posteriormente, o eluato foi acondicionado em frasco de 4 mL e submetido a banho-maria, em temperatura de 40 °C-50 °C, sob atmosfera de N<sub>2</sub>.

#### **Condições cromatográficas e quantificação de OTA por CLAE**

Foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE/HPLC) Shimadzu, equipado com duas bombas de alta pressão modelo SPD-M20A; degaseificador modelo DGU-20a, interface modelo CBM-20<sup>a</sup>; injetor automático modelo SIL-10AF e detector de fluorescência RF-10AXL. A coluna usada para as separações foi: Agilent - Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,6 x 250 mm, 5µm) conectada a uma pré-coluna Agilent - Zorbax Eclipse XDB - C18 4 - Pack (4,6 x 12,5 mm, 5µm). O sistema operou a fluxo constante de 0,8 ml/min, com excitação de 332 nm e emissão de 476 nm. A coluna foi estabilizada com fase móvel metanol:acetonitrila:água:ácido acético (35:35:29:1). Foram injetados 20 µL das soluções padrões e amostras.

A quantificação da OTA foi realizada por meio de uma curva analítica obtida por regressão linear, correlacionando a área do pico *versus* a concentração da respectiva solução-padrão. Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram estimados por meio dos parâmetros obtidos para a curva analítica construída (HARRIS, 2008).

## 2.5 Aplicação de modelo matemático

Para estimar o impacto da temperatura na germinação, no crescimento dos fungos *A. ochraceus* e *A. carbonarius* e na síntese de OTA, adaptou-se um modelo matemático.

O modelo GERMRH foi descrito utilizando-se conceitos de temperatura determinados por Zwietering et al. (1996), trazendo resultados ótimos para germinação, crescimento e produção de OTA, utilizando dados ecofisiológicos dos *A.ochraceus* e *A.carbonarius* .

### Equação 1: Germinação

$$GERMT = \frac{(T-T_{max})(T-T_{min})^2}{(T_{otm}-T_{min})[(T_{otm}-T_{min})(T-T_{otm}) - (T_{otm}-T_{max})(T_{otm}+T_{min}) - 2T]}$$

### Equação 2: Crescimento

$$CRESCT = \frac{(T-T_{max})(T-T_{min})^2}{(T_{otm}-T_{min})[(T_{otm}-T_{min})(T-T_{otm}) - (T_{otm}-T_{max})(T_{otm}+T_{min}) - 2T]}$$

### Equação 3: Produção de OTA

$$OTAT = \frac{(T-T_{max})(T-T_{min})^2}{(T_{otm}-T_{min})[(T_{otm}-T_{min})(T-T_{otm}) - (T_{otm}-T_{max})(T_{otm}+T_{min}) - 2T]}$$

em que  $T$  é temperatura (dados atuais do local avaliado) e  $T_{otm}$ ,  $T_{max}$  e  $T_{min}$ , representam ótima, máxima e mínima para a germinação, crescimento e síntese de OTA pelos determinados fungos. Estes fatores poderão obter valores entre 0 (sem condições, para germinação, crescimento ou síntese de OTA) e 1 (condições ótimas).

Os dados ecofisiológicos utilizados para o cálculo de germinação, crescimento e síntese de OTA para os fungos *A. ochraceus* e *A. carbonarius* foram baseados em valores de referência para temperaturas mínimas, ótimas e máximas determinados por Pitt e Hocking (2009), Ramos et al. (1998), Pardo et al. (2005) e Beli et al. (2005). Os valores de referência estão dispostos na Tabela 1 do Anexo.

Utilizaram-se dados médios de temperatura, para as respectivas regiões de estudo, quanto aos meses de setembro a dezembro de 2012 (amostras provenientes da safra 2012/2013), coletados através do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), os dados estão disponíveis na Tabela 2 do Anexo.

Acrescentaram-se às médias de temperatura atuais 1 °C, 3 °C e 5,8 °C, para avaliar as condições estabelecidas nos modelos, de acordo com as projeções de mudanças climáticas propostas pelo IPCC (INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE, 2004), obtendo-se, dessa forma, uma estimativa das melhores condições para a germinação, o crescimento e a síntese de OTA, conforme o aumento da temperatura. Para isso, foi estabelecido que o aumento de 1 °C é uma predição otimista; 3 °C é uma predição mediana e 5,8 °C, uma predição pessimista.

## **2.6 Análises estatísticas**

As análises estatísticas para a incidência de fungos do gênero *Aspergillus* das secções *Circumdatti* e *Nigri*, em relação às regiões e às cidades estudadas, foram realizadas por meio de análise de variância (ANAVA) e o teste de médias, por Scott e Knott a  $p < 0,05$ . Para testar os contrastes de interesse entre as regiões estudadas, foi aplicado o teste  $F$ , a  $p < 0,05$  (FERREIRA, 2011).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### **Incidência de fungos toxigênicos e produção de OTA**

Os valores médios encontrados para o número de fungos isolados em grãos de café beneficiados das cidades de cada região avaliada de Minas Gerais estão dispostos na Tabela 2.

Observa-se que houve diferença significativa, pelo teste  $F$  ( $p < 0,05$ ), entre as cidades, para todas as regiões estudadas, porém, ocorreu maior variabilidade entre as cidades da região da Zona da Mata (7,0%-25,0%) e Cerrado (0,00-14,00), em relação às cidades do Sul de Minas. Este fato não foi observado por Batista et al. (2003) que relataram distribuição uniforme de fungos toxigênicos em amostras de grãos de café de diferentes regiões, o que pode ser explicado pelo fato de se tratar de amostras diferentes, coletadas em um período de 10 anos de diferença.

A cidade da região do Cerrado que apresentou maior incidência fúngica foi Carmo Paranaíba; na região do Sul de Minas, observou-se maior incidência para a cidade de Três Corações e na Zona da Mata, as cidades de Ervália e Araponga apresentaram os maiores valores de fungos toxigênicos. Avaliando a segurança do café verde comercializado no mercado externo e interno, em relação à produção de ocratoxina A, Roberto (2008) também encontrou variabilidade entre os locais estudados e constatou que as cidades Araponga e Ervália apresentaram contagens mais elevadas em relação a leveduras e fungos.

De acordo com Chagas e Malta (2003), a topografia e a variação da altitude e do clima condicionam a ocorrência de diferentes microclimas na

região na região da Zona da Mata de Minas, ocasionando a produção de cafés de qualidade inferior, principalmente devido à ocorrência de microrganismos.

Avaliando as regiões cafeeiras do norte do estado do Paraná, Magnani et al. (2005) detectaram a presença de espécies potencialmente ocratoxigênicas em 82% das regiões estudadas. Martins, Martins e Gimeno (2003) relataram que 91,7% das amostras de cafés do Brasil estavam contaminadas por fungos potencialmente toxigênicos. Foram detectados fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, em grãos de café beneficiados no sudoeste da Bahia, oriundos de diferentes locais e tipos de processamento (FERREIRA et al., 2011).

Tabela 2 Valores médios de contaminação dos grãos de café beneficiados de diferentes cidades e regiões de Minas Gerais: média e probabilidade de significância (F) determinada por análise de variância (ANAVA) de 10 cidades e 3 regiões

Cerrado de Minas		Sul de Minas		Zona da Mata de Minas	
Cidades	VM	Cidades	VM	Cidades	VM
Patos	0,00 a	Lavras	1,50 a	Guaraciaba Paula	7,00 a
P. Olegário	3,00 a	Cana Verde	2,25 a	Cândido	8,50 a
Coromandel	3,25 a	Luminárias	3,00 a	Porto Firme	9,00 a
Serra do Salitre	4,00 a	Bom Sucesso	3,50 a	Piranga	11,25 a
Patrocínio	4,25 a	Perdões	5,25 b	Sra de Oliveira	19,25 b
Monte Carmelo	6,50 b	Nazareno	5,75 b	Ponte Nova	20,50 b
Ibiá	7,50 b	S. A. do Amparo	6,75 b	Viçosa	23,00 c
Araxá	10,50 c	Itumirim	7,25 b	Teixeiras	24,50 c
R. Paranaíba	12,25 c	Nepomuceno	8,75 b	Ervália	25,00c
C. Paranaíba	14,00 c	Três Corações	10,0 b	Araponga	25,00 c
<i>F</i>	0,00		0,00		0,00

\*Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knot, a 5% de probabilidade

VM = valores médios

Os resultados encontrados para a incidência de fungos do gênero *Aspergillus* Seções *Nigri* e *Circumdatti*, bem como a quantidade de isolados produtores de ocratoxina A (OTA) e o número total de isolados por região, estão dispostos na Tabela 3.

A presença de fungos do gênero *Aspergillus* em grãos de café pode ocorrer devido à distribuição geográfica do Brasil, entre as coordenadas 26° e 35° latitudinais (KLICH, 2002), assim como as condições ambientais e o tipo de processamento atribuído ao café. As cidades de cada região avaliada neste estudo encontram-se neste intervalo de coordenadas latitudinais.

As regiões avaliadas diferiram entre si, estatisticamente, quanto à incidência de *Aspergillus* Seção *Nigri* e *Aspergillus* Seção *Circumdatti*, tendo a região da Zona da Mata sido a mais expressiva, seguida das regiões Cerrado e Sul de Minas. Foram isolados 75 fungos da seção *Nigri* e 20 da seção *Circumdatti*, na região da Zona da Mata; na região do Cerrado, foram isolados 41 fungos da seção *Nigri* e 14 da seção *Circumdatti* e, no Sul de Minas, 19 fungos da seção *Nigri* e 1 fungo da seção *Circumdatti*.

Tabela 3 Valores médios de isolados *A. nigri*, *A. circumdatti* e isolados produtores de OTA em grãos crus de café de diferentes regiões de Minas Gerais: média e probabilidade de significância (F) determinada por análise de variância (ANAVA) de 3 regiões

Regiões de Minas	<i>A. nigri</i>	<i>A. circumdatti</i>	Isolados produtores de OTA
Sul	2,10 a	0,10 a	0,00 a
Cerrado	4,10 b	1,10 a	1,10 b
Zona da Mata	7,50 c	2,30 b	1,30 c
<i>F</i>	0,00	0,00	0,04

\*Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knot, a 5% de probabilidade

Paterson e Lima (2010) afirmam que a contaminação por fungos ocratoxigênicos em grãos de café ocorre na presença de condições específicas, como clima, suscetibilidade da planta, fatores intrínsecos e extrínsecos, o cultivo do produto, o manuseio, os nutrientes do substrato e a genética dos microrganismos. A região Zona da Mata de Minas caracteriza-se por baixo déficit hídrico, temperaturas relativamente altas e acúmulo de umidade nos locais de plantio e de secagem do café (CORTEZ, 1997; CARVALHO; CHAGAS; SOUZA, 1997). Estes fatores podem contribuir para o desenvolvimento de microrganismos, tais como os fungos das espécies *A. nigr*i e *A.cCircumdatti*.

O número de espécies de *Aspergillus* da Seção *Nigri* e da Seção *Circumdatti* encontradas em cada região de estudo é apresentado na Tabela 3. Dentre os isolados da seção *Nigri*, a espécie mais incidente foi *A. niger*, tendo 22 deles sido encontrados na região da Zona da Mata, 21 no Cerrado e 5 no Sul de Minas. Somente na região do Cerrado foram encontrados *A. carbonarius*, totalizando 3 isolados (Tabela 4). Para a seção *Circumdatti*, foram encontradas as espécies *A. ochraceus*, *A. insulicola*, *A. melleus*, *A. sulphureus* e *A. auricomus*. A espécie *A. ochraceus* apresentou-se em maior número nos cafés avaliados, representando 85% do isolados da Seção *Circumdatti* no Cerrado, 55% da Zona da Mata, porém, na região do Sul de Minas não foram identificados *A. ochraceus*. Rezende (2010) relata a incidência de 35,20% da espécie *A. ochraceus* e Batista e Chalfoun (2007), 91,81% de *A. ochraceus*, em diferentes frações de café.

Tabela 4 Distribuição de espécies de fungos do gênero *Aspergillus* das seções *Nigri* e *Circumdatti* em grãos crus de café de três regiões do estado de Minas Gerais

Espécie de <i>A. nigri</i>	Zona da mata	Cerrado	Sul	Total
<i>A. brasiliensis</i>	(1)	(1)	(0)	(2)
<i>A. carbonarius</i>	(0)	(3)	(0)	(3)
<i>A. foetidus</i>	(20)	(11)	(7)	(38)
<i>A. japonicus</i>	(6)	(0)	(0)	(6)
<i>A. niger</i>	(22)	(21)	(5)	(48)
<i>A. niger</i> agregado	(17)	(3)	(4)	(24)
<i>A. tubingenses</i>	(9)	(2)	(3)	(14)
Espécie de <i>A. circumdatti</i>	Zona da mata de Minas	Cerrado de Minas	Sul de Minas	Total
<i>A. auricomus</i>	(1)	(0)	(0)	(1)
<i>A. insulicola</i>	(2)	(0)	(0)	(2)
<i>A. melleus</i>	(1)	(0)	(0)	(1)
<i>A. ochraceus</i>	(11)	(8)	(0)	(19)
<i>A. sulphureus</i>	(5)	(3)	(1)	(9)

Em um estudo sobre a incidência de fungos potencialmente toxigênicos em grãos de café verde beneficiados, realizado por Rezende et al. (2013), foi constatada incidência de 27,29% de *Aspergillus* da Seção *Circumdatti* e 29,25 % de *Nigri*. Estes dados corroboram os dados encontrados no presente estudo. No entanto, Batista et al. (2009) encontraram maiores valores de *Aspergillus* Seção *Circumdatti* (41%) em relação a *Aspergillus* Seção *Nigri* (25%), para grãos de café beneficiados. Segundo Abarca et al. (2003), maiores incidências de *Aspergillus* Seção *Nigri* são detectadas, possivelmente, pelo fato de estas serem mais resistentes à luz UV, devido à coloração de seus esporos, o que aumenta a sua capacidade de competição pelo substrato (DUARTE; PENA; LINO, 2010). Ainda em relação à predominância de fungos da Seção *Nigri* em relação à Seção *Circumdatti*, ela pode ser atribuída a uma

vantagem competitiva. Nasser et al. (2003) verificaram ação antagonista da espécie *Aspergillus niger* sobre as espécies da Seção *Circumdatti*, e ação antagonista na produção de OTA.

Perrone et al. (2007) afirmam que a espécie *A. niger* é amplamente distribuída no ambiente, mas não só em grãos de café. Esta espécie também é comumente encontrada em uvas em maiores quantidades, porém, *A. carbonarius* é que tem maior potencial de produção de OTA (LEONG et al., 2007; PRADO et al., 2004).

Foram encontrados três isolados de *A. carbonarius*, somente na região do Cerrado. Esta espécie cresce em temperaturas mais baixas que a espécie *A. niger* e tem temperatura ótima de 30° C; sua capacidade de crescer em Aw baixa é mais restrita. A espécie *A. niger* é xerofílica, com germinação relatada em aw de 0,77 a 35° C e são resistentes a temperaturas mais altas, tolerantes à acidez e aw um pouco mais baixa (DUARTE; PENA; LINO, 2010; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006).

As regiões avaliadas diferiram entre si estatisticamente quanto ao número de isolados produtores de OTA pelo método plug ágar, de acordo com a Tabela 3. Na Figura 2 observa-se o número de isolados de fungos toxigênicos produtores de ocratoxina A, por região estudada.

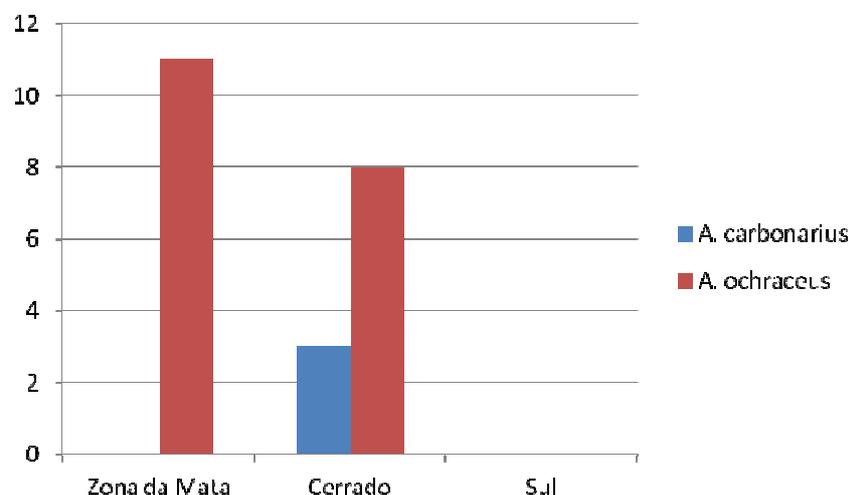


Figura 2 Número de isolados de espécies de *A. ochraceus* e *A. carbonarius*, produtores de OTA, por região estudada

Nota-se que a região da Zona da Mata de Minas e a do Cerrado apresentaram um total de 11 e 8 isolados de *A. ochraceus*, respectivamente. A região Sul de Minas não apresentou isolados de *Aspergillus* da Seção *Circumdatti* produtores de OTA. A espécie *A. carbonarius* foi identificada somente na região Cerrado de Minas, num total de 3 isolados.

Diversos são os fatores responsáveis pela incidência de espécies de fungos potencialmente produtores de ocratoxina A em café, podendo ser citadas as condições ambientais, como umidade e temperatura, bem como os fatores intrínsecos, como atividade de água (ESTEBAN et al., 2006). Alves, Volpato e Vieira (2011) enfatizam que as regiões cafeeiras do estado de Minas Gerais apresentam características distintas, devido à sua grande extensão territorial, dispondo de diversas faixas latitudinais com temperaturas mais amenas no extremo sul e mais quentes no extremo norte.

O fato de o Sul de Minas não ter demonstrado a incidência de isolados produtores de OTA pode ser justificado pelo fato de esta região ser montanhosa,

com altitudes que variam entre 700 a 1.080 m, classificação climática entre os tipos B2 e B3 (úmidos) e médias de temperaturas relativamente mais baixas que as de outras regiões (SCOLFORO et al., 2007; FUNDAÇÃO CENTRO TECNOLÓGICO DE MINAS GERAIS, 1983).

Apesar de ser uma região caracterizada como úmida, as baixas temperaturas aliada às altas altitudes tornam a região menos propícia para o desenvolvimento de fungos toxigênicos e produção de OTA. Segundo Ayoade, (2003), a temperatura decresce 0,6 °C, a cada 100 m de altitude crescente.

Segundo Batista et al. (2009), dentre as espécies do gênero *Aspergillus* da seção *Circumdatti*, o *A. ochraceus* é a mais comum e a maior produtora de OTA em café. De acordo com Rezende (2010), a espécie de *A. ochraceus* foi a principal produtora encontrada em grãos de café, representando 89,55% dos isolados totais de *A. ochraceus*. Batista et al. (2009) realizaram um estudo com cafés provenientes de diferentes processamentos, dentre os quais 95% dos *A. ochraceus* produziram micotoxina.

A ocratoxina A, em geral, é produzida em grãos de café pelas espécies *A. ochraceus*, *A. carbonarius* e, raramente, *A. niger* (TANIWAKI et al., 2003). O *A. carbonarius* é considerado a principal espécie produtora de OTA em uvas e em produtos derivados de uva (PERRONE et al., 2007; BATTILANI; MAGAN; LOGRIECO, 2006). Ocasionalmente, *A. carbonarius* tem sido encontrado em grãos de café, amêndoas de cacau, amendoim e milho (TANIWAKI et al., 2003; JOOSTEN et al., 2001; MAGNOLI et al., 2003). Prado et al. (2004) afirma que espécies de *A. carbonarius* são boas produtoras de OTA, no entanto, não muito comuns em grãos de café.

Dentre os fatores que justificam a incidência de fungos toxigênicos, como *A. ochraceus* e *A. carbonarius*, estão as condições climáticas e geográficas da região, bem como as práticas de manejo realizadas desde o processo de

colheita até o armazenamento e a composição química do grão (DURAN et al., 2013; CHALFOUN, 2011; ROBERTO, 2008; BEUX; SCCOL, 2004).

### **Análise da concentração de ocratoxina A (OTA) em grãos de café beneficiados, por cromatografia líquida de alta eficiência**

A partir da detecção de produção de OTA por algumas espécies encontradas nos grãos crus de café das três regiões do estado por meio da cromatografia de camada delgada, foi utilizado também o método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), para avaliar a concentração da mesma nos grãos.

A ocratoxina A não foi detectada em nenhuma das amostras analisadas, as quais apresentaram concentrações muito abaixo dos limites máximos toleráveis (LMT) para o consumo. A legislação brasileira não estabelece limites máximos toleráveis para grãos de café crus, segundo a RDC nº 7 (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2011). Os valores LMT são para café torrado (em grão ou moído), 10 µg/kg. Partindo do pressuposto de que o processo de torração influencia a diminuição dos valores residuais de OTA em café (OLIVEIRA, 2012), poderiam ser admitidos maiores níveis residuais em grãos de café crus.

Pimenta e Vilela (2003) realizaram um estudo com cafés submetidos a diferentes tempos de espera antes da secagem e não detectaram OTA pelo método de CLAE. Este resultado também foi evidenciado por Rezende (2010), com grãos de café de cultivo tradicional e orgânico.

Apesar de espécies de *A. ochraceus* terem sido encontradas nas amostras analisadas e terem sido qualitativamente classificadas como produtoras de ocratoxina A pelo método plug ágar, não foi detectada a presença de OTA nas amostras, indicando que a presença do fungo produtor nas amostras não

determina a presença da toxina. Fujji et al. (2002) afirmam que a cafeína é apontada entre os componentes naturais do café como a substância com possível atividade inibitória no crescimento de fungos toxigênicos e na produção de micotoxinas. Tal fato pode sugerir que tenha sido um dos fatores para explicar as baixas concentrações de OTA nas amostras. Chalfoun et al. (2000) constataram a atividade inibitória de cafeína no crescimento de *Aspergillus* spp. (*A. ochraceus* e *A. flavus*).

Diversos fatores podem interferir na qualidade do café, especialmente aqueles relacionados às etapas pós-colheita de processamento e secagem (FERRREIRA et al., 2011). Batista et al. (2003) consideram que baixos índices de contaminação sugerem boas práticas agrícolas, desde a colheita, a pós-colheita e o processamento, até o armazenamento. Dessa maneira, pode-se considerar que o presente estudo pode ter sido realizado com cafés advindos de processos agrícolas adequados.

Em um estudo feito por Carvalho e Chalfoun (1985), as amostras de café classificadas como bebida mole e bebida dura apresentaram índices de infecção dos fungos *A. ochraceus* e *A. flavus* acentuadamente menores que nos cafés classificados como bebida riada e rio. Meirelles (1990) demonstrou elevada taxa de infecção por fungos, nos cafés de pior qualidade (rio e riado), o que pode justificar os resultados obtidos no presente estudo, uma vez que a qualidade do café amostrado foi padronizada como bebida dura, de acordo a Classificação Oficial Brasileira (AOB).

### **Projeções matemáticas para germinação, crescimento e produção de OTA**

Os valores foram expressos em resultados numa faixa de 0 a 1, calculados a partir do modelo matemático proposto por Maiorano et al. (2009). Quando os resultados apresentaram-se próximos a 0, foram atribuídas condições

impróprias e resultados próximos a 1, atribuídas condições favoráveis. Estes resultados foram calculados a partir das temperaturas atuais (dados coletados no Instituto Nacional de Meteorologia, INMET, médias dos meses de setembro a dezembro de 2012, correspondendo ao ano da safra das amostras coletadas) e outras três temperaturas acima da temperatura atual em 1 °C, 3 °C e 5,8 °C.

Na Tabela 5 estão expostos os resultados para os cálculos realizados por meio do modelo, com relação à germinação, ao crescimento e à síntese de OTA, utilizando a média de temperatura dos meses de setembro a agosto de 2012 e a elevação em graus da temperatura, de acordo com as projeções estabelecidas pelo IPCC.

Tabela 5 Valores calculados a partir de projeções estabelecidas pelo IPCC com relação à germinação, ao crescimento e à síntese de OTA, por fungos das espécies *Aspergillus ochraceus*. Valores variando entre 0 e 1

	Médias de temperaturas	T <sup>a</sup> +1°C	T <sup>a</sup> +3 °C	T <sup>a</sup> +5,8 °C
<b><i>A. ochraceus</i></b>				
Germinação				
Zona da Mata	0,58	0,66	0,999	0,71
Sul	0,55	0,63	0,998	0,79
Cerrado	<b>0,995</b>	<b>0,998</b>	<b>-1,79</b>	<b>-6,2</b>
Crescimento				
Zona da Mata	0,94	0,97	0,999	0,94
Sul	0,93	0,96	0,999	0,95
Cerrado	0,86	0,80	0,623	0,28
Síntese de OTA				
Zona da Mata	0,84	0,92	<b>0,999</b>	0,71
Sul	0,80	0,89	<b>0,998</b>	0,79
Cerrado	0,26	- 0,21	- 1,79	-6,2

Na Figura 3 estão dispostos os resultados encontrados na equação 1, para a germinação do *A. ochraceus*.

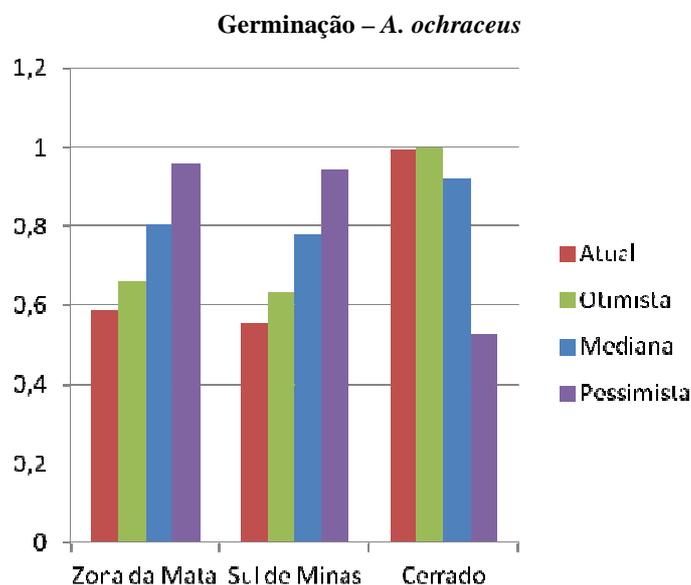


Figura 3 Dispersão gráfica dos resultados da equação 1 para *A. ochraceus*, em função da temperatura, no intervalo de 0 a 1

Diante das médias das temperaturas atuais, os resultados da equação 1, para o *A. ochraceus*, foram mais próximos às condições ótimas na região do Cerrado (Tabela 5). Já para as regiões Zona da Mata e Sul de Minas, os resultados foram intermediários, com valores de 0,58 e 0,55, respectivamente.

A partir do acréscimo de 1 °C, de acordo com as projeções feitas pelo IPCC, a região do Cerrado aproxima-se ainda mais do resultado ótimo, com o valor de 0,998, seguida da Zona da Mata e do Sul de Minas, que apresentaram resultados de 0,66 e 0,63, respectivamente.

O cálculo da fórmula alterando a temperatura com a estimativa mediana, crescendo 3° C, obteve resultados crescentes para as regiões da Zona da Mata (0,999) e Sul de Minas (0,998). Em contrapartida, o Cerrado apresentou valor menor em relação à temperatura atual, o que sugere que a região esteja acima da temperatura ideal para a germinação dos fungos.

A projeção pessimista que eleva a temperatura em 5,8 °C, com relação às atuais, mostra resultados crescentes em função do aumento da temperatura para a germinação do fungo nas regiões da Zona da Mata e Sul de Minas, com os resultados de 0,71 e 0,79, respectivamente, o que as torna ainda mais próximas das condições ótimas. Já a região do Cerrado que, nas condições atuais de temperatura, se encontra nas condições próximas às ótimas para germinação, com a elevação gradual da temperatura se tornará desfavorável ou inapta para a germinação do *A. ochraceus*, segundo o modelo matemático e as projeções feitas pelo IPCC e Assad et al. (2004).

Na Figura 4 estão dispostos os resultados encontrados na equação 2, nos valores entre 0 e 1, para o crescimento de *A. ochraceus*.

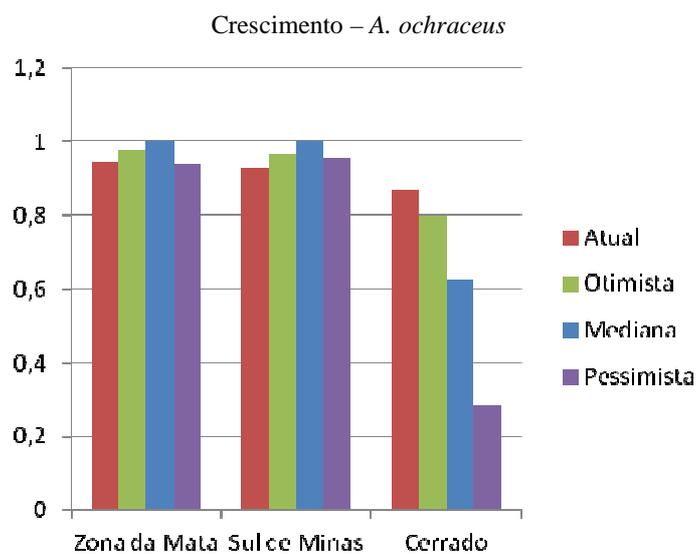


Figura 4 Crescimento de *A. ochraceus* em função da temperatura

Os resultados dos cálculos obtidos por meio da equação 2, para avaliar o crescimento de *A. ochraceus* em função da temperatura atual, apontam a região

da Zona da Mata como a mais próxima das condições ideais de crescimento, com valor de 0,94, seguida da região do Sul de Minas e, por último, da região do Cerrado, com valores de 0,93 e 0,86, respectivamente. Os resultados obtidos em laboratório no presente estudo não corroboram os valores encontrados no modelo matemático, visto que a Zona da Mata foi a região com maior incidência de *A. ochraceus*, seguida do Cerrado e da região do Sul de Minas, que foi a menos incidente.

Suarez-Queiroz et al. (2004) afirmam, com base em um estudo realizado *in vitro*, avaliando o crescimento de *A. ochraceus*, que a temperatura ótima de crescimento é de 30° C, próxima da média de temperatura atual do Cerrado. No entanto, não se pode afirmar, apenas com dados de temperatura, a taxa de crescimento em uma determinada região. Os autores ainda esclarecem que devem ser verificados a umidade relativa do ar e os níveis de precipitação, e também o tipo de processamento de pós-colheita utilizado (via seca ou via úmida), pois existe a probabilidade de estes afetarem os componentes intrínsecos do grão.

Os resultados encontrados para os cálculos baseados na projeção otimista apontam a região da Zona da Mata como a mais próxima das condições ótimas para o crescimento (0,97), seguida do Sul de Minas (0,96) e do Cerrado (0,80).

Para a projeção mediana, as regiões Zona da Mata e Sul de Minas obtiveram valores de 0,999, e o Cerrado, 0,623. Portanto, de acordo com o modelo matemático, se houver um aumento de 3° C, as regiões da Zona da Mata e Sul de Minas estarão mais aptas para o crescimento de *A. ochraceus* que a região do Cerrado.

Aumentando 5,8° C na temperatura atual, há um decréscimo nos resultados obtidos nas três regiões, porém, o Sul de Minas apresenta valor mais próximo da condição ótima. Portanto, com a projeção pessimista, observa-se que

a região Sul de Minas pode ser a mais apta para o crescimento de *A. ochraceus*, segundo o modelo matemático.

Em comparação com os resultados encontrados para temperatura atual, a Zona da Mata encontra-se com valores mais próximos as condições favoráveis, com o aumento da temperatura; o Sul de Minas, de acordo com as projeções pessimistas, será a região que terá melhores condições para o crescimento, em função da temperatura. Vale ressaltar que existem outros fatores, como umidade,  $a_w$  do grão, tipos de processamentos, período de armazenamento, uso de fungicidas, composição do substrato e competição microbiana, que podem afetar de forma significativa o crescimento do fungo (CHALFOUN et al., 2000; TANIWAKI et al., 2003).

Na Figura 5 estão dispostos os resultados encontrados para o cálculo da equação 3, para a produção de OTA por *A. ochraceus*, em um intervalo entre 0 e 1.

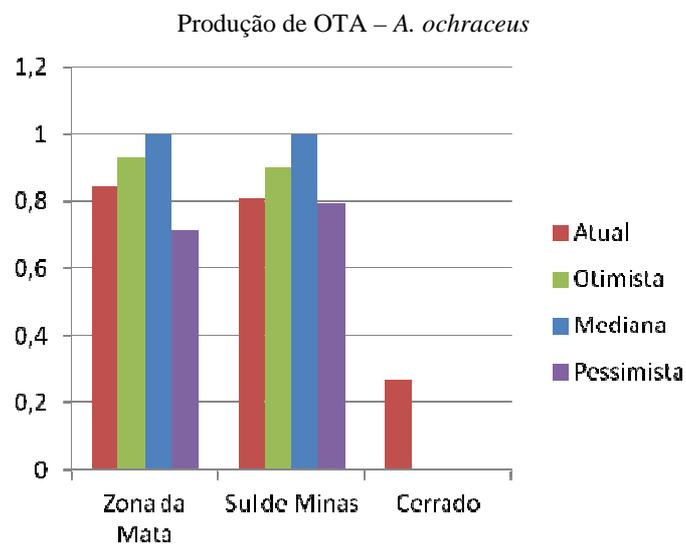


Figura 5 Produção de OTA por *A. ochraceus*, em função da temperatura

Segundo Ramos et al. (1998), a faixa de temperatura ótima para a produção de OTA é de 25 °C a 30 °C. Dessa forma, com as temperaturas atuais, a região com valores mais próximos a 1 foi a Zona da Mata, com 0,84, seguida da região Sul de Minas, com 0,80. A região do Cerrado representa menor risco de produção de OTA, segundo o modelo, com o valor de 0,20.

O modelo matemático confirma os resultados obtidos, no presente estudo, por meio da cromatografia líquida de alta eficiência, que não apresentou produção de OTA nas temperaturas atuais (Tabela 5). Ainda se pode atribuir este resultado a fatores como efeito inibitório pela ação do ácido clorogênico e da cafeína (SUAREZ-QUEIROZ et al., 2004) e também à qualidade final da bebida, assim como relatado por Carvalho e Chalfoun (1985), que amostras de café classificadas como bebida mole e dura apresentavam menores infecções por

*A. ochraceus* e menor produção de OTA do que cafés classificados como rio e riado.

Com a projeção de aumento de 1° C, projeção otimista, observa-se que a região da Zona da Mata aproxima-se mais das condições ótimas para a produção de OTA, com valor de 0,92. A região do Sul de Minas também se aproxima dessas condições, com valor de 0,89 e a região do Cerrado encontra-se nesta situação otimista fora das condições de produção de OTA, com -0,21.

De acordo com as projeções médias, observa-se que as regiões da Zona da Mata e Sul de Minas encontram-se praticamente em condições ótimas para a produção de OTA, com os resultados de 0,999 e 0,998, respectivamente, e a região do Cerrado se afasta ainda mais das condições ideais, com o -1,79.

Elevando-se a temperatura em 5,8°C (projeção pessimista), as regiões do Sul e Zona da Mata se afastam das condições ideais, com valores de 0,79 e 0,71, respectivamente, e a região do cerrado se mantém distante das condições para produção de OTA, com -6,25, fora de risco, de acordo com as projeções pessimistas e o modelo matemático utilizado.

De maneira geral, pode-se afirmar, de acordo com o modelo matemático e as projeções feitas por Assad et al. (2004) e pelo IPCC (INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE, 2004), que a região do Cerrado é a que tem menos riscos quanto à produção de OTA por *A. ochraceus*, em todos os parâmetros de temperatura avaliados. Já as regiões Zona da Mata e Sul de Minas apresentam maiores riscos para a produção da micotoxina, na faixa de projeção mediana, acrescendo 3 °C nas temperaturas atuais avaliadas.

Na Tabela 6 estão dispostos os resultados encontrados com o modelo matemático para germinação, crescimento e produção de OTA por *A. carbonarius*.

Tabela 6 Valores calculados a partir de projeções estabelecidas pelo IPCC com relação à germinação, ao crescimento e à síntese de OTA por fungos das espécies *Aspergillus carbonarius*. Valores variando entre 0 e 1

Região	Temperatura atual	+ 1 °C	+ 3 °C	+ 5,8 °C
<i>A. carbonarius</i>				
<b>Germinação</b>				
Zona da Mata	<b>0,94</b>	0,97	<b>0,99</b>	0,94
Sul	<b>0,93</b>	0,96	<b>0,99</b>	0,95
Cerrado	0,86	0,80	0,62	0,27
<b>Crescimento</b>				
Zona da Mata	0,79	0,85	0,95	<b>0,998</b>
Sul	0,76	0,83	0,93	<b>0,999</b>
Cerrado	<b>0,96</b>	0,91	0,75	0,367
<b>Síntese de OTA</b>				
Zona da Mata	1,03	1,04	1,04	<b>0,96</b>
Sul	1,02	1,03	1,04	<b>0,97</b>
Cerrado	0,88	0,80	0,62	<b>0,27</b>

Na Figura 6 apresenta-se a dispersão gráfica dos resultados obtidos dentro do intervalo de 0 a 1 para equação 1 do *Aspergillus carbonarius*, em função da temperatura.

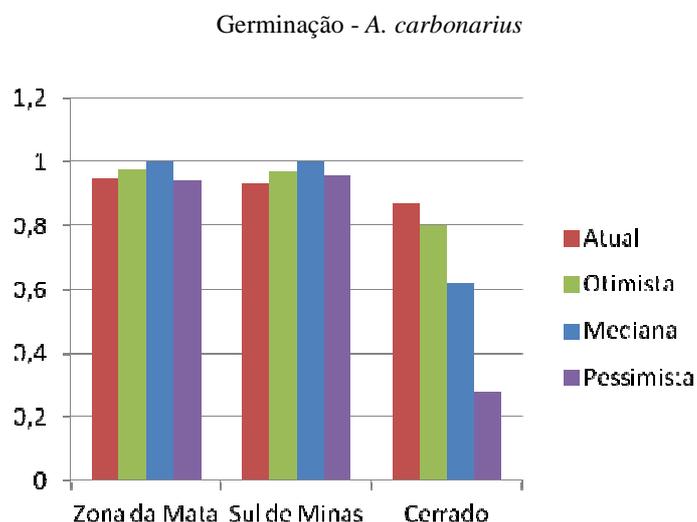


Figura 6 Germinação do *A. carbonarius* em função da temperatura

Foram encontrados resultados muito próximos aos ideais para germinação de *A. carbonarius* nas temperaturas atuais, sendo de 0,94, na Zona da Mata; de 0,93, no Sul de Minas e de 0,86, no Cerrado.

Com o acréscimo de 1 °C na temperatura atual das regiões avaliadas, o resultado mais alto foi observado na Zona da Mata (0,97), seguida do Sul de Minas, com 0,96 e do Cerrado, com 0,80. Nota-se, com os resultados obtidos no modelo, levando em consideração o fator temperatura, que, com o aumento da mesma, as regiões da Zona da Mata e Sul de Minas se tornariam mais aptas para germinação do *A. carbonarius* e a região do Cerrado, menos apta.

A projeção mediana eleva ainda mais os resultados da Zona da Mata e Sul de Minas, com resultados de 0,99 para ambas. Já para a região do Cerrado, o valor decresce para 0,62, sugerindo que, segundo o modelo, seria a região menos apta para germinação de *A. carbonarius*.

Observa-se, com a elevação da temperatura em 5,8 °C, que as três regiões apresentam valores inferiores aos observados na projeção mediana, com valores de 0,94, 0,95 e 0,27, para Zona da Mata, Sul de Minas e Cerrado, respectivamente. Porém, a região do Cerrado se mantém mais afastada da faixa de condições ótimas para a germinação, na projeção pessimista.

Na Figura 7 estão dispostos os resultados da equação 2 para o crescimento de *A. carbonarius*, em função da temperatura.

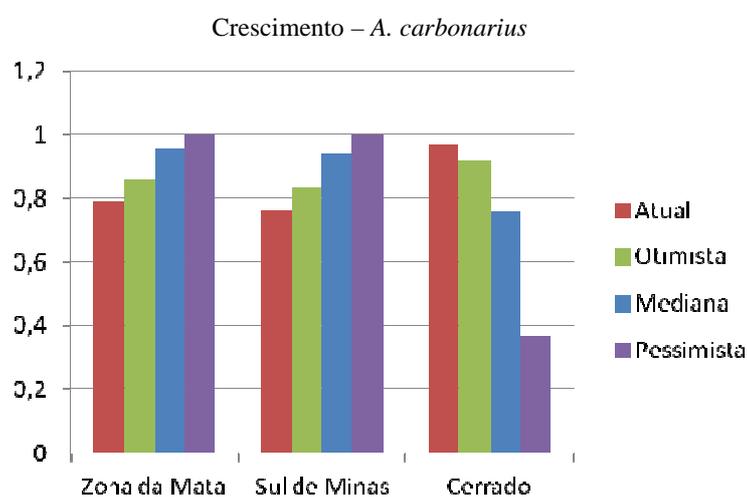


Figura 7. Crescimento de *A. carbonarius*, em função da temperatura

Os resultados obtidos, por meio da equação 2, para o crescimento de *A. carbonarius* utilizando as temperaturas atuais, apontam a região do Cerrado como a mais próxima das condições ótimas para o crescimento (0,96); Zona da Mata e Sul de Minas apresentaram valores de 0,79 e 0,76, respectivamente. Estes valores relacionam-se com os resultados dos procedimentos realizados em laboratório, nos quais foram isolados *A. carbonarius* somente em grãos da região do Cerrado.

*Aspergillus carbonarius* não são muito comuns em café (HOKING et al., 2007). Rezende (2010), em estudo direcionado com grãos de café convencional e orgânico, não encontrou isolados de *A. carbonarius*, espécie que tem capacidade de crescer em baixas Aw bem restritas (DUARTE; PENA; LINO, 2010).

Com a elevação de 1°C nas temperaturas atuais, as regiões da Zona da Mata e Sul de Minas obtiveram resultados aumentados em relação aos obtidos na temperatura atual, 0,85 e 0,83, respectivamente, porém, a região do Cerrado apresentou resultado inferior, de 0,93, em comparação aos resultados encontrados para as temperaturas atuais.

Avaliando as temperaturas sob a projeção mediana, observou-se que ocorreu um aumento dos valores nas regiões da Zona da Mata e do Sul de Minas e um decréscimo na região do Cerrado.

Para a condição pessimista (+ 5,8 °C), a Zona da Mata e o Sul de Minas obtiveram resultados com valores de 0,998 e 0,999, respectivamente, tornando-as praticamente em condições ótimas para o crescimento de *A. carbonarius*. Entretanto, a região do Cerrado que, nas condições atuais, é a mais susceptível para o crescimento, com a elevação da temperatura se torna menos favorável, com resultado de 0,367.

Na Figura 8 estão representados os valores encontrados na equação 3 para a produção de OTA por *A. carbonarius*.

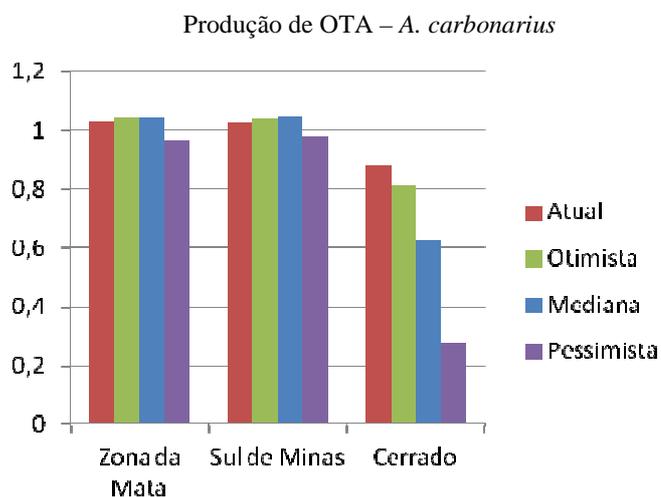


Figura 8 Produção de OTA por *A. carbonarius*, em função da temperatura

Com relação à produção de OTA por *A. carbonarius* nos valores de média de temperatura atuais, as regiões da Zona da Mata e do Sul de Minas se aproximam mais do valor ideal 1. Com a projeção otimista, os resultados observados são semelhantes aos encontrados na faixa de temperatura atual. De acordo com as projeções medianas, o valor encontrado para o Cerrado se mantém mais afastado de 1, portanto, fora das condições ótimas para a produção de OTA. Com o acréscimo de 5,8 °C às temperaturas atuais, o Cerrado, de acordo com o modelo, seria a região menos apta para a produção de ocratoxina A.

Pode-se observar, de acordo com as projeções e os resultados da equação 3, que a região do Cerrado teria condições mais favoráveis para a germinação do *A. ochraceus* nas condições atuais de temperatura, porém, com o aumento da temperatura em 5,8 °C se tornaria inapta para a germinação. Para o crescimento e a produção de OTA, a região da Zona da Mata, nas condições de

temperatura atuais, é a mais apta, seguida da região do Sul de Minas, com a projeção mediana se encontra nas condições ótimas.

Observa-se, para a germinação do *A. carbonarius*, que as regiões da Zona da Mata e do Sul de Minas seriam as mais aptas para a germinação, chegando nas condições ótimas com o acréscimo de 3 °C. Já a região do Cerrado, com todos os aumentos de temperatura simulados, se tornou cada vez mais inapta para a germinação. Com relação ao crescimento, a região do Cerrado, nas condições atuais de temperatura, é a mais apta para o crescimento, o que confirma os resultados encontrados em laboratório. Com o aumento de temperatura de 5,8° C, a região do Cerrado se tornaria inapta para o crescimento e para a produção de OTA. Pode-se sugerir, apenas avaliando as variáveis utilizadas no modelo matemático, desconsiderando outros fatores exógenos, como fatores intrínsecos do grão, fisiologia do fungo e condições de colheita e de pós-colheita, que, de acordo com as temperaturas atuais, as regiões onde o *A. ochraceus* pode ser mais incidente são a Zona da Mata e o Sul de Minas. O aumento da temperatura vai favorecer o crescimento de *A. carbonarius* e a produção de OTA nestas regiões, no decorrer dos anos, porém, o aumento da temperatura no Cerrado poderá diminuir estas condições favoráveis. Para a germinação do *A. carbonarius* nas condições de temperatura atual, a região do Cerrado é a menos favorável. Com o aumento da temperatura, as regiões da Zona da Mata e do Sul de Minas ficam ainda mais aptas para a germinação. Com relação ao crescimento, a região do Cerrado, com as temperaturas atuais, é a mais favorável ao crescimento, porém, com o aumento da temperatura, se torna inapta, tanto para o crescimento de *A. carbonarius* quanto para a produção de OTA.

No que se refere às projeções e aos resultados encontrados no modelo matemático, nas condições de temperatura atuais, a região do Cerrado seria potencialmente mais incidente em *A. ochraceus* e *A. carbonarius*, porém, com o

aumento da temperatura, ela se tornaria fora das condições ótimas. Portanto, sugere-se que a distribuição das espécies por região com o aumento da temperatura seria maior na Zona da Mata e no Sul de Minas, invertendo-se as condições encontradas atualmente para o Sul de Minas. É importante o conhecimento dos fatores que favorecem a infecção dos grãos e a síntese de OTA, para ajudar no controle dos processos envolvidos e na redução da incidência e da contaminação pela toxina (TANIWAKI et al., 2003).

Atualmente, existem poucos modelos que prevejam níveis de micotoxinas (VAN DER FELLS-KLERX et al., 2010). O atual modelo, adaptado do modelo proposto por Maiorano et al. (2009), é a primeira tentativa de quantificar OTA com base em parâmetros meteorológicos e condições fenológicas.

Sabe-se que o efeito das mudanças climáticas pode resultar em aumento de hibernação, mudanças nas taxas de crescimento populacional, aumento do número de gerações e extensão do período de desenvolvimento (PORTER et al., 1991). Segundo Doohan, Brennan e Cooke (2003), que estudaram as populações fúngicas presentes no milho, a temperatura e a umidade são os principais fatores climáticos que influenciam a infecção fúngica nessa cultura.

O crescimento e a produção de toxinas são intimamente influenciados pelas exigências de água pelas espécies de fungos, bem como temperatura, pH e substrato (SCUSSEL, 1998). Deve-se levar em consideração a adaptação das espécies no decorrer dos anos, portanto, medidas preventivas de controle nos processos de colheita, pós-colheita e armazenamento ainda devem ser adotadas.

#### 4 CONCLUSÃO

A Zona da Mata foi a região mais incidente em fungos potencialmente toxigênicos do gênero *Aspergillus* do estado de Minas Gerais, seguida do Cerrado e do Sul de Minas.

Foram identificadas, na região da Zona da Mata, as espécies *A. brasiliensis*, *A. foetidus*, *A. japonicus*, *A. niger* agregado, *A. niger*, *A. tubingenses*, *A. auricomus*, *A. insulicola*, *A. melleus*, *A. ochraceus* e *A. sulphureus*. Foram encontradas as espécies *A. brasiliensis*, *A. carbonarius*, *A. foetidus*, *A. niger* agregado, *A. niger*, *A. tubingenses*, *A. ochraceus* e *A. sulphureus*, na região do Cerrado. Na região do Sul de Minas, foram identificados os fungos das espécies *A. foetidus*, *A. niger* agregado, *A. niger*, *A. tubingenses* e *A. sulphureus*.

A incidência de isolados produtores, de acordo com o método plug ágar, foi igual na Zona da Mata e no Cerrado, tendo a região do Cerrado maior diversidade de espécies produtoras.

Não houve detecção de OTA em nenhuma amostra avaliada pelo método de cromatografia líquida (CLAE).

Segundo os resultados encontrados no modelo matemático, de acordo com as médias de temperaturas atuais e as projeções do IPCC, as mudanças de temperatura podem influenciar a distribuição de espécies toxigênicas nas regiões produtoras de café em Minas Gerais, bem como o risco para a produção de ocratoxina A.

## REFERÊNCIAS

ABARCA, M. L. et al. Taxonomy and significance of black aspergilli. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 86, n. 1, p. 33-49, July 2003.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 22 fev. 2011.

ALVES, H. M. R.; VOLPATO, M. M. L.; VIEIRA, T. G. C. Características ambientais e qualidade da bebida dos cafés do estado de Minas Gerais. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 32, n. 261, p.18-29, abr. 2011.

ASSAD, E. D. et al. Impacto das mudanças climáticas no zoneamento agroclimático do café no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 11, p. 1057–1064, nov. 2004.

AYOADE, J. O. **Introdução à climatologia para os trópicos**. 9. ed. Rio de Janeiro: Bertrand Brasil, 2003.

BATISTA, L. R. et al. Ochratoxin A in coffee beans (*Coffea arabica* L.) processed by dry and wet methods. **Food Control**, Guildford, v. 20, n. 9, p. 784-790, Sept. 2009.

BATISTA, L. R. et al. Toxigenic fungi associated with processed (green) coffee beans (*Coffea arabica* L.). **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 85, n. 3, p. 293-300, Aug. 2003.

BATISTA, L. R.; CHALFOUN, S. M. Incidência de ocratoxina A em diferentes frações do café (*Coffea arabica* L.): bóia, mistura e varrição após secagem em terreiros de terra, asfalto e cimento. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 3, p. 804-813, maio/jun. 2007.

BATTILANI, P.; MAGAN, N.; LOGRIECO, A. European research on ochratoxin A in grapes and wine. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 111, n. 1, p. 52-54, Sept. 2006.

BELLI, N. et al. *Aspergillus carbonarius* growth and ochratoxinA production on a synthetic grape medium in relation to environmental factors. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 98, n. 4, p. 839-844, Apr. 2005.

BEUX, M. R.; SCCOL, C. R. Microbiota isolada durante as fases de pré e pós colheita dos grãos de café associada à qualidade e sanidade da bebida. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 22, n. 1, p. 155-176, jan./jun. 2004.

BEYER, M. et al. Germination and survival of *Fusarium graminearum* macroconidia as affected by environmental factors. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 152, n. 2, p. 92-97, Feb. 2004.

BULLERMAN, L. B.; TSAI, W. J. Incidence and levels of *Fusarium moniliforme*, *Fusarium proliferatum* and fumonisins in corn and corn-based foods and feeds. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 57, n. 6, p. 541-546, June 1994.

CARVALHO, V. D.; CHAGAS, S. J. R.; SOUZA, S. M. C. Fatores que afetam a qualidade do café. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 18, n. 187, p. 5-20, 1997.

CARVALHO, V. D.; CHALFOUN, S. M. Aspectos quantitativos do café. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 11, n. 126, p. 79 -92, 1985.

CHAGAS, S. J. de R.; MALTA, M. R. Avaliação química e qualitativa de Cafés de alguns municípios produtores da região do Vale de Jequitinhonha de Minas. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 3., 2003, Porto Seguro. **Resumos...** Brasília: Embrapa Café, 2003.

CHALFOUN, S. M. et al. Efeito da cafeína (1,3,7-trimethylxantina) sobre o crescimento micelial de fungos associados ao café. **Revista Brasileira de Armazenamento**, Viçosa, n. 1, p. 50-53, 2000.

CHALFOUN, S. M.; BATISTA, L. R. **Fungos associados a frutos e grãos de café *Aspergillus & Penicillium***. Brasília: Embrapa, 2003.

CORTEZ, J. G. Aptidão climática para qualidade da bebida nas principais regiões cafeeiras de Minas Gerais. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 18, n. 187, p. 21-26, 1997.

DOOHAN, F. M.; BRENNAN, J.; COOKE, B. M. Influence of climatic factors on Fusarium species pathogenic EUR. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 109, p. 755-768, 2003.

DUARTE, S. C.; PENA, A.; LINO, C. M. Review on ochratoxin A occurrence and effects of processing of cereal and e cereal derived food products. **Food Microbiology**, London, v. 27, n. 2, p. 187-198, Apr. 2010.

DURAN, N. D. et al. Application of PCR-DGGE to the study of dynamics and biodiversity of yeast and potentially OTA producing fungi during coffee processing. **Food Control**. Guildford, v. 34, n. 2, p. 466-471, Dec. 2013.

ESTEBAN, A. et al. Study of the effect of water activity and temperature on ochratoxinA production by *Aspergillus carbonarius*. **Food Microbiology**. London, v. 23, n. 7, p. 634-640, Oct. 2006.

FERREIRA, G. F. P. et al. Fungos associados a grãos de café (*Coffea arabica* L.) beneficiados no sudoeste da Bahia. **Summa Phytopathology**, Botucatu, v. 37, n. 3, p. 98-102, jul./set. 2011.

FILTENBORG, O.; FRISVAD, J. C. A simple screening method for toxigenic moulds in pure cultures. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie**, London, v. 13, n. 3, p. 128-130, 1980.

FUJJI, S. et al. Ocratoxina A em café: Controle metodologia analítica com ênfase à inovação no contexto de segurança alimentar. **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 23, n. 2, p. 273-292, jul./dez. 2002.

FUNDAÇÃO CENTRO TECNOLÓGICO DE MINAS GERAIS. **Diagnóstico ambiental do estado de Minas Gerais**. Belo Horizonte: CETEC, 1983. (Série de Publicações Técnicas, 10).

GIOMO, G. S.; BORÉM, F. M. F. Cafés especiais no Brasil: opção pela qualidade. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 32, n. 261, p. 7-16, mar./abr. 2011.

HARRIS, D. C. **Análise química quantitativa**. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2008.

HOCKING, A. D. et al. Fungi and mycotoxins in vineyards and grape products. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 119, n. 1-2, p. 84-88, Oct. 2007.

INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE.

**Intergovernmental panel on climate change: the scientific basis-contribution of working group 1 to the IPCC third assessment report**. Cambridge University Press, 2004.

JOOSTEN, H. M. et al. Production of ochratoxin A by *Aspergillus carbonarius* on coffee cherries. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 65, n. 1-2, p. 39-44, Apr. 2001.

KLICH, M. A. **Identification of common Aspergillus species**. Wageningen: Central Bureau Voors Chimmel Cultures, 2002.

KONISHI, Y. S. et al. The comparison of two clean-up procedures, multifunctional column and immunoaffinity column, for HPLC determination of

ochratoxin A in cereals, raisins and green coffee beans. **Talanta**, Amsterdam, v. 69, n. 3, p. 650-655, May 2006.

LEONG, S. L. et al. Ochratoxin A-producing *Aspergilli* in Vietnamese green coffee beans. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 45, n. 3, p. 301-306, Sept. 2007.

MAGNANI, M. et al. Molecular identification of *Aspergillus* spp. isolated from coffee beans. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 62, n. 1, p. 45-49, Jan. 2005.

MAGNOLI, C. E. et al. Mycoflora and ochratoxin-producing strains of *Aspergillus* section *Nigri* in wine grapes in Argentina. **Letters Applied Microbiology**. Oxford, v. 37, n. 2, p. 179-184, July 2003.

MAIORANO, A. et. al. A dynamic risk assessment model (FUMAGrain) of fumonisin synthesis by *Fusarium verticillioides* in maize grain in Italy. **Crop Protection**, Amsterdam, v. 28, n. 3, p. 243-256, Mar. 2009.

MARENCO, J.; NOBRE, C. A. The hydro clima to logical framework in Amazonia. In: RICHEY, J.; MCCLAIN, M.; VICTORIA, R. (Ed.). **Biogeochemistry of Amazonia**. New York: UNDP, 2001. p. 17-42.

MARTINS, M. L.; MARTINS, H. M.; GIMENO, A. Incidence of microflora and of ochratoxin A in green coffee beans (*Coffea arabica*). **Food Additives and Contaminants**, London, v. 20, n. 12, p. 1127-1131, Dec. 2003.

MEIRELLES, A. M. A. **Ocorrência e controle da microflora associada aos frutos de café (*Coffea arabica* L.) provenientes de diferentes localidades do estado de Minas Gerais**. 1990. 72 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1990.

MOSS, M. O. Mode of formation of ochratoxin A. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 13, supl. p. 5-9, 1996.

NASSER, P. P. et al. Implicações do fungo *Aspergillus niger* sobre o crescimento de isolados de *Aspergillus* da seção *Circumdatti* e produção de Ocratoxina A. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 5, p. 1172-1175, set./out. 2003.

OLIVEIRA, G. **Efeito de diferentes pontos de torração e tipos de granulometria na concentração de ocratoxina A em grãos de café**. 2012. 86 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

PARDO, E. et al. Prediction of fungal growth and ochratoxin A production by *Aspergillus ochraceus* on irradiated barley grain as influenced by temperature and water activity. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 95, n. 1, p. 79-88, Aug. 2004a.

PATERSON, R. R.; LIMA, N. How will climate change affect mycotoxin in food? **Food Research International**, Dublin, v. 43, n. 7, p. 1902-1914, Aug. 2010.

PELLEGRINO, G. Q.; ASSAD, E. D.; MARIN, F. R. Mudanças climáticas globais e a agricultura no Brasil. **Multiciência**, São Carlos, n. 8, p. 139-162, maio 2007.

PERRONE, G. et al. Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 59, p. 53-66, 2007.

PERRONE, G. et al. Ochratoxin A production and amplified fragment length polymorphism analysis of *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus tubingensis*, and *Aspergillus niger* strains isolated from grapes in Italy. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, n. 1, p. 680-685, Jan. 2006.

PIMENTA, C. J.; VILELA, E. R. Composição microbiana e ocratoxina no café (*Coffea arabica* L.) submetido a diferentes tempos de espera antes da secagem. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 6, p. 1315-1320, nov./dez. 2003.

PITT, J. I. Toxigenic fungi: which are important? **Medical Mycology**, Oxford, v. 38, supl. 1, p. 17–22, 2000.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. 2. ed. London: Blackie Academic & Professional, 1997.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. 3. ed. London: Blackie Academic & Professional, 2009.

PORTER, A. et al. **Forecasting and management of technology**. New York: John Wiley&Sons, 1991.

PRADO, E. et al. Occurrence of ochratoxigenic fungi and ochratoxina A in green coffee from different origins. **Food Science and Technology International**, London, v. 10, n. 1, p. 45-49, Feb. 2004.

PRADO, G. et al. Incidência de Ocratoxina A em café torrado e moído e em café solúvel consumido na cidade de Belo Horizonte, MG. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v. 20, n. 2, p. 192-196, maio/ago. 2000.

PRANDINI, A. et al. Review of predictive models for Fusarium head blight and related mycotoxin contamination in wheat. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 47, n. 5, p. 927-931, May 2009.

RAMOS, A. J. et al.. Effect of water and temperature on growth and ochratoxin production by three strains of *Aspergillus ochraceus* on a barley extract medium and on barley grains. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 44, n. 1-2, p. 133-140, Oct. 1998.

REZENDE, E. F. et al. Fungos ocratoxigênicos associados com grãos de café verde (*Coffea arabica* L.) em cultivo convencional e orgânica no Brasil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 44, n. 2, p. 1517-8382, 2013.

REZENDE, F. E. **Biodiversidade, fungos ocratoxigêncios e ocratoxina A em grãos de café (*Coffea arabica* L.) de cultivo convencional e orgânico.** 2010. 86 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

ROBERTO, C. D. **Aplicação dos princípios do sistema de análise de perigos e pontos críticos de controle para avaliação da segurança do café no processamento pós colheita.** 2008. 132 p. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.

ROSSO, L. et al. An unexpected correlation between cardinal temperatures of microbial growth highlighted by a new model. **Journal of Theoretical Biology**, London, v. 162, n. 4, p. 447-463, June 1993.

SAES, M. S. M.; NAKAZONE, D. O agronegócio café do Brasil no mercado internacional. **FAE Business**, Curitiba, n. 9, set. 2004. Disponível em: <[http://www.fae.edu/40publicacoes/pdf/revista\\_fae\\_business/n9/12\\_agronegocio.pdf](http://www.fae.edu/40publicacoes/pdf/revista_fae_business/n9/12_agronegocio.pdf)>. Acesso em: 14 abr. 2013.

SAMSOM, R. A. et al. **Introduction to food and airborne fungi.** 4 th. ed. Wageningen: Central Bureau Voor Schimmel Cultures, 2000.

SCOLFORO, J. R. et al. **Zoneamento ecológico econômico de Minas Gerais.** Lavras: Editora da UFLA, 2007. 1 CD-ROM.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, Arlington, v. 30, n. 2, p. 507-512, Sept. 1974.

SCUSSEL, V. M. **Micotoxinas em alimentos.** Florianópolis: Insular, 1998.

SIQUEIRA, O. J. W.; STEINMETZ, S.; SALLES, L. A. B. de. Efeitos potenciais das mudanças climáticas na agricultura brasileira e estratégias adaptativas para algumas culturas. In: LIMA, M. A.; CABRAL, O. M. R.; MIGUEZ, J. D. G. **Mudanças climáticas globais e a agropecuária brasileira**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2001. p. 33-63.

SOUZA, S. M. C.; CARVALHO, V. L. Efeitos de microrganismos na qualidade da bebida do café. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 18, n. 187, p. 21-23, 1997.

SUÁREZ-QUEIROZ, M. L. et al. Effect of chemical and environmental factors on *Aspergillus ochraceus* growth and toxigenesis in green coffee. **Food Microbiology**, London, v. 21, n. 6, p. 629-634, Dec. 2004.

TANIWAKI, M. H. et. al. The source of ochratoxin A and Brazilian coffee and its formation and relation to processing methods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 82, n. 2, p. 173-179, Apr. 2003.

TERRA, M. F. **Fungos toxigênicos em solos de vinhas, uvas e mostos e ocratoxina A em vinhos do submédio São Francisco**. 2011. 151 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

VAN DER FELLS-KLERX, H. J. et. al. Perspectives for geographically oriented management of Fusarium micotoxins in the cereal supply chain. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 73, n. 6, p. 1153-1159, June 2010.

VARGAS, E. A.; SANTOS, E. A. Determination of ochratoxin A in green coffee by immune affinity column cleanup and liquid chromatography: collaborative study. **Journal AOAC International**, Arlington, v. 68, n. 3, p. 773-779, May 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Joint FAO/WHO food standards programme Codex Committee on contaminants in food**. Rome: WHO, 2006.

ZWIETERING, M. H. et al. Application of predictive microbiology to estimate the number of *Bacillus cereus* in pasteurised milk at the point of consumption. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 30, n. 1-2, p. 55-70, June 1996.

## ANEXOS

Tabela 1 Valores de referência para temperaturas mínimas, ótimas e máximas para germinação, crescimento e síntese de OTA, por fungos das espécies *A. ochraceus* e *A. carbonarius*

<i>Aspergillus ochraceus</i>		
Parâmetros	Valor	Referência
<b>Germinação</b>		
T min	10 °C	Pitt e Hocking (2009)
T otim	30 °C	Pitt e Hocking (2009)
T Max	37 °C	Pitt e Hocking (2009)
<b>Crescimento</b>		
T min	10 °C	Ramos et al (1998)
T otm	25 °C -30 °C	Ramos et al (1998)
T Max	37 °C	Ramos et al (1998)
<b>Síntese de OTA</b>		
T min	12 °C	Ramos et al (1998)
T otim	25 °C-30 °C	Pardo et al (2005)
T Max	30 °C	Ramos et al (1998)
<i>Aspergillus carbonarius</i>		
Parâmetros		
<b>Germinação</b>		
T min	15 °C	Pitt e Hocking (2009)
T otim	15 °C-35 °C	Pitt e Hocking (2009)
T max	37 °C	Pitt e Hocking (2009)
<b>Crescimento</b>		
T min	10 °C	Beliet al (2005)
T otim	20 °C-35 °C	Beliet al (2005)
T max	37 °C	Beliet al (2005)
<b>Síntese de OTA</b>		
T min	15 °C	Beliet al (2005)
T otim	20 °C	Beliet al (2005)
T max	35 °C-37 °C	Beliet al (2005)

Tabela 2 Dados de média de temperatura dos meses de setembro a dezembro de 2012, nas regiões estudadas, (INMET 2014)

<b>Região</b>	<b>Média T</b>	<b>T O + 1 °C</b>	<b>T M + 3 °C</b>	<b>T P + 5,8 °C</b>
Sul	21,75 °C	22,75 °C	24,75 °C	27,55 °C
Z. da Mata	22,15 °C	23,15 °C	25,15 °C	27,55 °C
Cerrado	29,40 °C	30,40 °C	32,40 °C	35,20 °C