



LUCIANO NASCIMENTO DE ALMEIDA

**INCIDÊNCIA DE FUNGOS FILAMENTOSOS E PERFIL DE
MICROBIOTA OCRATOXIGÊNICA EM GRÃOS DE CAFÉ
(*Coffea arabica* L.) PROCESSADOS PELO MÉTODO VIA-
SECA EM MINAS GERAIS**

**LAVRAS - MG
2020**

LUCIANO NASCIMENTO DE ALMEIDA

**INCIDÊNCIA DE FUNGOS FILAMENTOSOS E PERFIL DE MICROBIOTA
MICOLOGIA EM GRÃOS DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.) PROCESSADOS
PELO MÉTODO VIA-SECA EM MINAS GERAIS**

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

Prof. Dr. Luís Roberto Batista
Orientador

Dr.^a Sara Maria Chalfoun de Souza
Coorientadora

LAVRAS - MG

2020

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha
Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados informados
pelo(a) próprio(a) autor(a).**

de Almeida, Luciano Nascimento.

L.) processados pelo método via-seca em Minas Gerais /
Luciano Nascimento de Almeida. - 2020.

70 p.

Orientador(a): Luís Roberto Batista.

Coorientador(a): Sara Maria Chalfoun de Souza.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2020.

Bibliografia.

1. Grãos de café. 2. Fungos filamentosos. 3. Ocratoxina A. I.
Batista, Luís Roberto. II. Chalfoun de Souza, Sara Maria. III.
Título.

LUCIANO NASCIMENTO DE ALMEIDA

**INCIDÊNCIA DE FUNGOS FILAMENTOSOS E PERFIL DE MICROBIOTA
OCHRATOXIGÊNICA EM GRÃOS DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.) PROCESSADOS
PELO MÉTODO VIA-SECA EM MINAS GERAIS**

**INCIDENCE OF FILAMENTOUS FUNGI AND PROFILE OF OCHRATOXYGEN
MYCOBIOTA IN COFFEE BEANS (*Coffea arabica* L.) PROCESSED BY THE DRY
METHOD IN MINAS GERAIS**

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

APROVADA em 09 de novembro de 2020.

Dr. ^a Águida Aparecida de Oliveira	UFRRJ
Dr. ^a Suzana Reis Evangelista	UFLA
Dr. ^a Sara Maria Chalfoun de Souza	EPAMIG


Prof. Dr. Luís Roberto Batista
Orientador

LAVRAS - MG

2020

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras, em especial ao Departamento de Ciência dos Alimentos-DCA e ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola- PPGMA, por todo o apoio na execução desta pesquisa.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001. Muito obrigado pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Dr. Luís Roberto Batista, por ter me concedido a oportunidade, pela confiança e pela amizade e à Dr.^a Sara Maria Chalfoun de Souza pelos ensinamentos, pela paciência, pela amizade e por toda a sua contribuição durante toda a execução e sucesso desse trabalho.

Aos meus amigos da pós-graduação Ana Luíza Fortes, Miriam Aguilar, Mariana Prósperi, Taís Neves, João Pedro Guimarães, Mauro Guilherme e Carlos Vinícius, que contribuíram direta ou indiretamente com a execução desse trabalho, seja por incentivo, companheirismo e por apenas depositar confiança nos momentos difíceis.

Agradeço à secretária do Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola, Rose, por ser tão prestativa e eficiente, além de demonstrar muita paciência e educação no dia-a-dia, e por ser tão esclarecedora ao tirar dúvidas.

Agradeço aos membros do Núcleo de estudos em Taxonomia Polifásica de *Aspergillus* e *Penicillium*-NETAX, por toda prestatividade, apoio e por sempre estarem dispostos a me ajudar nos momentos de dúvidas, em especial à Dr.^a Suzana Reis Evangelista, à Dr.^a Fabiana Reinis Passamani e a doutoranda Natasha de Azevedo Lira.

MUITO OBRIGADO!

RESUMO GERAL

Os fungos filamentosos quando associados à grãos de café, podem sob determinadas condições fisiológicas e ambientais ocasionar danos que refletem na qualidade, produzindo odores e sabores desagradáveis, além de favorecer a produção de micotoxinas. Este trabalho objetivou avaliar a diversidade de fungos filamentosos em grãos de café provenientes de cinco fazendas pertencentes ao estado de Minas Gerais, das mesorregiões Sul/ Sudoeste e Vale do Mucuri, além disso, buscou-se de e realizar a quantificação da produção de ocratoxina A por fungos potencialmente ocratoxigênicos. A identificação foi realizada com a junção de diferentes técnicas tais como: Avaliação morfológica, MALDI TOF MS e sequenciamento das regiões ITS e β - tubulina. A quantificação de OTA dos isolados foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Foram isolados 389 fungos filamentosos e a identificação morfológica revelou seis gêneros de fungos: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Complexo Cladosporium cladosporioides*, *Alternaria* e *Eurotium*. Os percentuais de contaminação variaram de 7 a 100% entre as amostras. No meio DRBC foram isolados 226 fungos filamentosos, equivalente a 58,09% do total de isolados. No meio DG18 foram isolados 163 fungos filamentosos, correspondendo a 41,90% do total de isolados. Apenas 5 isolados foram identificados por MALDI TOF MS, 2 a nível de gênero (*Penicillium* sp.) e 3 a nível de espécie: *A. niger*. Foram identificados por sequenciamento 24 isolados representantes, sendo 8 pertencentes ao gênero *Penicillium* e 16 à *Aspergillus*, 22 foram identificados a nível de espécie e 2 a nível de gênero. 41,88% dos isolados produziram OTA. *Aspergillus* Seção *Nigri* foram mais frequentes, correspondendo a 90,58% do total de isolados potencialmente ocratoxigênicos, no entanto, apenas 39,5% produziram OTA. Os isolados de *Aspergillus* Seção *Circumdati* corresponderam a 10,42% dos isolados potencialmente ocratoxigênicos e 67% dos isolados foram produtores de OTA. Os cafés dos municípios de Itaipé e São Sebastião do Paraíso, apresentaram maior incidência de isolados produtores de OTA em concentrações elevadas. A presença de fungos toxigênicos não indica necessariamente a presença de OTA, mas indica um risco potencial.

Palavras-chave - Grãos de café, fungos filamentosos, ocratoxina A.

GERAL ABSTRACT

Filamentous fungi when associated with coffee beans, can under certain physiological and environmental conditions cause damage that reflects on quality, producing unpleasant odors and flavors, in addition to favoring the production of mycotoxins. This work aimed to evaluate the diversity of filamentous fungi in coffee beans from five farms belonging to the state of Minas Gerais, from the South / Southwest and Vale do Mucuri mesoregions, in addition, we sought to select ochratoxigenic fungi and perform the quantification of production ochratoxin A by these. The identification was performed with the combination of different techniques such as: morphological characteristics, MALDI TOF MS and sequencing of the ITS and β -tubulin regions. The quantification of OTA of the isolates was performed by high performance liquid chromatography (HPLC). 389 filamentous fungi were isolated and the morphological identification revealed six genera of fungi: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Cladosporium cladosporioides* complex, *Alternaria* and *Eurotium*. The contamination percentages varied from 7 to 100% between samples. In the DRBC medium, 226 filamentous fungi were isolated, equivalent to 58.09% of the total isolates. In the DG18 medium, 163 filamentous fungi, corresponding to 41.90% of the total of isolated fungi. Only 5 isolates were identified by MALDI TOF MS, 2 at the genus level (*Penicillium* sp) and 3 at the species level: *A. niger*. 24 representative isolates were identified by sequencing, 8 belonging to the genus *Penicillium* and 16 to *Aspergillus*, 23 were identified at the species level and 2 at the gender level. 41.88% of the isolates produced OTA. *Aspergillus* Section *Nigri* were more frequent, corresponding to 90.58% of the total of potentially ochratoxigenic isolates, however, only 39.5% produced OTA. The isolates of the *Circumdati* Section, corresponded to 10.42% of the potentially ochratoxigenic isolates and 67% of the isolates were OTA producers. The coffees from the municipalities of Itaipé and São Sebastião do Paraíso had a higher incidence of isolates producing OTA in high concentrations. The presence of toxigenic fungi does not necessarily indicate the presence of OTA, but it does indicate a potential risk.

Keywords - Coffee beans, filamentous fungi, ochratoxin A.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação esquemática do fruto de café e suas partes.....	14
Figura 2 – Principais países exportadores de café nos últimos quatro anos.....	15
Figura 3 – Produção mundial de café arábica e robusta.....	16
Figura 4 – Produção total pelos principais países exportadores.....	17
Figura 5 – Produção total de café pelos principais estados brasileiros.....	18
Figura 6 – Principais etapas envolvidas na fermentação seca ou natural do café.....	20
Figura 7 – Estrutura química da OTA.....	23
Figura 8 – Localização geográfica dos pontos de amostragem.....	35
Figura 9 – Representação da retirada dos plugs das colônias fúngicas.....	42
Figura 10 – Percentual de contaminação de grãos de café dos meios DRBC e DG18.....	44
Figura 11 - Incidência de contaminação de grãos de café por fungos filamentosos.....	46
Figura 12 – Distribuição de gêneros de fungos filamentosos isolados.....	47
Figura 13 – Frequência de ocorrência (%) de fungos filamentosos presentes nas amostras A1 a A5 isolados do meio DRBC.....	49
Figura 14 – Frequência de ocorrência (%) de fungos filamentosos presentes nas amostras A1 a A5 isoladas do meio DG18.....	51
Figura 15 – Análise de componentes principais–PCA do meio de cultura DRBC.....	54
Figura 16 – Análise dos componentes- PCA do meio de cultura DG18.....	55
Figura 17 - - Árvore filogenética de máxima verossimilhança do gênero <i>Aspergillus</i>	60
Figura 18 – Cromatograma da solução padrão de OTA.....	61
Figura 19 – Isolado produtor de ocratoxina A isolado de grãos de café proveniente da amostra A1.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características climáticas dos locais de amostragem.....	36
Tabela 2 – Composição dos meios de cultura DRBC e DG18.....	37
Tabela 3 – Composição dos meios de cultura CYA e MEA.....	38
Tabela 4 – Isolados dos gêneros <i>Aspergillus</i> e <i>Penicillium</i> relacionados com a espécie mais próxima disponível no BLAST e os respectivos valores de cobertura (cobert.) e máxima identidade.....	56
Tabela 5 – Percentual de fungos ocratoxigênicos isolados a partir das amostras.....	61
Tabela 6 – Valores das concentrações de OTA dos isolados.....	64

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1	11
1	INTRODUÇÃO GERAL	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1	Aspectos gerais da cafeicultura.....	13
2.2	Economia e produção de café.....	14
2.3	Método de processamento via-seca.....	18
2.4	Ocorrência de fungos filamentosos em café.....	20
2.5	Ocratoxina A.....	21
2.6	Fungos ocratoxigênicos em café.....	23
2.7	Fatores que influenciam a produção de OTA.....	24
2.8	Legislações inerentes à OTA em café.....	25
	REFERÊNCIAS	27
	CAPÍTULO 2	32
1	INTRODUÇÃO	34
2	MATERIAL E MÉTODOS	35
2.1	Áreas de estudo.....	35
2.2	Coleta de amostras e condução do experimento.....	36
2.3	Avaliação e isolamento dos fungos filamentosos presentes nos grãos de café.....	37
2.4	Identificação fenotípica dos fungos filamentosos.....	38
2.5	Identificação por Maldi-TOF MS.....	39
2.6	Identificação dos isolados através do sequenciamento.....	40
2.6.1	Extração e Purificação de DNA.....	40
2.6.2	Amplificação por PCR.....	40
2.6.3	Sequenciamento Sanger.....	41
2.7	Análise de produção de OTA pelos isolados por CLAE.....	41
2.7.1	Extração da OTA das culturas fúngicas.....	41
2.8	Análises estatísticas.....	42
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
3.1	Percentual de contaminação dos grãos de café por fungos.....	44
3.2	Diversidade de fungos por identificação morfológica.....	46
3.3	Análise dos componentes principais – PCA.....	53
3.4	Análise dos perfis proteicos por MALDI-TOF MS.....	55
3.5	Identificação molecular dos isolados.....	56
3.6	Quantificação de OTA dos isolados por CLAE.....	60
4	CONCLUSÃO	66
	REFERÊNCIAS	67

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO GERAL

O café é uma das *commodities* mais importantes para a economia mundial. Estima-se que mais de dois bilhões de xícaras de café são consumidas diariamente no mundo (TANIWAKI et al., 2014; DURAND et al., 2013). No Brasil, o café caracteriza-se por ser um dos principais produtos agrícolas de exportação e um importante gerador de riquezas para o país, além de apresentar uma função social, fixando a mão de obra no campo, consequentemente gerando emprego e renda. Atualmente, o país assume o ranking de principal produtor, exportador e consumidor dessa *commodity* (ICO, 2020).

O café é submetido a determinados processos antes de ser consumido como bebida e vários fatores contribuem para sua qualidade final, incluindo a população microbiana presente (TANIWAKI et al., 2014). Os frutos e os grãos de café estão sujeitos à contaminação e consequente colonização por microrganismos durante as diferentes fases de desenvolvimento, colheita, preparo, transporte e armazenamento. Dessa forma, a ação microbiana prejudicial em frutos e grãos de café, pode comprometer a qualidade e segurança do produto final (BATISTA et al., 2003).

A crescente demanda por cafés de alta qualidade gera uma maior preocupação com padrões de segurança, incluindo a necessidade de entender o ambiente microbiano e determinar o papel desses microrganismos na qualidade e segurança da bebida final (EL SHEIKHA; NGANOU, 2018). Dentre os microrganismos, os fungos filamentosos representam o principal grupo causador de danos em frutos e grãos de café (OLIVEIRA, 2016).

Os fungos filamentosos quando associados à grãos de café, podem sob determinadas condições fisiológicas e ambientais ocasionar danos que refletem na qualidade, produzindo odores e sabores desagradáveis, além de favorecer a produção de micotoxinas. Dentre as micotoxinas presentes no café, a ocratoxina A (OTA) é a mais comum, produzida principalmente por espécies de fungos dos gêneros *Aspergillus* pertencentes às Seções *Nigri* e *Circumdati* e *Penicillium* pelas espécies *P. nordicum* e *P. verrucosum* (GIL-SERNA et al., 2010; VILELA et al., 2010).

A OTA apresenta propriedades nefrotóxicas, imunotóxicas, genotóxicas e teratogênicas. Os cereais e seus produtos derivados são considerados a principal fonte de

exposição da OTA ao ser humano, sendo 10% dessa exposição ocasionada pelo café (EL SHEIKHA; NGANOU, 2018; PFOHL-LESZKOWICZ; MANDERVILLE, 2007). Essa micotoxina tem sido classificada como um possível carcinógeno humano (grupo 2B) pela Agência Internacional de Pesquisa do Câncer (IARC, 1993).

A União Europeia estabeleceu que 5 µg / kg é o nível máximo permitido para o conteúdo de OTA no café torrado e moído, e 10 µg / kg no café instantâneo (COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES-CEC, 2006). No grão de café verde, o conteúdo de OTA ainda não foi regulamentado. A degradação da OTA nem sempre é alcançada durante a torrefação comercial, sendo assim, se a toxina estiver presente no grão verde, ela poderá permanecer no grão torrado em níveis superiores aos permitidos pela legislação (OLIVEIRA et al., 2019; CASTELLANOS-ONORIO et al., 2011). O conhecimento e comportamento da segurança alimentar são cruciais para a cadeia produtiva do café (MARKLINDER et al., 2020).

Diante do exposto, objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade de fungos filamentosos em grãos de café provenientes de cinco fazendas pertencentes ao estado de Minas Gerais, das mesorregiões Sul/ Sudoeste e Vale do Mucuri, e realizar a quantificação da produção de ocratoxina A por estes.

Esse trabalho é subdividido em dois capítulos. No primeiro, encontra-se o referencial teórico. No segundo capítulo intitulado: Distribuição de fungos filamentosos e produção de ocratoxina A em grãos de café (*Coffea arabica* L.) processados pelo método via-seca das mesorregiões Sul/Sudeste de Minas Gerais e Vale do Mucuri, avalia-se a diversidade de fungos filamentosos presentes nas amostras de grãos de café provenientes das áreas de estudo, assim como a produção de OTA por *Aspergillus* spp. pertencentes às Seções *Nigri* e *Circumdati*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aspectos gerais da cafeicultura

O café foi introduzido no Brasil em 1727, onde o português Francisco de Melo Palheta, vindo da Guiana Francesa, trouxe as primeiras mudas para o país, que foram plantadas no Pará. Pouco tempo depois, o café expandiu-se para o Rio de Janeiro, onde começou a ser plantado em 1781, iniciando um novo ciclo econômico na história do Brasil (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ, 2020).

Durante o período monárquico (1822-1889), caracterizado como início da expansão cafeeira, as áreas vizinhas dos estados do Rio de Janeiro e São Paulo tornaram-se as principais produtoras de café, adentrando-se pelo vale do Rio Paraíba. Com o passar dos anos, o estado de São Paulo foi se tornando cada vez mais dominante na produção dessa *commodity*, devido ao advento das ferrovias, expandindo a produção para o Oeste. Por volta de 1850, o cultivo espalhou rapidamente em direção à Serra da Mantiqueira e Santos, e posteriormente, no século XX, continuou se expandindo nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Espírito Santo, Paraná e Rondônia. O cultivo do café evoluiu de maneira significativa ao longo do desenvolvimento histórico e econômico do Brasil, especialmente em termos de localização da produção (VOLSI et al., 2019; NARITOMI et al., 2012).

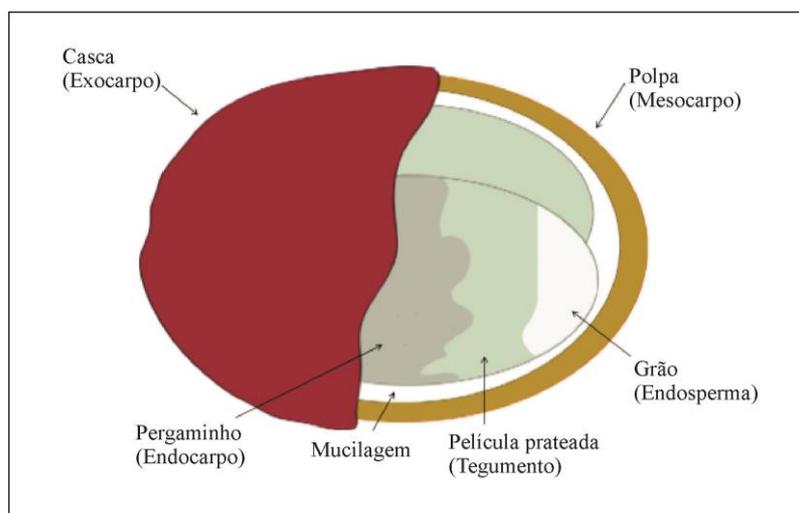
Os cafeeiros são plantas perenes amplamente distribuídas em regiões tropicais. Possuem um caule vertical proeminente com sistema radicular raso. Recebem a seguinte classificação taxonômica: Reino *Plantae*; Sub-reino *Tracheobionta*, divisão *Magnoliophyta*, Classe *Magnoliopsida*, Subclasse *Asteridae*, Ordem *Rubiales*, Família *Rubiaceae*, Gênero *Coffea*. Os frutos de café são produzidos por *Coffea*, que compreende mais de 70 espécies, no entanto, apenas duas são exploradas comercialmente: *Coffea arabica* (Arábica) e *Coffea canephora* (Robusta). Café Arábica e Robusta contribuem com 76,4% e 23,6% da produção mundial, respectivamente. A maioria dos plantis comerciais é de cafés tipo arábica, devido principalmente à qualidade superior de sua bebida (MURTHY; MADHAVA NAIDU, 2012; MUSSATTO et al., 2011; CARVALHO et al., 2008; COLTRO et al., 2006).

O fruto, também chamado de cereja, é composto por uma pele exterior lisa e resistente denominada pericarpo, usualmente verde em frutos imaturos, mas que tornam-se vermelho violeta ou vermelho escuro à medida que vão amadurecendo. A depender do genótipo da espécie, pode apresentar coloração amarela ou laranja. O pericarpo é a camada mais externa

que envolve todo o mesocarpo ou polpa, que é facilmente removível, composta principalmente por carboidratos como glicose, frutose e pectina. A camada de pectina conhecida como mucilagem contém proteínas, gordura, lipídios, minerais, polifenóis e cafeína. O endocarpo ou pergaminho possui coloração amarelada, constituído principalmente por polissacarídeos. Por fim, a película prateada também chamada de tegumento cobre cada hemisfério interno, composto por dois grãos como ilustrado na figura 1. (PEREIRA et al., 2019; JANISSEN; HUYNH, 2018; ESQUIVEL; JIMÉNEZ, 2012; MUSSATTO et al., 2011).

Com o passar do tempo, novas variedades foram surgindo, devido principalmente à necessidade de produzir plantas com maior produtividade, maior vigor vegetativo, maior resistência a pragas e doenças e ao estresse hídrico (BATISTA et al., 2016; CARVALHO et al., 2008).

Figura 1 - Representação esquemática do fruto de café no estágio maduro e suas partes.



Fonte: Esquivel e Jimenez (2012).

2.2 Economia e produção de café

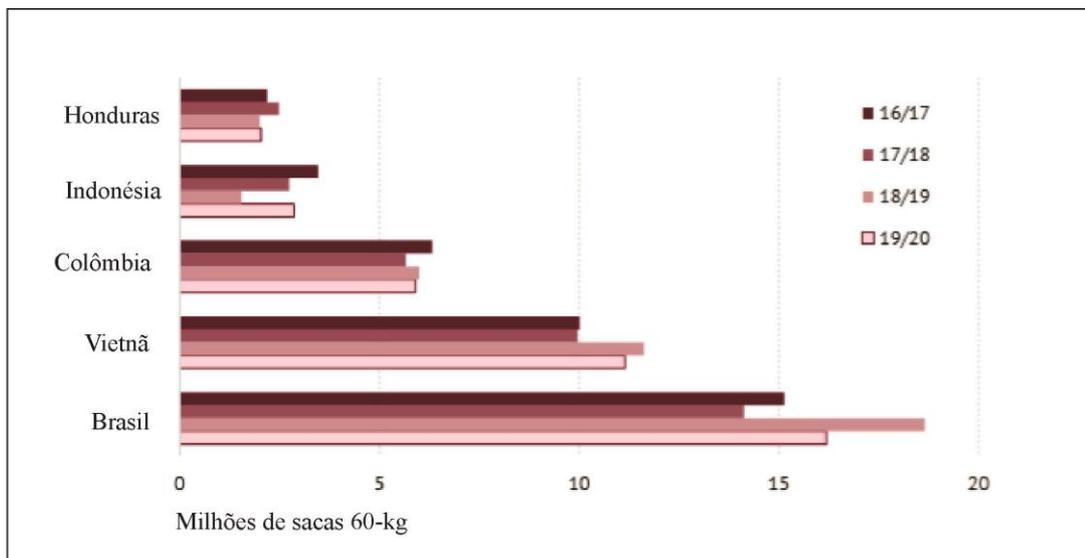
É inegável a tamanha importância econômica exercida pelo café, sendo assim, em 1963, criou-se a Organização Internacional do Café (ICO), sendo a principal organização intergovernamental. A mesma atua reunindo agentes exportadores e importadores para enfrentar os desafios do setor cafeeiro por meio de cooperação internacional, onde seus membros representam 98% da produção mundial e 67% do consumo do café (ICO, 2020).

Depois do petróleo, o café é a mercadoria comercializada mais valiosa do mundo, com vendas globais estimadas em 90 US \$ bilhões. O café é o principal produto de exportação de

alguns países como Uganda, Burundi, Ruanda e Etiópia. Cerca de 70% da safra mundial é cultivada em pequenas propriedades menores que 10 ha, e, portanto, muitas vezes é uma empresa familiar que fornece manutenção para mais de 25 milhões de pessoas no mundo (BATISTA et al., 2016).

De acordo com dados da ICO, (2020), as exportações globais em fevereiro de 2020 totalizaram 11.11 milhões de sacas, um aumento em comparação à safra anterior de fevereiro de 2019 que registrou 10.83 milhões. Em 2019/20 o consumo mundial de café é estimado em 169,34 milhões de sacas, 0.7% maior que em 2018/19. Embora tenha ocorrido um decréscimo de exportações de 3.4% nos cinco primeiros meses da safra 2019/20, que registrou 50,97 milhões de sacas contra 52,78 no mesmo período de 2018/19, devido a pandemia causada pela covid-19. O Brasil segue liderando as exportações das últimas três safras, como mostra a figura 2 e estima-se que na safra 2019/20 exportará 16 milhões de sacas de 60 kg, seguido por Vietnã, Colômbia, Indonésia e Honduras.

Figura 2 - Principais países exportadores de café nos últimos quatro anos.



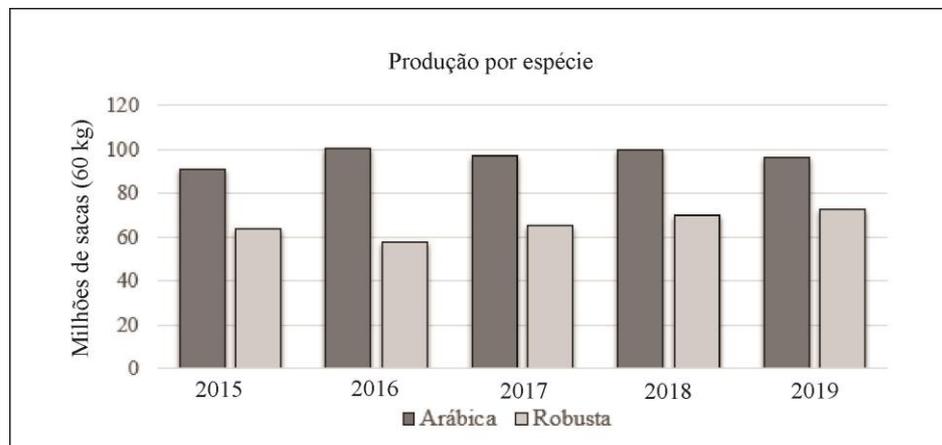
Fonte: International Coffee Organization (2020).

Estudos realizados pela ICO mostram que a produção total de café arábica tem sido relativamente maior que robusta, como pode ser observado na figura 3, em que nos últimos cinco anos ocorreram poucas oscilações, no entanto, a produção de café arábica sempre se mostrou superior, chegando a atingir 100 milhões de sacas nos anos 2016 e 2018. Com relação a exportações por espécie, as de arábica diminuíram 7,8%, 31,86 milhões de sacas,

enquanto o robusta aumentou 4,8 %, equivalente a um valor de 19,1 milhões de sacas.

A maior parte da bebida de café preparada no mundo é produzida a partir da espécie *Coffea arabica*, pois é considerada superior devido às apreciadas propriedades sensoriais e organolépticas que apresentam (SAW et al., 2015; BERTRAND et al., 2003). A produção total de café arábica na safra 2018/2019 foi de 96 milhões de sacas, enquanto robusta produziu 72 milhões de sacas de 60 kg. Para a safra 2019/20 estima-se que a demanda exceda a produção, projetada em 168,86 milhões de sacas, com uma produção final de café arábica de 96 milhões de sacas (ICO, 2020).

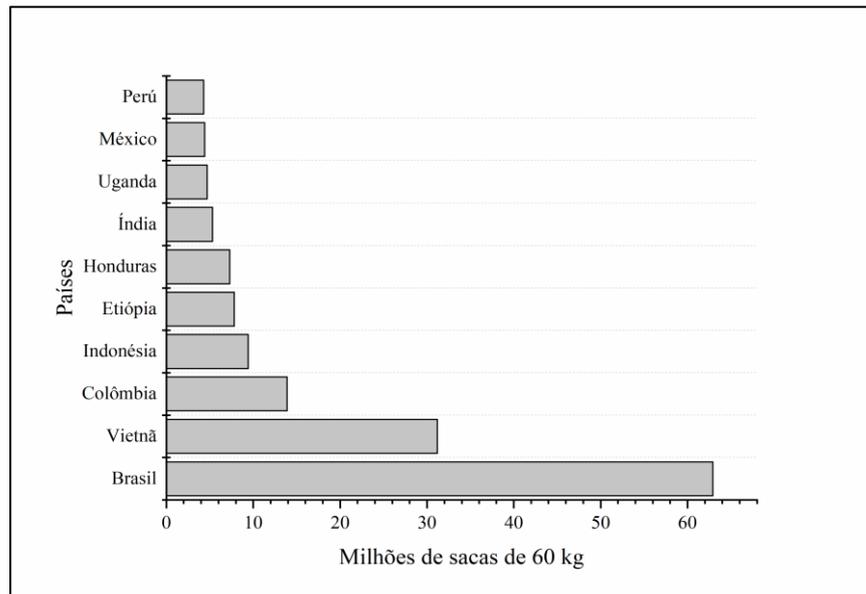
Figura 3 - Produção mundial de café arábica e robusta.



Fonte: Internacional Coffee Organization (2020).

A produção mundial de café na safra 2018/2019 foi de 170,97 milhões de sacas de 60 kg, desse total, o Brasil, classificado como o maior produtor, contribuiu com 62,95 milhões de sacas, 36,47% da produção mundial (ICO, 2020). Na figura 4 são mostrados os dez maiores produtores da safra 2018/19, assim como os valores de produção por milhões de sacas de 60 kg alcançados por estes.

Figura 4 - Produção total de café pelos principais países exportadores.

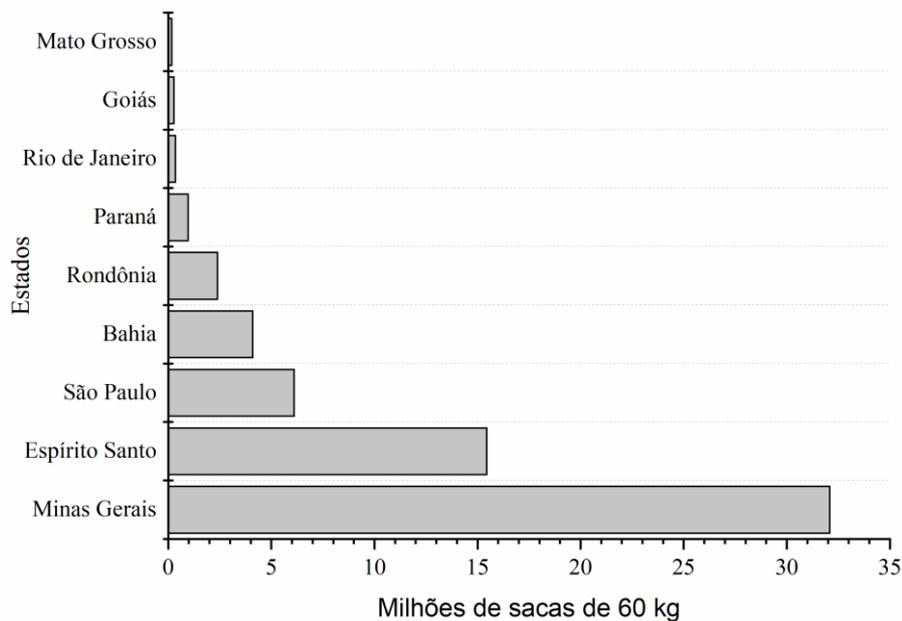


Fonte: International Coffee Organization (2020).

De acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), a área total de café cultivada no Brasil em 2020 é 2,16 milhões de hectares, um acréscimo de 1,4% em relação a 2019. A área total de café arábica no Brasil totaliza 1,75 milhões de ha, correspondendo a 81,3% da área existente com lavouras de café. Minas Gerais concentra a maior área com essa espécie, contribuindo com 1,22 milhões de ha. (CONAB, 2020).

Em Minas Gerais, estima-se que a safra 2019/20 seja de 32,08 milhões de sacas, 52,60% do valor estimado para a produção total brasileira. Para o sul de Minas Gerais, a perspectiva de produção é de 17,79 milhões de sacas, 28,18% da produção total do estado, seguido pela Zona da Mata Mineira, com um volume final estimado de 7,53 milhões, equivalente a 12,34% da produção total. O cerrado mineiro, com uma estimativa de produção de 6,07 milhões de sacas, é responsável por 9,95% do total de produção nacional. Os estados do Espírito Santo e de São Paulo, com estimativas de produção 15,44 e 6,1 milhões de sacas, respectivamente, assumem os segundo e terceiro lugar no ranking da produção total nacional, com 25,31% e 10% (CONAB, 2020). Os principais estados produtores, bem como suas estimativas de produção em sacas de 60 kg para a safra 2019/20 são demonstrados na Figura 5.

Figura 5 - Produção total de café pelos principais estados brasileiros.



Fonte: CONAB (2020).

2.3 Método de processamento via-seca

Após a colheita, os frutos maduros de café podem ser processados por três métodos distintos: via seca, via semi-seca e via-úmida. O processo mais simples e rústico é o via-seca, onde o café é utilizado para fermentar secando sob o sol em plataformas e/ou cimento. Quando o processo é concluído, os grãos de café não torrados são conhecidos como café verde. Estes, são constituídos por compostos voláteis e não voláteis, sendo os principais componentes: carboidratos, proteínas, lipídios, minerais, cafeína, ácido clorogênico, trigonelina, água e outros (BATISTA et al., 2016; MURTHY; MADHAVA NAIDU, 2012; VILELA et al., 2010).

O processamento via-seca que resulta no chamado café natural ou não lavado é o mais antigo e mais simples método de processamento de café (figura 6). Esse método tem sido frequentemente utilizado em países onde as chuvas são escassas e há longos períodos de sol para a secagem apropriada do café. No Brasil, cerca de 95% do café arábica é produzido por este método (BATISTA et al., 2009).

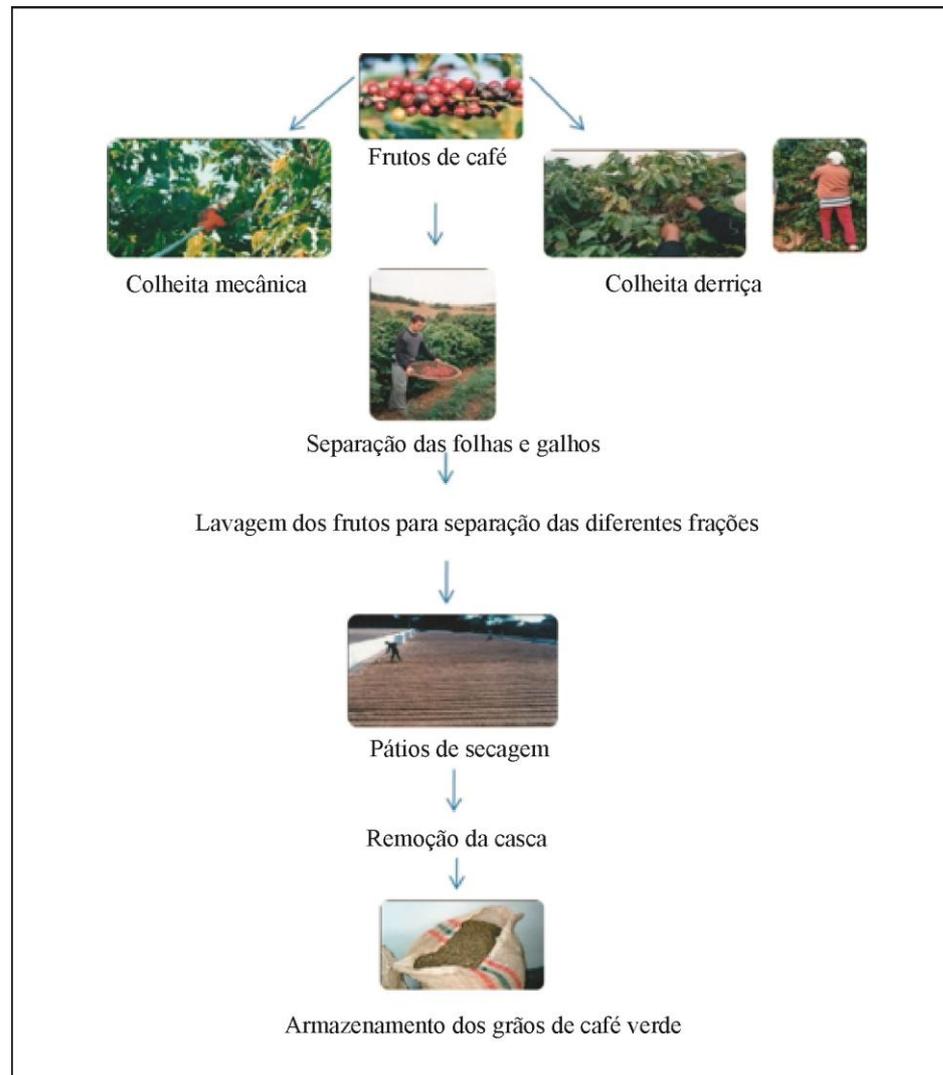
O processo via-seca envolve a fermentação do fruto inteiro, e geralmente, produz um café de corpo acentuado, doce, suave e complexo. Os frutos de café (verde, cereja e seco) são

espalhados em plataformas de concreto ou asfalto em camadas de aproximadamente 5-10 centímetros de espessura, amontoados a noite e espalhados durante o dia. Os frutos permanecem expostos ao sol até que o teor de umidade seja de aproximadamente 10 a 12%. Ao longo de 10-15 dias de secagem ao sol, ocorre a fermentação microbiana de forma natural. Após a secagem, os frutos são limpos e descascados, em seguida, a casca e a polpa secas são removidas (PEREIRA et al., 2019; BATISTA et al., 2009; SCHWAN; WHEALS, 2003; SILVA et al., 2000).

Os frutos secos não são expostos a condições úmidas para evitar a formação de bolores, que podem afetar adversamente a qualidade do café. Cada lote de cereja é ensacado separadamente em um saco seco limpo. A secagem adequada contribui para a qualidade do café em relação à cor, forma e constituintes aromáticos. O processo de secagem torna-se crucial, uma vez que o café que exceder o tempo de secagem ficará quebradiço e produzirá muitos grãos quebrados, considerados defeituosos. O café que não tenha sido suficientemente seco será muito úmido e propenso a rápida deterioração causada pelo ataque de fungos e bactérias durante o tempo de armazenamento (BATISTA et al., 2016; MURTHY; MADHAVA NAIDU, 2012).

O processamento do café requer um elevado grau de conhecimento, uma vez que é onde a maior parte dos subprodutos é formada, tais como polpa, casca, pergaminho, película prateada e águas residuárias, que devem ser dispostas no meio ambiente corretamente e utilizadas como matérias primas para outros produtos como fertilizantes, compostagem e outros (MURTHY; MADHAVA NAIDU, 2012).

Figura 6 - Principais etapas envolvidas na fermentação seca ou natural do café.



Fonte: Adaptado de Schwan et al.(2012).

2.4 Ocorrência de fungos filamentosos em café

A presença de fungos filamentosos em café em diferentes estádios de maturação, processamento e beneficiamento tem sido relatada por diversos autores ao longo do tempo e apontam os gêneros: *Alternaria* (MISLIVEC; BRUCE; GIBSON, 1983); *Aspergillus* (BATISTA et al., 2009; SILVA; BATISTA; SCHWAN, 2008; BATISTA et al., 2003; SILVA et al., 2000; AMORIM; MELLO, 1989), *Cladosporium* (SILVA; BATISTA; SCHWAN, 2008; BATISTA et al., 2003; SILVA et al., 2000; *Fusarium* (SILVA; BATISTA; SCHWAN, 2008; BATISTA et al., 2003; SILVA et al., 2000; AMORIM; MELLO, 1989) e *Penicillium* (SILVA; BATISTA; SCHWAN, 2008; BATISTA et al., 2003; SILVA et al., 2000).

Aspergillus tubingensis, *Aspergillus versicolor*, *Cladosporium cladosporioides*, *Aspergillus* sp. e *Penicillium decumbens* foram as espécies de fungos filamentosos de maior ocorrência durante o processamento de café despulpado (VILELA et al., 2010). No mesmo estudo somente a espécie ocratoxigênica *Aspergillus ochraceus* foi detectada, indicando que o processamento semi-seco minimiza a colonização de fungos toxigênicos.

Silva et al. (2008) isolaram 363 fungos filamentosos provenientes do processo de fermentação do café natural, e observaram que 132 eram pertencentes ao gênero *Aspergillus*, 101 *Penicillium*, 58 *Cladosporium*, 44 *Fusarium*, 15 *Pestalotia* e 13 *Paecilomyces*. Ainda, no presente estudo, os isolados de *Aspergillus* identificados eram pertencentes às seguintes espécies: *A. flavus*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *A. tamarii*, *A. sydowii*, *A. foetidus* e *A. dimorphicus*.

Iamanaka et al. (2014) avaliando a microbiota do café em diferentes estágios da cadeia produtiva e seu impacto na qualidade da bebida em amostras provenientes de duas fazendas localizadas no Sudoeste do estado de São Paulo, encontraram uma alta incidência e diversidade de fungos, em que 45% das amostras apresentaram contaminação por fungos maiores que 70%. As principais espécies isoladas foram: *Penicillium brevicompactum*, *Penicillium crustosum*, *Aspergillus* pertencentes à Seção *Nigri*, *Aspergillus westerdijkiae* e *Fusarium lateritium*.

Para a taxonomia desses fungos, as técnicas de biologia molecular tem sido amplamente utilizadas, pois permitem a identificação das espécies em alguns dias ou apenas algumas horas (FERK, 2015). É recomendada para a identificação das espécies de fungos filamentosos uma abordagem polifásica, em que vários caracteres tais como: microscopia, perfil metabólico e métodos moleculares são utilizados (SCHMIDT, 2018). O perfil genético vem sendo estudado intensivamente e pelo fato haver uma alta diversidade de espécies, a taxonomia destas torna-se ainda mais complexa (FERK, 2015).

A disponibilidade da tecnologia de sequenciamento de DNA nas últimas duas a três décadas contribuiu com uma enorme quantidade de dados de sequências de DNA, permitindo a taxonomia fúngica através da filogenética, como uma ferramenta segura e rápida de taxonomia (FERK, 2015; DOLCI et al., 2013).

2.5 Ocratoxina A

Ocratoxina A (OTA) é uma das micotoxinas mais importantes e deletérias

(JØRGENSEN, 1998). Caracteriza-se por ser um metabólito produzido por fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* (MALIR et al., 2013; OSTRY; MALIR; RUPRICH, 2013). Essa micotoxina foi descoberta em 1965 no Sul da África como um metabólito tóxico de *Aspergillus ochraceus* em uma farinha de milho que foi intencionalmente inoculada com esse fungo (DATTA; KONTOMICHALOU, 1965).

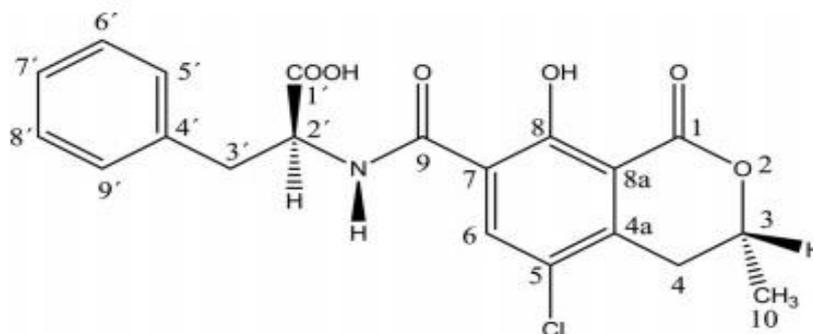
Uma grande variedade de produtos processados ou não processados na agricultura pode estar contaminada por OTA, principalmente cereais e seus derivados. Dentre a variedade desses produtos contaminados, o café merece destaque, podendo ocorrer contaminações em grãos de café verde, café torrado e instantâneo. A micotoxina que tem sido mais estudada em café é a OTA (KLINGELHÖFER et al., 2020; TANIWAKI et al., 2014; NOONIM et al., 2008).

Os efeitos tóxicos da OTA parecem estar relacionados à sua capacidade de inibir a síntese proteica, competindo com a fenilalanina na reação catalisada pela fenilalanil-tRNA sintetase e outros sistemas que exigem esse aminoácido. Além disso, tal micotoxina aumenta a peroxidação lipídica, levando a um maior dano celular e mitocondrial (TURNER; SUBRAHMANYAM, 2009; DIRHEIMER, 1996).

A OTA tem demonstrado ter muitos efeitos tóxicos em animais e humanos. Caracteriza-se por ser nefrotóxica, hepatotóxica, embriotóxica, teratogênica, neurotóxica, imunotóxica, genotóxica e potencialmente carcinogênica (MALIR et al., 2013; PFOHLESZKOWICZ; MANDERVILLE, 2007). Os efeitos nefrotóxicos da OTA estão relacionados ao fato dessa micotoxina interagir com o ferro, formando um complexo e produzindo radicais hidroxila que promovem a lipoperoxidação (PITT et al., 2000).

A Agência Internacional de Pesquisa do Câncer classificou a OTA como um possível carcinógeno humano (grupo 2B) (IARC, 1993). A OTA possui a fórmula estrutural $C_{20}H_{18}O_6C_1N$ e caracteriza-se por apresentar um baixo peso molar de 403,8 g/mol (BENITES et al., 2017). Quimicamente, como pode ser observado na figura 7, sua estrutura consiste de um pentacetídeo derivado da família das dihidrocoumarina e acoplado à β -fenilalanina, através do seu grupo carboxila na posição 7 (POHLAND; NESHEIM; FRIEDMAN, 1992).

Figura 7 - Estrutura química da OTA.



Fonte: Malir et al. (2013).

2.6 Fungos ocratoxigênicos em café

Os frutos e grãos de café quando colonizados por fungos ocratoxigênicos apresentam riscos de contaminação por OTA, comprometendo a segurança e a qualidade. (BATISTA et al., 2009). A ação microbiana prejudicial à qualidade e segurança do produto final dependerá das condições ambientais, bem como do gerenciamento das culturas e produtos (BATISTA et al., 2003).

A presença de OTA em café tem sido encontrada em grãos de café (ALVES DA SILVA et al., 2020; TANIWAKI et al., 2014; TANIWAKI et al., 2003), café torrado (BENITES et al., 2017) café instantâneo e produtos derivados (KHANEGHAH *et al.*, 2019). Muitas espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* podem produzir OTA em café, mas as fontes mais importantes dessa micotoxina no café tem sido atribuída à três espécies: *A. niger*, *A. carbonarius* e *A. ochraceus* (NOONIM et al., 2008; TANIWAKI et al., 2003).

Diversos outros estudos têm sido realizados para analisar a presença de fungos ocratoxigênicos em café (CASAS-JUNCO et al., 2017; KONG et al., 2014; TANIWAKI et al., 2014; VILELA et al., 2010; BATISTA et al., 2009; NOONIM et al., 2008; BATISTA et al., 2003). As principais espécies produtoras de OTA em grãos de café são pertencentes ao gênero *Aspergillus* Seção *Circumdati* e seção *Nigri* (GIL-SERNA et al., 2010; BATISTA et al., 2009, 2003). As espécies produtoras do gênero *Aspergillus* são *A. ochraceus* (GIL-SERNA et al., 2010; BATISTA et al., 2009; PERRONE et al., 2007; SAMSON et al., 2004; SUÁREZ-QUIROZ et al., 2004; TANIWAKI et al., 2003; URBANO et al., 2001), *A. niger* (PERRONE et al., 2007; SAMSON et al., 2004; TANIWAKI et al., 2003; URBANO et al., 2001), *A. carbonarius* (PERRONE et al., 2007; SAMSON et al., 2004; TANIWAKI et al.,

2003; JOOSTEN et al., 2001) *A. sulphureus* (BATISTA et al., 2009), *A. sclerotiorum* (BATISTA et al., 2009) *A. westerdijkiae* (GIL-SERNA et al., 2010; SAMSON et al., 2004) *A. steynii* (LEONG et al., 2007; SAMSON et al., 2004).

Em um estudo realizado por Taniwaki et al. (2003), onde foram analisadas 408 amostras de grãos de café (*Coffea arábica* L.) obtidos em fazendas selecionadas em dois diferentes anos de colheita e diferentes estágios de maturação e processamento. Tal análise incluiu: cerejas coletadas das árvores, cerejas coletadas do solo de plantio, cerejas do pátio de secagem e armazenamento, constatou-se maior ocorrência de espécies toxigênicas em amostras de cerejas coletadas do solo e do pátio de secagem, e uma menor ocorrência nas amostras de cerejas coletadas das árvores. Foram isolados 872 fungos filamentosos, 549 isolados pertencentes à espécie *A. niger*, 269 *A. ochraceus* e 54 *A. carbonarius*. Embora a ocorrência de *A. niger* tenha sido a mais elevada, apenas 3% dos isolados foram capazes de produzir OTA. *A. carbonarius* contribuiu com o maior percentual de produção de OTA (77%), seguido de *A. ochraceus* (75%). *A. carbonarius* foi encontrada na região mais quente estudada e somente a partir de grãos obtidos no pátio de secagem ou armazenamento.

A. ochraceus é a espécie mais comumente encontrada em cafés do Brasil e caracteriza-se por ser um importante produtor de OTA (VILELA et al., 2010; BATISTA et al., 2009; SUÁREZ-QUIROZ et al., 2004). No estudo realizado por Gil Serna et al. (2011), cujo objetivo foi estudar a capacidade de produção de OTA das principais espécies de *Aspergillus* Seção *circumdati*, mostrou que a espécie *A. steynii*, isolada de grãos de café, apresentou a maior produção de OTA (44,317.35 µg /L) entre as cepas analisadas.

Taniwaki et al. (2014), demonstraram que os grãos defeituosos "azedos" e "pretos" tiveram uma maior contaminação por fungos ocratoxigênicos e conseqüentemente grandes concentrações de OTA em comparação com outros grãos defeituosos (TANIWAKI et al., 2014). Neste estudo, os autores encontraram níveis de OTA de 11,3 µg / kg e 25,7 µg / kg para ácidos e grãos pretos, respectivamente e as espécies ocratoxigênicas encontradas foram *A. carbonarius*, *Aspergillus* Seção *Nigri*, *A. westerdijkiae* e outras espécies de *Aspergillus* Seção *Circumdati*.

2.7 Fatores que influenciam o crescimento fúngico e produção de OTA

Segundo Nogueira e Oliveira (2006), a colonização fúngica e a produção de toxina são favorecidas pelo contato prolongado com o solo durante as fases de colheita e secagem dos

grãos. Os fungos produtores de OTA requerem condições favoráveis por um período de tempo para crescer e produzir a toxina. O nível de água disponível e temperatura são os fatores mais importantes e alguns dados relevantes são importantes para entender e controlar a contaminação. *A. ochraceus* cresce a 30 ° C e produz OTA a 25–30 ° C. *A. carbonarius* produz OTA a uma taxa mais alta a 30 ° C e cresce entre 25 e 30 ° C (PATERSON; LIMA, 2011).

É improvável que os fungos produtores de OTA cresçam com alta atividade de água (aw) de 0,95, já que outros fungos e leveduras hidrofílicas de crescimento rápido sobrepõem o seu crescimento. Os fungos produtores de OTA podem crescer em aW 0,80. A aW limitante para o crescimento de *A. ochraceus* e *A. westerdijkiae* é de 0,79 e para *A. niger* de 0,77 (PALACIOS-CABRERA et al., 2004). Silva, Batista e Schwan (2008), afirmam que a aW mínima para produzir OTA é 0,85 e 20% de umidade nos grãos de café. Para a espécie *A. ochraceus* e as temperaturas mínima e máxima de crescimento estão entre 8 e 12 ° C e 24 e 31 ° C, respectivamente, enquanto para a produção de OTA, a temperatura está entre 25 e 31 ° C (SILVA; BATISTA; SCHWAN, 2008).

É necessário muito cuidado com o teor de umidade para o café (PATERSON; LIMA; TANIWAKI, 2014). No final do processo de secagem, o teor de umidade deve ser igual ou inferior a 12% para evitar fermentação e crescimento de fungos (PALACIOS-CABRERA et al., 2004). Os grãos de café têm uma polpa espessa e, se o processo de secagem for mais rápido e eficaz, a invasão de fungos será evitada, resultando em menos contaminação por OTA (NOONIM et al., 2008).

2.8 Legislações inerentes à OTA em café

Rastreabilidade é a informação que permite o monitoramento de um material ou produto durante toda a sua produção e distribuição até o final da vida útil, isto é, "da fazenda ao garfo" de um produto alimentício (EL SHEIKHA; NGANOU, 2018). A rastreabilidade do café tornou-se muito importante com a aplicação do Regulamento da CE 1881/2006 (COMISSÃO EUROPEIA, 2006), que estabelece os limites máximos de OTA no café, que são: 5 µg OTA/kg para grãos de café torrado e café moído e 10 µg/kg para café solúvel.

Os regulamentos da UE exigem o fornecimento de certificados sanitários que devem acompanhar todos os produtos alimentícios importados para a UE através do Regulamento 1664/2006 (COMISSÃO EUROPEIA, 2006). Este documento, que é verificado pela alfândega para cada remessa e inclui quatro seções principais: identificação do produto,

origem do produto, destino do produto e atestado de saúde. Dessa forma, os cafés exportados devem estar dentro dos limites impostos pela legislação.

No Brasil, a concentração de OTA em café torrado e solúvel é de 10 µg/kg, estabelecida pela Resolução- RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011 (BRASIL, 2011). É realizada análise bioquímica para determinar se a OTA está presente no café, frequentemente envolvendo cromatografia (PATERSON; LIMA; TANIWAKI, 2014).

REFERÊNCIAS

- AMORIM, H.V.; MELLO, M. Significance of enzymes in non alcoholic coffee beverage. In: FOX, P.F (Ed). **Food Enzymology**. Amsterdam, v.2, n.2, p.189-209, jan.1989.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ. **Estatísticas**: Indicadores da Indústria de café do Brasil. Disponível em: <<http://www.abic.com.br>>: Acesso em: 16 Mar. 2020.
- 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, Sep. 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, Sep. 2009.
- BATISTA, L.R. et al. Coffee: Types and Production. In: Caballero, B.; fínglas, P.; Toldrá, F. (Eds.), **The Encyclopedia of Food and Health**. Oxford: Academic Press, pp. 244. 2016.
- BENITES, A. J. et al. Occurrence of ochratoxin A in roasted coffee samples commercialized in Portugal. **Food Control**, Guildford, v. 73, p. 1223–1228, Oct. 2017.
- BERTRAND, B. et al. Impact of the *Coffea canephora* gene introgression on beverage quality of *C. arabica*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 107, n. 3, p. 387–394, May. 2003.
- BRASIL. 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. Brasília, 2011. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 10 jun. 2020.
- CARVALHO, C. H. S. Cultivares de café: origens, características e recomendações. Brasília-DF: **Emprapa Café**, v.1, p. 157-226, 2008.
- CASAS-JUNCO, P. P. et al. Determination of potentially mycotoxigenic fungi in coffee (*Coffea arabica* L.) from Nayarit. **Food Science and Biotechnology**, v. 27, n. 3, p. 891–898, Dec. 2017.
- CASTELLANOS-ONORIO, O. et al. Effect of two different roasting techniques on the Ochratoxin A (OTA) reduction in coffee beans (*Coffea arabica*). **Food Control**, Guildford, v. 22, n. 8, p. 1184–1188, Jan. 2011.
- COLTRO, L. et al. Environmental profile of Brazilian green coffee. **International Journal of Life Cycle Assessment**, v.11, n.1, p.16-21, 2006.
- COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. **Commission regulation nº 1881/2006**: setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Brussels, 2006. 364 p.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO-CONAB. **Primeiro levantamento da safra 2019/2020**. Disponível em: : <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 24 ago. 2020.

Da SILVA, A. S. et al. Fungi associated to beans infested with coffee berry borer and the risk of ochratoxin A. **Food Control**, Guildford, v. 113, n.1, p. 107204, Feb.2020.

DATTA, N.; KONTOMICHALOU, P. Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus*. **Nature Publishing Group**, v. 205, n. 5007, p. 239–241, Mar.1965.

DIRHEIMER, G. Mechanistic approaches to ochratoxin toxicity. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 13, n.7, p. 45-48, Aug. 1996.

DOLCI, P. et al. Cheese surface microbiota complexity: RT-PCR-DGGE, a tool for a detailed picture? **International Journal of Food Microbiology**, v. 162, n. 1, p. 8–12, Jan. 2013.

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

EL SHEIKHA, A. F.; NGANOU, N. D. Molecular Characterization of Ochratoxigenic Fungal Flora as an Innovative Tool to Certify Coffee Origin. **Molecular Techniques in Food Biology: Safety, Biotechnology, Authenticity and Traceability**, p. 47–69, 2018.

ESQUIVEL, P.; JIMÉNEZ, V. M. Functional properties of coffee and coffee by-products. **Food Research International**, v. 46, n. 2, p. 488–495, May. 2012.

FERK, F. et al. Protective Effects of Coffee Against Induction of DNA Damage and Cancer by Aflatoxin B1. **Coffee in Health and Disease Prevention**. v. 58, n. 2, p. 587-596, 2015.

GEREMEW, T. et al. Occurrence of toxigenic fungi and ochratoxin A in Ethiopian coffee for local consumption. **Food Control**, Guildford, v. 69, p. 65–73, Apr. 2016.

GIL-SERNA, J. et al. Revision of ochratoxin a production capacity by the main species of *Aspergillus* section *Circumdati*. *Aspergillus steynii* revealed as the main risk of OTA contamination. **Food Control**, v. 22, n. 2, p. 343–345, Jun. 2010.

IAMANAKA, B. T. et al. The mycobiota of coffee beans and its influence on the coffee beverage. **Food Research International**, v. 62, p. 353-358, Aug. 2014.

IARC WORKING GROUP ON THE EVALUATION OF CARCINOGENIC RISKS TO HUMANS; INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER; WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins**. World Health Organization, 1993.

ICO – International Coffee Organization (2016). Disponível em: <<http://www.ico.org/>> Acesso: fevereiro 2020.

JANISSEN, B.; HUYNH, T. Chemical composition and value-adding applications of coffee industry by-products: A review. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 128, n.2, p. 110-117, Oct. 2018.

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

JØRGENSEN, K. Survey of pork, poultry, coffee, beer and pulses for ochratoxin A. **Food Additives and Contaminants**, v. 15, n. 5, p. 550–554, 1998.

KHANEGHAH, A. M. et al. The concentration and prevalence of ochratoxin A in coffee and coffee-based products: A global systematic review, meta-analysis and meta-regression. **Fungal Biology**, v. 123, n. 8, p. 611–617, 2019.

KLINGELHÖFER, D. et al. Ochratoxin – Characteristics, influences and challenges of global research. **Food Control**, v. 114, n. March, p. 107230, 2020.

KONG, W. et al. Occurrence of toxigenic fungi and determination of mycotoxins by HPLC-FLD in functional foods and spices in China markets. **Food Chemistry**, v. 146, p. 320–326, 2014.

LEONG, K. et al. Diversity of lactic acid bacteria associated with fresh coffee cherries in Taiwan. **Current Microbiology**, v. 68, p. 440-447, 2014.

MALIR, F. et al. Ochratoxin A: Developmental and reproductive toxicity-an overview. **Birth Defects Research Part B - Developmental and Reproductive Toxicology**, v. 98, n. 6, p. 493–502, 2013.

MARKLINDER, I. et al. Food safety knowledge, sources thereof and self-reported behaviour among university students in Sweden. **Food Control**, v. 113, p. 107130, Nov. 2020.

MISLIVEC, P. B.; BRUCE, V. R.; GIBSON, R. Incidence of toxigenic and other molds in green coffee beans. **Journal of Food Protection**, v. 46, n. 11, p. 969–973, 1983.

MURTHY, P. S.; NAIDU, M. M. Sustainable management of coffee industry by-products and value addition - A review. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 66, p. 45–58, Sep.2012.

MUSSATTO, S. I; MACHADO, E. M. S.; MARTINS, S.; TEIXEIRA, J.A. Production, Composition, and Application of Coffee and Its Industrial Residues. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, n. 5, p. 661–672, Mar. 2011.

NARITOMI, J. et al. Institutional Development and Colonial Heritage within Brazil
Published by : Cambridge University Press on behalf of the Economic History Association
Institutional Development and Colonial Heritage within Brazil. **Journal of Economic History**, v. 72, n. 2, p. 393–422, 2012.

NOGUEIRA, S.; OLIVEIRA, M. B. P. P. Prevalência de Ocratoxina A em alimentos e consequentes problemas de segurança alimentar. **Alimentação Humana**, Porto, v. 12, n. 2, p. 69-75, 2006.

NOONIM, P. et al. Isolation, identification and toxigenic potential of ochratoxin A-producing *Aspergillus* species from coffee beans grown in two regions of Thailand. **International Journal of Food Microbiology**, v. 128, n. 2, p. 197–202, 2008.

OLIVEIRA, G. Incidência de fungos do gênero *Aspergillus* Seção *Circumdati* e *Nigri* em grãos de café cultivados em Minas Gerais e o efeito in vitro de fatores abióticos no crescimento e na biossíntese de ocratoxina A. p. 98, 2016.

OLIVEIRA, G. et al. Influence of temperature and water activity on Ochratoxin A production by *Aspergillus* strain in coffee south of Minas Gerais/Brazil. **Lwt**, v. 102, n. 2019, p. 1–7, 2019.

OSTRY, V.; MALIR, F.; RUPRICH, J. Producers and important dietary sources of ochratoxin A and citrinin. **Toxins**, v. 5, n. 9, p. 1574–1586, 2013.

PALACIOS-CABRERA, H. et al. The production of ochratoxin A by *Aspergillus ochraceus* in raw coffee at different equilibrium relative humidity and under alternating temperatures. **Food Control**, v. 15, n. 7, p. 531–535, 2004.

PATERSON, R. R. M.; LIMA, N. Further mycotoxin effects from climate change. **Food Research International**, v. 44, n. 9, p. 2555–2566, 2011.

PATERSON, R. R. M.; LIMA, N.; TANIWAKI, M. H. Coffee, mycotoxins and climate change. **Food Research International**, v. 61, p. 1–15, 2014.

PEREIRA, M. G. V.; NETO, C. P. D.; JÚNIOR, M. A.; VASQUEZ, S. Z.; MEDEIROS, P. B. A.; VANDENBERGHE, S. P. L.; SOCCOL, R. C. Exploring the impacts of postharvest processing on the aroma formation of coffee beans – A review. **Food Chemistry**, v. 272, n., p. 441–452, Dec.2019.

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

PFOHL-LESZKOWICZ, A.; MANDERVILLE, R. A. Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 51, n. 1, p. 61–99, 2007.

PITT, J. I. et al. Mycotoxins and toxigenic fungi. **Medical Mycology**, v. 38, p. 41–46, 2000.

POHLAND, A. E.; NESHEIM, S.; FRIEDMAN, L. Ochratoxin A: A review (Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 64, n. 7, p. 1029–1046, 1992.

SAMSON, R. A. et al. New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*. **Studies in Mycology**, v. 50, n. 1, p. 45–61, 2004.

SAW, A. K. C. et al. A Comparative study of the volatile constituents of southeast asian *Coffea arabica*, *Coffea liberica* and *Coffea robusta* green beans and their antioxidant activities. **Journal of Essential Oil-Bearing Plants**, v. 18, n. 1, p. 64-73, 2015.

SCHMIDT, H.; STOLL M. D.; GEISEN, R. Sequencing and Analysis of the Genome of the Filamentous Fungus *Penicillium verrucosum* BFE808, Which Produces the Mycotoxins Citrinin and Ochratoxin. **Microbiol Resour Announc**, v. 7, n. 14, p. 9-18, 2018.

SCHWAN, R. F., WHEALS, A. E., Mixed microbial fermentation of chocolate and coffee. In: BOEKHOUT, T.; ROBERT, V. (Ed). **Yeasts in food: beneficial and detrimental aspect** Hamburg: Behr's Verlag, 2003. p. 426–459.

SILVA, C. F.; SCHWAN, R. F.; DIAS, E. S.; WHEALS, A. E. Microbial diversity during maturation and natural processing of coffee cherries of *Coffea arabica* in Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 60, n. 2-3, p. 251-260, Sep. 2000.

SILVA, C. F.; BATISTA, L. R.; SCHWAN, R. F. Incidence and distribution of filamentous fungi during fermentation, drying and storage of coffee (*Coffea arabica* L.) beans. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 521–526, 2008.

SUÁREZ-QUIROZ, M. L. et al. Study of ochratoxin A producing strains in coffee processing. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 39, n. 5, p. 501-507, May 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**, v. 82, n. 2, p. 173-179, 2003.

TANIWAKI, M. H. et al. Ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in defective coffee beans. **Food Research International**, v. 61, p. 161–166, 2014.

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

URBANO, G. R. et al. Occurrence of ochratoxin A-producing fungi in raw Brazilian coffee. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 8, p. 1226–1230, 2001.

VILELA, D. M.;. Molecular ecology and polyphasic characterization of the microbiota associated with semi-dry processed coffee (*Coffea arabica* L.). **Food Microbiology**, London, v.27, n. 8, p. 128-135, Dec. 2010.

VOLSI, B.; TELLES, T. S.; CALDARELLI, C. E.; CAMARA, M. R. G.; The dynamics of coffee production in Brazil. **PLoS ONE**, v. 14, n. 7, p. 1–15, Jul. 2019.

CAPÍTULO 2

Distribuição de fungos filamentosos e produção de ocratoxina A em grãos de café (*Coffea arabica* L.) processados pelo método via-seca das mesorregiões Sul de Minas e Vale do Mucuri

RESUMO

A ocratoxina A é a principal micotoxina detectada em grãos de café. Este estudo foi realizado com o objetivo de estudar a diversidade de fungos filamentosos presentes em amostras de café processados pelo método via-seca, provenientes das mesorregiões Sul/Sudeste de Minas Gerais e Vale do Mucuri, e avaliar a produção de OTA por fungos pertencentes ao gênero *Aspergillus*, das Seções *Nigri* e *Circumdati*. O isolamento dos fungos foi realizado por meio da técnica de plaqueamento direto nos meios dicloran rosa de bengala (DRBC) e dicloran glicerol (DG18). A identificação foi realizada de acordo com as características morfológicas e pela técnica MALDI-TOF MS. Selecionou-se isolados representantes de acordo com as identicações morfológicas e estes foram enviados para sequenciamento das regiões ITS1 e ITS2 e B-tubulina. A quantificação de OTA dos isolados foi realizada por CLAE. Foram isolados e identificados 389 fungos filamentosos pertencentes à seis gêneros: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Complexo Cladosporium cladosporioides*, *Alternaria* e *Eurotium*. Os percentuais de contaminação das amostras variaram entre 7 a 100%. Neste estudo, 41,88% dos isolados potencialmente ocratoxigênicos produziram OTA em que 90,58% eram pertencentes a *Aspergillus* Seção *Nigri*, porém, apenas 39,5% produziram OTA, em contrapartida, 10,42% dos isolados ocratoxigênicos eram pertencentes Seção *Circumdati* e 67% produziram OTA. *A. ocharceus* foi a espécie que produziu concentrações mais elevadas de OTA, em média 80 µg/g e *A. niger*, embora tenham apresentando maior incidência, produziram OTA em concentrações menores (0,90 µg/g). a presença de fungos toxigênicos não indica, necessariamente a presença de OTA, mas indica um risco em potencial. O conhecimento das espécies toxigênicas é essencial para a adoção de medidas de controle.

Palavras-chave: Fungos ocratoxigênicos, grãos de café, OTA.

ABSTRACT

Among frequent mycotoxins that can occur in coffee beans, ochratoxin A (OTA) is the most studied and most found. This study was carried out with the objective of studying the diversity of filamentous fungi present in coffee samples processed by the dry method, from the South / Southeast regions of Minas Gerais and Vale do Mucuri, and to evaluate the production of OTA by fungi belonging to the *Aspergillus*, *Nigri* and *Circumdati* Sections. The isolation of fungi was carried out by the plating technique straight amid dichloran rose bengal chloramphenicol (DRBC) and dichloran glycerol (DG18). The identification was carried out according to the morphological characteristics and by the MALDI-TOF MS technique. Isolated representatives were selected according to the morphological identifications and these were sent for sequencing of the ITS1 and ITS2 and B-tubulin regions. The quantification of OTA of the isolates was performed by HPLC. 389 filamentous fungi belonging to six genera were isolated and identified: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Cladosporium cladosporioides* complex, *Alternaria* and *Eurotium*. The contamination percentage of the samples ranged from 7 to 100%. In this study, 41.88% of the potentially ochratoxigenic isolates produced OTA in which 90.58% belonged to *Aspergillus* Section *Nigri*, however, only 39.5% produced OTA, in contrast, 10.42% of the ochratoxigenic isolates belonged to the *Circumdati* Section and 67% produced OTA. *A. ocharceus* was the specie that produced the highest concentrations of OTA, on average 80 µg / g and *A. niger*, although they had the highest incidence, produced OTA in lower concentrations (0.90 µg / g). The presence of toxigenic fungi does not necessarily indicate the presence of OTA, but indicates a potential risk. Knowledge of toxigenic species is essential for the adopting measures to control.

Keywords: Ochratoxigenic fungi, coffee beans, OTA.

1. INTRODUÇÃO

A cafeicultura exerce um importante papel econômico e social, possibilitando a geração de empregos e arrecadação de diversos impostos essenciais para a manutenção da economia, empregando direta ou indiretamente cerca de 125 milhões de pessoas em todo o mundo (TANIWAKI et al., 2014; IAMANAKA et al., 2014). O Brasil lidera o ranking de produtividade dessa *commodity*, com estimativa de produção nacional para a safra 2020 variando entre 57,15 e 62,02 milhões de sacas beneficiadas, tais projeções sinalizam um incremento de até 25,8% em comparação ao volume colhido na safra anterior (CONAB, 2020).

O café é suscetível ao crescimento de fungos micotoxigênicos devido às condições de umidade encontradas, que são ideais para o crescimento desses fungos (PATERSON et al., 2014). Quando associados a frutos e grãos de café, podem, sob determinadas condições, ocasionar danos que refletem na qualidade, produzindo odores e sabores desagradáveis (VILELA et al., 2010).

Diversos fatores tais como a variedade do café, localização geográfica, condições climáticas e o método de processamento empregado influenciam diretamente sobre a diversidade de fungos micotoxigênicos encontrados no café (PATERSON et al., 2014). É fundamental que no sistema de cultivo haja sempre a adoção de boas práticas agrícolas, uma vez que a falta dessas pode provocar aumento nas contaminações e no desenvolvimento de microrganismos indesejáveis como os fungos micotoxigênicos (BATISTA et al., 2009; DUARTE; PENA & LINO, 2010).

Entre micotoxinas frequentes que podem ocorrer nos grãos de café, a ocratoxina A (OTA) é a mais detectada (ALVES DA SILVA et al., 2020). A OTA é um metabólito secundário produzido por várias espécies toxigênicas de *Aspergillus* e *Penicillium* (SUÁREZ-QUIROZ et al., 2004). É produzida principalmente por espécies de *Aspergillus* pertencentes às Seções *Circumdati* e *Nigri* em regiões de climas tropical e subtropical e *Penicillium* tais como: *P. nordicum* e *P. Verrucosum* em regiões temperadas (GIL-SERNA et al., 2010).

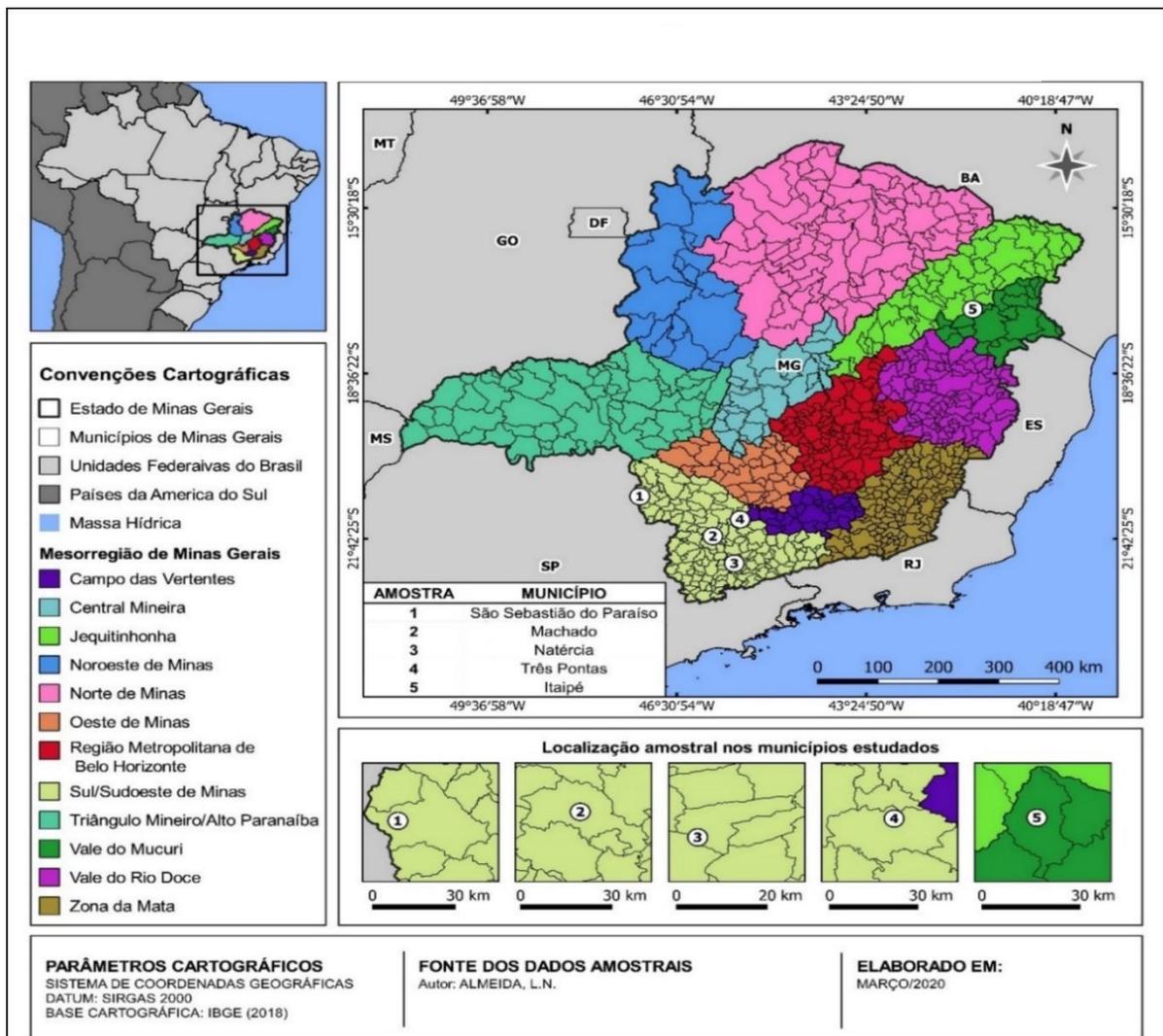
Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi estudar a diversidade de fungos filamentosos presentes em amostras de café processados pelo método via-seca, provenientes de propriedades localizadas nas mesorregiões Sul/Sudeste de Minas Gerais e Vale do Mucuri, por meio de taxonomia polifásica e avaliar a produção de ocratoxina A por fungos pertencentes ao gênero *Aspergillus*, das Seções *Nigri* e *Circumdati*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Áreas de estudo

As amostras foram coletadas em cinco fazendas produtoras de café (*Coffea arabica* L., variedade: Catuaí vermelho IAC 99) da safra 2018/2019. Quatro propriedades encontravam-se localizadas na mesorregião Sul/Sudoeste de Minas Gerais, nos seguintes municípios: Três Pontas, Machado, Sebastião do Paraíso e Natércia, e uma propriedade localizada na mesorregião Vale do Mucuri, no município de Itaipé, como mostra a figura 8.

Figura 8- Localização geográfica dos pontos de amostragem.



Fonte: Do autor (2020).

2.2 Coleta de amostras e condução do experimento

A coleta foi padronizada e constituiu-se de uma amostra composta por fazenda, totalizando cinco pontos de amostragem, nas áreas com as características ilustradas na tabela 1. As amostras foram constituídas de quatro subamostras de 300 g, totalizando 1,2 kg de cerejas de café processadas pelo método natural, coletadas na fase final de processamento (20° dia), diretamente do terreiro de secagem (concreto).

Posteriormente, as amostras foram codificadas, embaladas e encaminhadas à Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais-EPAMIG, localizada na Universidade Federal de Lavras-UFLA, no qual passaram por um processo de beneficiamento. Após o devido preparo, as amostras de grãos de café verde foram embaladas, devidamente codificadas e encaminhadas ao Laboratório de Micotoxinas e Micologia de alimentos do Departamento de Ciência dos Alimentos da UFLA, para posteriores análises microbiológicas. Na tabela 1 encontram-se dispostos os pontos de coleta e algumas características das fazendas onde foram coletadas as amostras.

Tabela 1 - Características climáticas dos locais de amostragem.

Município	Amostra	Lat.	Long.	T min °C	T max °C	T med °C	Pluv. (mm)
Três Pontas	A1	21° 20' 47,09 "S	45° 28' 40,49" W	8,6	28,6	20	1400
Machado	A2	21°39'4 0" S	45° 55' 30" W	9,1	29,1	20,6	1508
Natércia	A3	22° 05'51' S	45° 30'35' W	8	28,3	19,7	1413
Itaipé	A4	17° 24' 07 " S	41° 40' 07" W	12,5	30,4	21,8	1004
São Sebastião do Paraíso	A5	20° 54' 51,2" S	47° 07' 14,6" W	10	26,1	19,4	1519

Fonte: INMET(2020).

2.3 Avaliação e isolamento dos fungos filamentosos presentes nos grãos de café

Para a avaliação dos fungos filamentosos presentes nos grãos de café, foi utilizada a técnica de plaqueamento direto e os grãos foram plaqueados nos meios de cultura: Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol-DRBC e Dicloran Glicerol-DG18, cuja composição é ilustrada na tabela 2.

Tabela 2- Composição dos meios de cultura DRBC e DG18.

DRBC		DG18	
Constituintes	Quantidade (g/L)	Constituintes	Quantidade (g/L)
Glicose	10	Glicose	10
Peptona bacteriológica	5	Fosfato monopotássico	1
Fosfato monopotássico	0,5	Sulfato de magnésio	0,5
Sulfato de magnésio	0,5	Sulfato de zinco	0,001
Solução dicloran	0,1	Sulfato de cobre	0,005
Dicloran	0,001	Dicloran	0,002
Cloranfenicol	0,001	Cloranfenicol	0,001
Ágar	15	Ágar	15

Fonte: Do autor (2020).

Em cada meio de cultura foram plaqueados 100 grãos sem desinfecção superficial e 100 grãos com desinfecção superficial, utilizando hipoclorito de sódio a 1%, visando a identificação dos fungos presentes no interior dos grãos. Durante o processo de desinfecção, inicialmente foi feita uma imersão das amostras em álcool 70% por 1 minuto para diminuir a tensão superficial do grão, permitindo melhor contato entre a solução de hipoclorito de sódio a 1%, onde os grãos permaneceram submersos por 30 segundos. Como última etapa do processo, foram realizadas três lavagens sucessivas com água destilada e esterilizada, com a finalidade de retirar os resíduos de hipoclorito de sódio.

Os grãos foram transferidos para placas de petri de vidro com 13cm de diâmetro contendo os meios de cultura, como descrito por Samson et al. (2000). As placas foram incubadas em BOD a 25°C por 7 dias, e os resultados foram expressos em percentagem de grãos contaminados, de acordo com Pitt e Hocking (1997).

Após o período de incubação, foram observados os percentuais de contaminação dos

grãos em placas de pétri. Visualmente, foram determinadas características que permitiu diferenciar colônias distintas nas placas e após essa caracterização prévia, essas colônias foram repicadas no meio de cultura Extrato de Malte-MA, composto de 20 g de extrato de malte, 15 g de ágar e 1 L de água destilada. O isolamento das colônias foi realizado com o auxílio de palitos de madeira estéreis, onde transferiu-se parte da colônia do fungo para o MA e as placas foram incubadas em BOD a 25°C por 7 dias.

2.4 Identificação fenotípica dos fungos filamentosos

Para a identificação fenotípica, as culturas purificadas pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* foram reativadas nos meios de cultura CYA e MEA cuja composição é mostrada na tabela 3 e incubadas em 25 °C e 37°C, durante sete dias para a observação das características macroscópicas e microscópicas, como descritas por Klich (2002), sendo:

- a) Características macroscópicas: coloração (massa conidial), diâmetro das colônias, micélio, presença ou ausência de escleródios, assim como a produção de exsudatos, pigmentação solúvel e reverso das colônias;
- b) Características microscópicas: O arranjo entre fiálides ligadas à vesícula, comprimento e largura dos conidióforos, forma e tamanho dos conídios, vesículas, métulas e fiálides, textura dos conídios e do conidióforo.

Tabela 3 - Composição dos meios de cultura CYA e MEA.

CYA		MEA	
Constituintes	Quantidade (g/L)	Constituintes	Quantidade (g/L)
Extrato de levedura	5	Extrato de malte	20
Sacarose	30	Peptona bacteriológica	1
Solução metálica Czapek concentrado	1	Glicose	20
Ágar	15	Ágar	15
		Cloranfenicol	1

Fonte: Do autor (2020).

Para a avaliação microscópica, foram preparadas lâminas coradas com azul de metileno e observadas em microscópio óptico. Os isolados de *Aspergillus* foram identificados de acordo com metodologia proposta por Klich (2002) e as espécies de *Penicillium* identificadas de acordo com Pitt (2000). Para os demais gêneros utilizou-se os manuais de Samson, et al., (2004) e Pitt e Hocking (2005), ainda artigos científicos recentes.

2.5 Identificação por Maldi-TOF MS

Os isolados de fungos filamentosos após purificação e avaliação da morfologia foram submetidos a análises do seu perfil de proteínas ribossomais, a fim de realizar um agrupamento e possível identificação das espécies utilizando Matrix-assisted laser desorption ionization time-of flight mass spectrometry-MALDI-TOF MS. As colônias foram crescidas em placas de pétri contendo o meio Ágar Extrato de Malte (MA) e incubadas em BOD a 25°C por cinco dias. Após o período de incubação, uma pequena amostra de cada colônia, aproximadamente 1 µg, foi transferida diretamente para a placa MALDI flex target e adicionou-se duas soluções matrizes, a fim de obter melhores espectros.

Foi adicionado 1 µL de solução matriz (Solução saturada de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA) em acetonitrila a 50%; ácido trifluoroacético a 2,5%) (OLIVEIRA et al. 2015), e em seguida adicionando 1 µL de solução matriz 2 (solução saturada de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA) em acetonitrila a 50%; ácido trifluoroacético a 1,5%) (LIMA, 2017). Posteriormente, o mix da amostra com a matriz foi seco à temperatura ambiente e a análise realizada em um sistema MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha), em triplicata para avaliar a qualidade e reprodutibilidade dos espectros.

Para calibração do equipamento foi empregada a cepa *Escherichia coli* K12, cultivada em meio Ágar Luria-Bertani (LB) (bactotripton, 1,0 g; extrato de bactoheyeast, 0,5 g; NaCl, 1,0 g; ágar, 15,0 g; água destilada, 1 L) incubada em BOD à 37 °C por 18 horas. Após incubação, aproximadamente 1 µg de material celular de uma única colônia de *E. coli* K12 foi transferido, em triplicata, diretamente para a placa MALDI flex target e adicionou-se a solução matriz para a análise (LIMA, 2017). Por fim, os espectros de massa foram processados com o pacote de software 3.0 do MALDI Biotyper (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) para identificação dos isolados fúngicos.

2.6 Identificação dos isolados através do sequenciamento

Os isolados de fungos filamentosos identificados através da análise morfológica e Maldi TOF MS pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, foram agrupados e selecionados para identificação genotípica. As cepas selecionadas foram reativadas em meio MA e incubadas em BOD a 25°C por 5 dias, após as colônias crescidas, as mesmas foram devidamente identificadas e enviadas ao Laboratório Gogenetics, onde foram realizadas as etapas posteriores, tais como extração e purificação de DNA, amplificação por PCR e sequenciamento.

2.6.1 Extração e Purificação de DNA

Aproximadamente 150 mg de micélio foi utilizado para extração de DNA com o kit Wizard DNA Extraction kit (Promega), conforme recomendações do fabricante. O DNA foi quantificado e avaliado quanto à pureza em Nanodrop 2000 (Thermo).

2.6.2 Amplificação por PCR

A amplificação foi realizada em termociclador Veriti (Thermo), em reação contendo 20 ng de DNA genômico purificado. Para a região ITS, foram utilizados 32 ciclos de desnaturação (96°C por 30 seg), anelamento dos primers (58°C por 45 seg) e extensão do produto (72°C por 45 seg). Para a região b-tub, foram utilizados 35 ciclos de desnaturação (96°C por 30 seg), anelamento dos primers (56°C por 1 min) e extensão do produto (72°C por 1 min). Os produtos foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% (tampão TAE). As reações foram purificadas enzimaticamente com ExoI/SAP (Thermo), conforme recomendação do fabricante.

2.6.3 Sequenciamento Sanger

Os produtos de PCR foram marcados com BigDye v3.1 (Thermo) conforme orientações do fabricante, em reação contendo 50 ng de DNA. Foram utilizados 35 ciclos de desnaturação (96°C por 15 seg), anelamento do respectivo primer (15 seg, ITS e EF à 58°C e b-tub à 56°C) e extensão do produto (60°C por 4 min) para marcação com terminadores fluorescentes. Os produtos marcados foram precipitados com 20% de acetato de amônio 7,5M

e três volumes de etanol absoluto, e ressuspensos em 10 µL de HiDi-formamida. Essas amostras foram sequenciadas em Genetic Analyser 3500xL (Thermo), utilizando capilares de 50cm com polímero Pop7 (Thermo), conforme orientações do fabricante. Os eletroforetogramas gerados foram convertidos em sequência de bases com o programa Sequencing Analysis v5.4 (Thermo).

As sequências obtidas foram comparadas com as disponíveis no Banco de Dados do GenBank, utilizando o algoritmo BLAST (National Center for Biotechnology Information, Maryland, USA). Consideraram-se as sequências com uma identidade percentual igual ou superior a 97% pertencentes à mesma espécie (PALYS et al., 1997; STACKEBRANDT; GOEBEL, 1994).

2.7 Análise de produção de OTA pelos isolados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência-CLAE

Foi quantificada a produção de OTA pelos isolados, classificados como potencialmente produtores de acordo com a literatura, através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência- CLAE.

2.7.1 Extração da OTA das culturas fúngicas

Para a extração da OTA, os isolados foram cultivados em meio CYA e incubados em BOD a 25°C, de acordo com o método de Bragulat et al., (2001). Para a realização do procedimento três “plugs” (circulares de aproximadamente 10 mm de diâmetro) das colônias foram removidos da área interna, do meio e da borda de cada colônia (figura 9). Esses “plugs” foram pesados em balança analítica e depositados em tubos de ensaio envolvidos por papel alumínio. Adicionou-se 1 mL de metanol em cada tubo de ensaio, e procedeu a agitação vigorosa por 5 segundos, posteriormente foram mantidos à temperatura ambiente por 60 minutos. Os extratos foram filtrados por unidades filtrantes de PTFE (politetrafluoretileno) (0,22 µm) (Millipore) e então, analisados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência-CLAE.

O equipamento utilizado foi um HPLC Shimadzu, equipado com duas bombas de alta pressão modelo SPD-M20A, degaseificador modelo DGU 20A3, interface modelo CBM-20A, injetor automático modelo SIL-10AF e detector de fluorescência RF-10 AXL. A coluna usada foi a Agilent-Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,6 x 250 mm, 5 µm) conectada a uma pré-coluna

Agilent-Zorbax Eclipse XDB-C18 4-Pack (4,6 x 12, 5 mm, 5 μ m).

Os comprimentos de onda utilizados foram: excitação de 332 nm e emissão de 476 nm. O fluxo utilizado em toda a análise foi de 0,8 mL min⁻¹ e o volume injetado nas amostras e do padrão foi de 20 μ L. A eluição foi realizada em sistema isocrático de 35:35:29:1 (metanol: acetonitrila: água: ácido acético). O tempo de retenção médio obtido para a OTA foi de $11 \pm 0,1$ min.

A quantificação da OTA nas amostras foi realizada por meio de padronização externa, a partir da construção de uma curva analítica obtida por regressão linear ($y = 1,11756 x 10^7 x - 2592,1485$, em que y é a área do pico e x é a concentração de OTA). O cálculo definiu a área do pico versus a concentração da respectiva solução-padrão obtida pela determinação do coeficiente de determinação (r^2) de 0,9999.

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram estimados por meio dos parâmetros obtidos para a curva analítica construída, sendo calculados, pelas respectivas relações matemáticas: $LD = 3 \times (s/S)$ e $LQ = 10 \times (s/S)$ (em que s = estimativa do desvio padrão da linha de regressão e S = coeficiente angular da linha de calibração) (HARRIS, 2008). Para estes, foram encontrados os valores de 0,0004 e 0,0016 μ g g⁻¹, respectivamente. Todas as amostras e as soluções padrão de OTA foram analisadas em triplicata.

Figura 9 – Representação da retirada dos plugs das colônias fúngicas.



Legenda: Plugs retirados da área interna, meio e borda da colônia no 10 ° dia do período de incubação para extração da OTA, CYA frente (A) e CYA verso (B). Fonte: Do autor (2020).

2.8 Análises estatísticas

Para melhor interpretação do conjunto de dados obtidos nesse experimento foi realizada uma análise dos componentes principais (PCA- Principal Component Analysis) a

fim de correlacionar os fungos filamentosos encontrados com as áreas de estudo utilizando-se o software estatístico SensoMaker (PINHEIRO, 2013).

O alinhamento múltiplo das sequências de nucleotídeos foi feito no GUIDANCE SERVER com o algoritmo MAFFT e os parâmetros padrões do programa. Todas as análises filogenéticas foram realizadas no programa MEGA 6.06 utilizando o modelo de máxima verossimilhança. A confiabilidade da topologia das árvores obtidas foi avaliada usando o método de *bootstrap*, com 100 reamostragens, e o método heurístico *Nearest Neighbor-Interchange* foi usado na busca pela árvore filogenética mais verossímil. As árvores filogenéticas obtidas foram visualizadas no programa *Archeopterix*.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

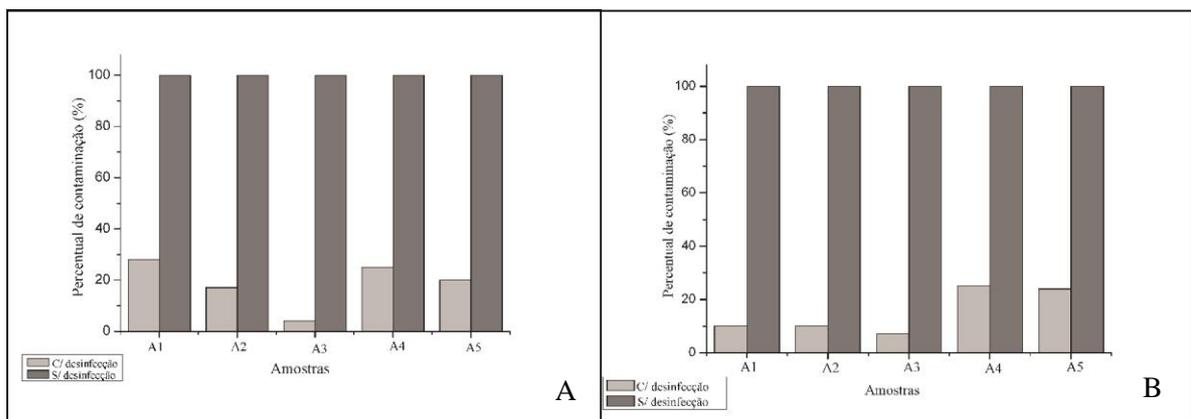
3.1 Percentual de contaminação dos grãos de café por fungos filamentosos

O percentual de contaminação de grãos de café por fungos filamentosos é apresentado na figura 10. Em relação ao meio de cultura DRBC, o tratamento sem desinfecção superficial, apresentou 100% de grãos contaminados para todas as amostras. No tratamento com desinfecção superficial foram observadas algumas variações, o que já era esperado, pois com a utilização do tratamento somente os fungos presentes no interior dos grãos são detectados.

A amostra proveniente da fazenda localizada no município de Três Pontas (A1) obteve um maior percentual de contaminação por fungos filamentosos com a desinfecção superficial (28%), a amostra procedente do município de Natércia (A3) obteve um menor percentual de contaminação (4%).

O resultado para o meio de cultura DG18 apresentou um percentual de grãos de café contaminados idêntico ao DRBC para o tratamento sem desinfecção superficial, apresentando (100%) de contaminação. Observou-se uma variação no percentual de contaminação quando utilizou-se a desinfecção superficial, em relação ao DRBC (figura 11). As amostras A1 e A2 apresentam percentuais de contaminação idênticos (10%). Já a amostra A3 foi a que obteve menor percentual (7%). As amostras A4 e A5 mostraram-se bastante similares, com 25% e 24% de grãos de café contaminados, respectivamente.

Figura 10 - Percentual de contaminação de grãos de café dos meios DRBC (A) e DG18 (B).



Fonte: Do autor (2020).

De acordo com Paterson e Lima (2010), a contaminação por fungos filamentosos em

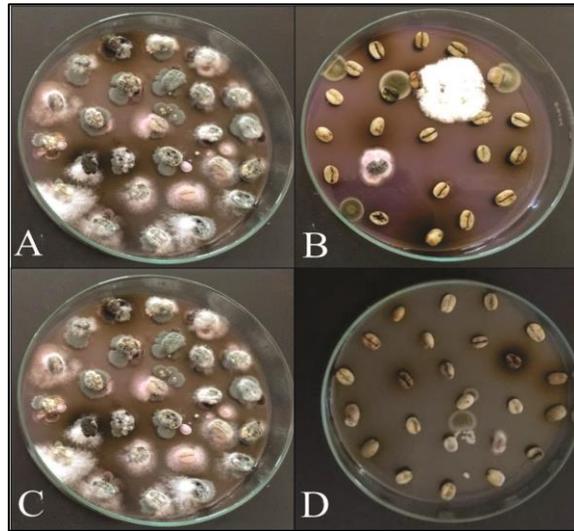
grãos de café ocorre em determinadas condições específicas, como clima, fatores intrínsecos e extrínsecos, cultivo do produto, manuseio, substrato e a genética dos microrganismos. Os percentuais de contaminação relativamente altos observados na amostra A4, proveniente do município Itaipé, com e sem desinfecção superficial das amostras, quando comparados com as demais amostras, podem estar associados às condições climáticas, uma vez que o município encontra-se localizado em uma região com características climáticas divergentes das demais, apresentando menor pluviosidade anual e temperatura anual média mais elevada (21,8 ° C).

A alta incidência de contaminação por fungos filamentosos da amostra A1 no meio de cultura DRBC em ambos os tratamentos, pode estar relacionada com práticas agrícolas da propriedade, uma vez que o município Três Pontas encontra-se localizado na mesma mesorregião Sul/Sudeste mineiro das amostras A2, A3 e A4, sendo assim, possuem características climáticas semelhantes.

Resultados semelhantes de percentual de contaminação por fungos filamentosos em grãos de café utilizando o meio DRBC foram encontrados por Rezende et al. (2013), ao estudarem fungos ocratoxigênicos associados a grãos de café verde em cultivos convencional e orgânico, os autores encontraram 100% de contaminação por fungos filamentosos sem desinfecção superficial, no entanto, encontraram 62% de contaminação por fungos filamentosos quando se utilizou desinfecção superficial.

O tipo de meio de cultura utilizado influencia diretamente no crescimento dos microrganismos. O meio de cultura DRBC contém em sua composição o dicloran, que atua como inibidor de fungos que possuem crescimento rápido, favorecendo o desenvolvimento de colônias de *Aspergillus* e *Penicillium*, e proporcionando o crescimento de uma diversidade maior de fungos pertencentes a esses gêneros, o que pôde ser observado no presente trabalho, onde foi obtida uma diversidade maior de fungos filamentosos nesse meio de cultura. O meio DG18 caracteriza-se por possuir menor atividade de água devido à presença do glicerol, que o torna um meio seletivo, favorecendo o crescimento de fungos xerofílicos (SHREYA et al., 2018; SAMSON et al., 2010).

Figura 11 - Incidência de contaminação de grãos de café por fungos filamentosos.



Legenda: Meio de cultura DRBC sem desinfecção superficial (A) e com (B) e no meio DG18 sem desinfecção (C) e com desinfecção (D). Fonte: Do autor (2020).

3.2 Diversidade de fungos filamentosos por identificação morfológica

Foram isolados 389 fungos filamentosos e a identificação morfológica revelou seis gêneros de fungos: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Complexo Cladosporium cladosporioides*, *Alternaria* e *Eurotium*, como pode ser observado na figura 12.

Em relação ao total de isolados obtidos de *Aspergillus*, a maior frequência de ocorrência se deu à *Aspergillus* Seção *Nigri* (89,36%), já *Aspergillus* Seção *Circumdati* apresentaram ocorrência de 6,38% e demais Seções (4,26%). Na amostra A1 foram isolados 71 fungos filamentosos, havendo uma predominância do gênero *Fusarium*, apresentando (65,22%) de frequência de ocorrência, seguido de *Penicillium* (18,84%); *Complexo Cladosporium cladosporioides* (7,25%). Além disso, observou-se a presença de um morfotipo I, do qual não foi possível chegar à identificação em nível de gênero, apresentando (2,9%) de incidência na amostra.

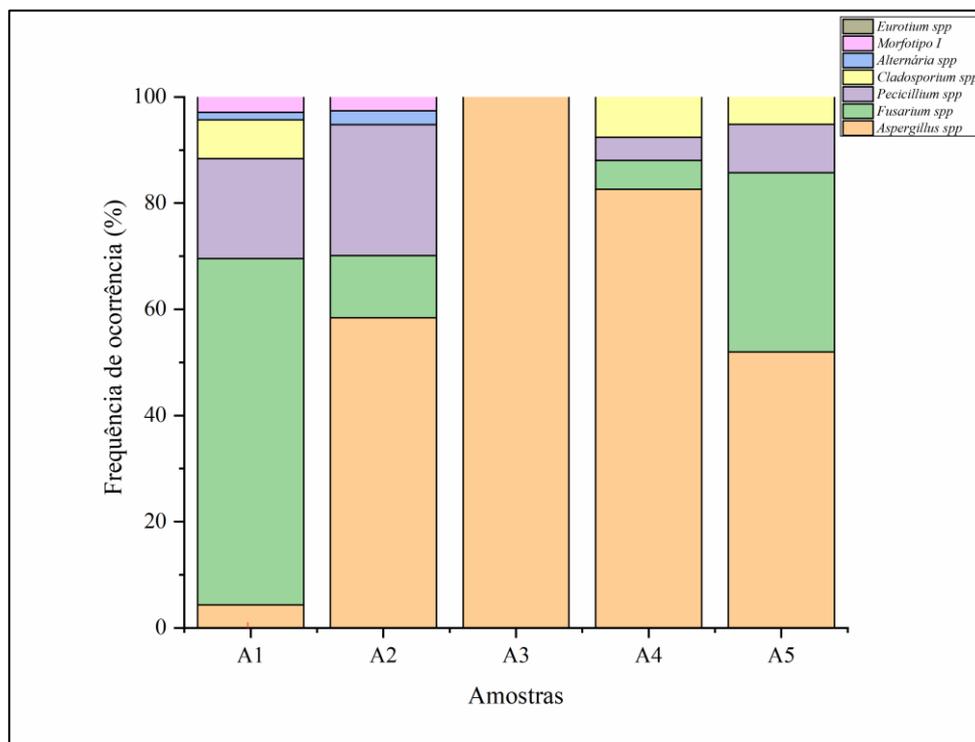
Na amostra A2, 77 fungos filamentosos foram isolados. Observou-se maior incidência de *Aspergillus* (58,44%), seguida de *Penicillium* (24,68%) e *Fusarium* (11,69%). Também foi observado um Morfotipo 1 em baixo nível de ocorrência (2,60%). Na amostra A3 foram isolados 72 fungos filamentosos, todos pertencentes ao gênero *Aspergillus*. A amostra A4 obteve maior número de isolados (92) com predominância de *Aspergillus* (82,61%), seguido de *Complexo Cladosporium cladosporioides* (7,61%) e *Penicillium* (4,35%).

Na amostra A5, foram isolados 77 fungos filamentosos. *Aspergillus* e *Fusarium* apresentaram as maiores frequências de ocorrência de (51,95%) e (33,7%), respectivamente. Nessa amostra, fungos do *Complexo Cladosporium cladosporioides*, apresentaram maior frequência entre as amostras analisadas (9,10%).

A micobiota do café tem sido estudada por diversos autores e os resultados obtidos no presente trabalho condizem com de outras pesquisas que têm sido realizadas ao longo do tempo e que mostram uma grande diversidade de fungos filamentosos descritos como contaminantes naturais de grãos de café, na qual apontam os gêneros de *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Cladosporium* como os principais (ALVES DA SILVA et al., 2020; GEREMEW et al., 2016; IAMANAKA et al., 2014; REZENDE et al., 2013; VILELA et al., 2010; SILVA; BATISTA; SCHWAN, 2008; SILVA et al., 2000).

As variações encontradas na micobiota em decorrência dos locais de amostragem podem ser justificadas pelas condições sanitárias locais, colheita, condução do método de processamento, transporte e armazenamento. (PATERSON; LIMA; TANIWAKI, 2014).

Figura 12 - Distribuição de gêneros de fungos filamentosos isolados.



Fonte: Do autor (2020).

A frequência de ocorrência das espécies de fungos filamentosos isolados e

identificados das amostras de grãos de café a partir do meio de cultura DRBC é ilustrada na figura 13. A partir desse meio foram isolados 226 fungos filamentosos, equivalente a 58,09% do total de isolados. *A. niger* foi a espécie de maior ocorrência no meio DRBC, sendo identificados 135 isolados, correspondendo a 59,73% do número total de isolados. *A. niger* mostrou-se presente em altos níveis nas amostras A2, A3 e A4 e em nível moderado na amostra A5 e não foi isolada na amostra A1.

Diferente das demais amostras, a amostra A1 apresentou um alto percentual de ocorrência de *Fusarium* spp., correspondendo a 66,66% dos isolados, sendo *Fusarium oxysporum* a espécie de maior ocorrência (31,48%) e apresentou a maior diversidade de espécies de fungos filamentosos. Fungos pertencentes ao gênero *Penicillium* corresponderam a 27,84% do total de isolados, dentre eles, foi identificada em nível de espécie: *Penicillium brevicompactum*.

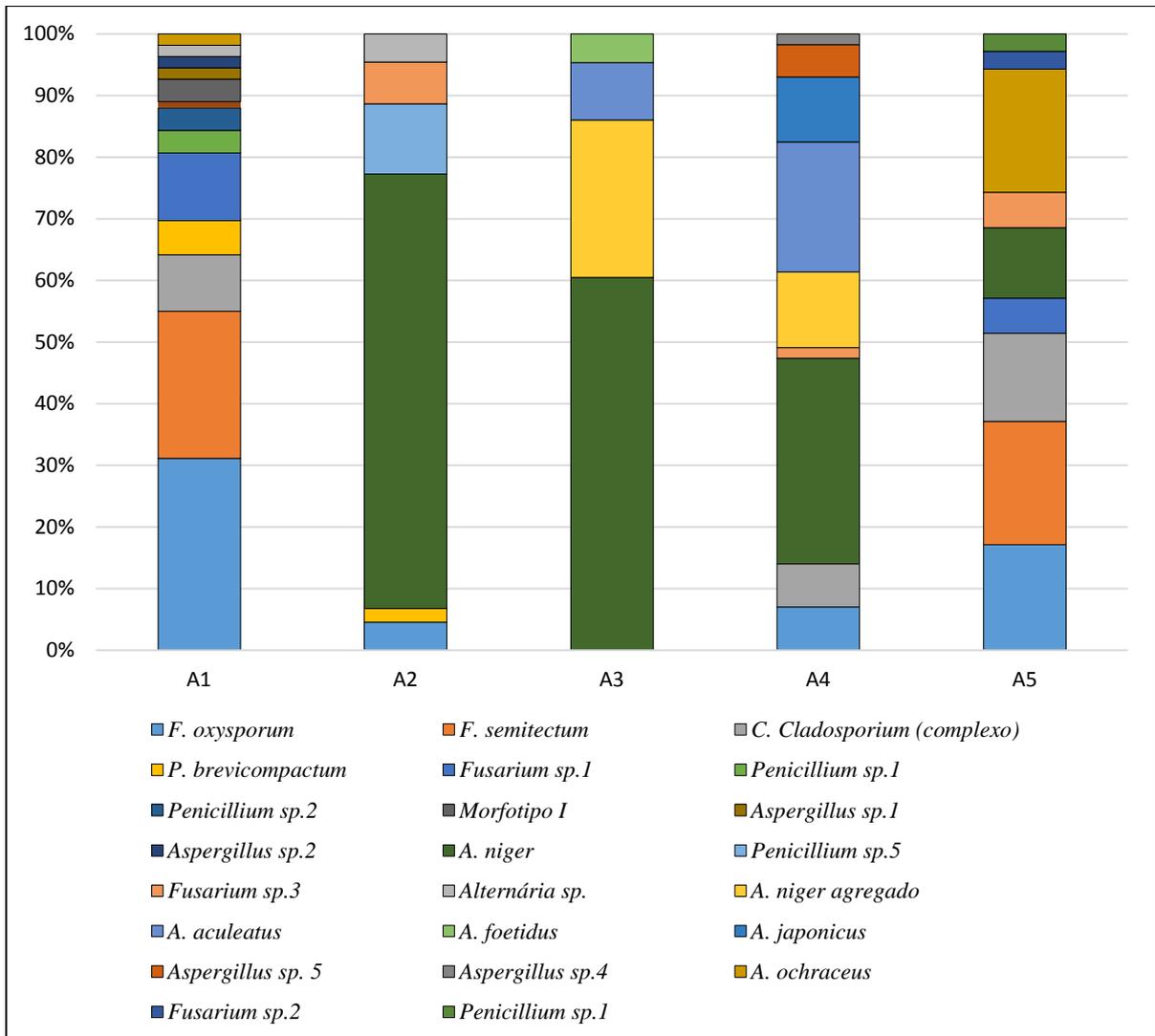
Na amostra A2 houve predominância de *A. niger* (70,45%), *Penicillium* spp. foram observadas equivalente a 13,63%, sendo identificadas as espécies: *P. sp5* (11,76%) e *P. brevicompactum* (2,27%). *Fusarium* spp. apresentou (11,37%), sendo identificada: *F. oxysporum*, apresentando 4,55% de frequência de ocorrência. Além dos fungos mencionados, foi observada a presença de *Alternaria* sp., apresentando 4,55% de frequência de ocorrência.

A menor diversidade de fungos filamentosos se deu à amostra A3, em que todos os isolados foram pertencentes ao gênero *Aspergillus*. *A. niger* apresentou uma alta frequência de ocorrência (60,47%), seguida de *A. niger* agregados (25,58%). *A. aculeatus* e *A. foetidus* apresentaram frequências relativamente baixas de ocorrência (9,3%) e (4,6%), respectivamente.

A amostra A4 apresentou alta frequência de ocorrência de *Aspergillus* spp., sendo encontradas as espécies: *A. niger* (33,33%), *A. aculeatus* (21,05%), *A. niger* agregados (12,28%), *A. japonicus* (10,54%), *A. sp 5* (5,26%) e *A. sp 4* (1,75%). A presença de *Cladosporium cladosporioides* também foi identificada, apresentando 7,02% de frequência de ocorrência e *Fusarium* sp. em uma frequência baixa (1,75%).

Na amostra A5, as maiores frequências de ocorrência foram atribuídas às espécies: *A. ochraceus* e *F. semitectum*, ambas apresentando 20%, seguida de *F. oxysporum* (17,14%), *Complexo Cladosporium cladosporioides* e *Fusarium* spp. (14,28%), *A. niger* (11,43%). Ainda, observou-se a presença de *Penicillium* spp. A maior frequência de ocorrência de isolados potencialmente produtores de OTA foi encontrada nessa amostra, sendo identificados 7 isolados, todos pertencentes à *Aspergillus* Seção *Circumdati*.

Figura 13 - Frequência de ocorrência (%) de fungos filamentosos presentes nas amostras A1 a A5 isolados do meio DRBC.



Fonte: Do autor (2020).

A frequência de ocorrência de fungos filamentosos isolados a partir do meio DG18 é ilustrada na figura 14. Foram isolados 163 fungos filamentosos nesse meio de cultura, correspondendo a 41,90% do total de fungos isolados. Assim como o meio DRBC, o meio DG18 mostrou alta frequência de ocorrência da espécie *A.niger*, correspondendo a 34,34% dos isolados identificados. A maior diversidade de fungos filamentosos nesse meio foi atribuída à amostra A5 e a menor à amostra A3.

A amostra A1 apresentou alta incidência de *Fusarium* spp., assim como foi observada no meio de cultura DRBC. Nessa amostra 70,6% dos isolados pertencem ao gênero *Fusarium*

e dentre as espécies identificadas, *F. oxysporum* apresentou maior percentual de ocorrência (52,95%), seguida de *Penicillium* spp. (23,72%), dentre elas, uma identificada em nível de espécie: *P. brevicompactum* correspondendo a 17,64% do total de isolados. Ainda, foram identificados três morfotipos de *Penicillium* spp., correspondendo a 11,76% do total de isolados na amostra.

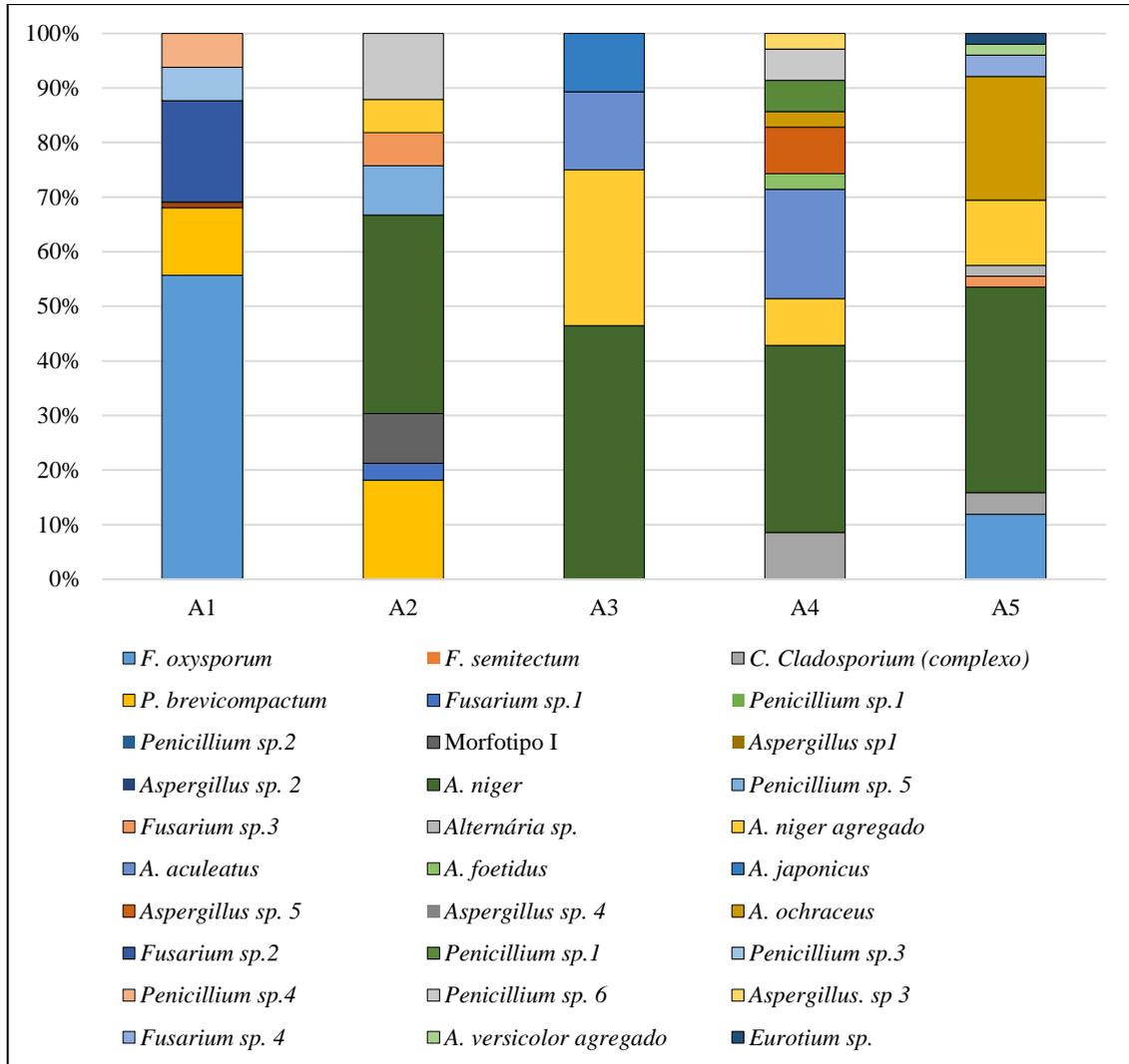
O maior percentual de ocorrência foi atribuído à *Aspergillus* spp. (42,42%) na amostra A2, sendo *A. niger* correspondente a 36,36% e *A. niger* agregados 6,06%. *Penicillium* spp. correspondeu a 39,39%, sendo identificada a nível de espécie: *P. brevicompactum* (18,18%). Ainda, foi observada a presença de *P. sp 6* (12,12%) e *P. sp. 5* (9,09%). Foi observada a ocorrência de um morfotipo I e *Fusarium* spp., ambos com um percentual de ocorrência de 9,09%.

Na amostra A3, todos os isolados identificados eram pertencentes à *Aspergillus* spp. O maior percentual de ocorrência se deu à espécie *A. niger* (44,83%). Seguido de *A. aculeatus* com 13,79% e *A. japonicus* (10,34%).

Foi observada uma distribuição uniforme de fungos filamentosos na amostra A4, *A. niger* e *A. niger* agregados apresentaram 34,28% e 8,57% de frequência de ocorrência, respectivamente. A espécie *A. ochraceus* foi isolada e mostrou baixo percentual de ocorrência (2,86%). *Penicillium* spp. apresentou 11,44%. Fungos pertencentes ao *Complexo Cladosporium cladosporioides* foram isolados com um percentual de ocorrência de 8,57%, sendo a amostra que apresentou a maior ocorrência de fungos pertencentes a esse complexo.

Por fim, na amostra A5 foi observada uma grande diversidade de fungos filamentosos. Nessa amostra, *A. niger* foi a espécie de maior frequência de ocorrência (45,23%), seguida de espécies pertencentes ao agregado *A. niger*, com 14,38%. É importante ressaltar que dentre as amostras analisadas, a A5 obteve maior frequência de ocorrência da espécie ocratoxigênica *A. ochraceus*, correspondendo a 7,14%. *Fusarium* spp. representou 21,43% de ocorrência, e a espécie de maior presença nessa amostra foi *F. oxysporum*, com 14,29%.

Figura 14 - Frequência de ocorrência (%) de fungos filamentosos presentes nas amostras A1 a A5 isoladas do meio DG18.



Fonte: Do autor (2020).

Segundo Taniwaki e Pitt Magan (2018), *Aspergillus* é um dos três gêneros de fungos mais importantes na deterioração de alimentos e na produção de micotoxinas, sendo os outros *Fusarium* e *Penicillium*. O que pôde ser observado no presente estudo, em que isolados dos gêneros citados acima, foram encontrados em todas as amostras em percentuais de ocorrência que variaram de relativamente baixos a extremamente elevados.

De acordo com Pitt e Hocking (1997), *Aspergillus* compete por substrato com *Fusarium* e *Penicillium*, e sua incidência aumenta em ambientes com alta temperatura e baixa atividade de água, condições ideais encontradas nas etapas finais de processamento e armazenamento do café.

Um recente estudo realizado por Alves da Silva et al., (2020), cujo objetivo foi identificar fungos toxigênicos associados à grãos de café defeituosos e realizar a quantificação de produção de OTA nesses grãos, foi observado que a maioria dos isolados de fungos filamentosos obtidos eram pertencentes ao gênero *Aspergillus* (64%), presentes em altos percentuais de ocorrência tanto no tratamento sem desinfecção quanto no tratamento com desinfecção superficial das amostras.

Pardo et al. (2004), encontraram 67,4% de grãos de café contaminados por *Aspergillus* Seção *Nigri*, os quais possuem resistência à raios solares por apresentarem esporos com pigmentação escura. Essa característica favorece sua permanência no ambiente e oferece vantagens frente a seus competidores (NIELSEN et al., 2009; PITT; HOCKING, 2009).

Aspergillus Seção *Nigri* predominaram nas amostras analisadas neste trabalho. Essa informação também foi relatada por Rezende et al. (2013), em sua pesquisa cujo objetivo foi avaliar a incidência de fungos filamentosos em grãos de café em plantis convencional e orgânico no Sul de Minas Gerais, os autores observaram uma alta incidência de *Aspergillus* Seção *Nigri* corresponderam a 50,5 % do total de isolados, havendo predominância de *A. niger*, o que a caracteriza como uma espécie frequentemente observada em altos percentuais de ocorrência em café. Essa informação é reforçada por Taniwaki et al. (2003), que avaliaram a distribuição de fungos com habilidade de produzir OTA em grãos de café, os autores constataram que *A. niger* representou 62,95% dos isolados. *A. niger* é amplamente distribuída no ambiente, sendo contaminante de diversos alimentos, não apenas de grãos de café (PERRONE et al., 2007; URBANO et al., 2001).

Aspergillus Seção *Nigri* possuem uma ampla distribuição em todo o mundo e são considerados fungos comuns na deterioração de diversos alimentos, incluindo o café, sendo muito utilizados em aplicações biotecnológicas e caracterizados como produtores de OTA (CABAÑES; BRAGULAT, 2018).

Silva et al. (2008), estudando a incidência e distribuição de fungos filamentosos presentes em diferentes etapas da produção de café processados pelo método via-seca observaram que *A. niger* foi isolada apenas no último dia de secagem (22° dia), o que também pôde ser observado no presente estudo, em que a ocorrência dessa espécie foi alta, uma vez que todas as amostras foram coletadas na fase final do processo de secagem (20° dia).

Nesse estudo, o isolado mais comum pertencente ao gênero *Penicillium* foi: *P. brevicompactum*. Essa espécie também foi relatada por outros autores que estudaram a diversidade de fungos filamentosos em café (ALVES DA SILVA et al., 2020; REZENDE et

al., 2013; SILVA; BATISTA; SCHWAN, 2008; BATISTA et al., 2003), o que propõe que a espécie citada é frequentemente isolada a partir de grãos de café.

A presença de isolados pertencentes ao gênero *Cladosporium*, ao contrário dos demais gêneros, pode ser considerada positiva, pois seu crescimento funciona como uma barreira para a entrada de outros fungos prejudiciais à qualidade e segurança do café (CHALFOUN, 2010; CHALFOUN et al., 2009). No presente estudo, foi observada uma ocorrência relativamente baixa de *Cladosporium*, em contrapartida, Silva; Batista; Schwan, (2008), relataram em sua pesquisa que 12% do total de isolados de fungos filamentosos de cerejas de café foram identificados como pertencentes ao gênero *Cladosporium*. A umidade e a composição química dos grãos de café, as condições ambientais e o manejo da cultura e do produto podem influenciar o desenvolvimento de microrganismos e sua atividade metabólica (SILVA; BATISTA; SCHWAN, 2008).

3.3 Análise dos componentes principais - PCA

A análise PCA foi realizada para compreender o comportamento da microbiota em função das amostras, meios de cultura e os tratamentos (utilização ou não de desinfecção superficial). Como pode ser observado nas figuras 15 e 16, há variações em decorrência do meio de cultura e da utilização dos tratamentos nas amostras. No meio DRBC, os dois componentes principais foram responsáveis por 58,44% e 49,78% de variação.

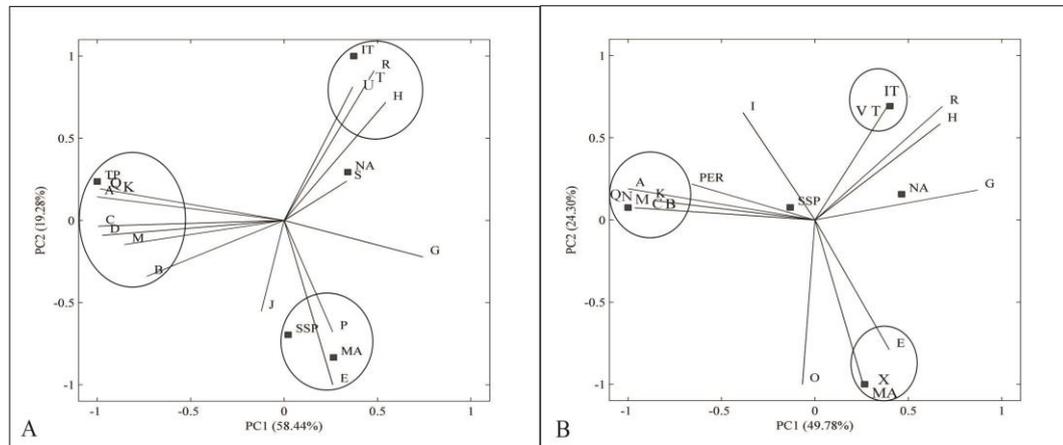
Na figura 15 (A) em que não se utilizou desinfecção superficial é possível visualizar que as amostras A2 (MA) e A5 (SSP) se correlacionaram positivamente com os fungos *P. sp5* e *Fusarium sp3*. A Amostra A4 (IT) obteve correlação positiva com a amostra A3 (NA) e com os fungos *A. aculeatus*, *A. japonicus*, *A. niger* agregados, *A.sp. 5* e *A. foetidus*, o que reflete nos dados obtidos nessas amostras, em que fungos foram observados em altas ocorrências. A amostra A1 (TP) correlacionou-se negativamente com as demais, o que pode ser explicado pelo perfil divergente de fungos filamentosos encontrado nesta amostra. A espécie *A. westerdijkiae* relatada somente na amostra A1 se correlacionou muito bem com a mesma, assim como os fungos *F. oxysporum*, *Pencillium sp.1*, *Fusarium sp.1*, *Fusarium sp.2*, *P. brevicompactum* e *F. semitectum*. É possível observar também uma correlação positiva do fungo *A. niger* com as amostras A2 a A5 e negativa com a amostra A1, uma vez que essa espécie não foi isolada dessa amostra.

Com a utilização do tratamento de desinfecção superficial da amostra, é possível

observar que o percentual de contaminação correlacionou-se negativamente com a amostra A1 e positivamente com as demais. As amostras A3, A4 e A5 obtiveram perfis de fungos filamentosos muito similares se correlacionado com as espécies: *A.niger*, *A. niger* agregados, *A. aculeatus* e *A japonicus*, estando a espécie *A. niger* intimamente correlacionada com a amostra A3. Assim como no tratamento sem desinfecção, a amostra A1 correlacioou-se negativamente com as demais.

É possível observar na figura 15 (B) que a amostra A1 obteve um perfil de fungos filamentosos no qual houve uma correlação com as espécies *F. oxysporum*, *P. brevicompactum*, *Penicillium* sp.3, *F. semitectum* e *F. sp. 1*. ainda é possível observar que a amostra A5 obteve correlação com os fungos *Alternaria* sp., *Fusarium* sp.3 e *Penicillium* sp.4. *Complexo cladosporium cladosporioides* se correlacionou positivamente com a amostra A5.

Figura 15 - Análise de componentes principais–PCA do meio de cultura DRBC, sem (A) e com desinfecção superficial (B).



Legenda: TP- Três Pontas; IT- Itaipé; MA- Machado; SSP- São Sebastião do Paraíso; NA- Natércia; A- *Fusarium oxysporum*; B- *Fusarium semitectum*; C- *Fusarium* sp.1; D- *Fusarium* sp.2; E- *Fusarium* sp.3; G- *A. niger*; H- *A. niger* agregado; I- *Complexo cladosporium cladosporioides*; J- *A. Ochraceus*; K- *P. sp.1*; M- *P. brevicompactum*; N- *P. sp.3*; O- *P sp.4*; P- *P. sp 5*; Q- *A. westerdijkiae*; R- *A. aculeatus*; S- *A. foetidus*; T- *A. japonicus*; U- *A. sp 5*, V- *A. sp4*, X- *Alternaria* sp. Fonte: Do autor (2020).

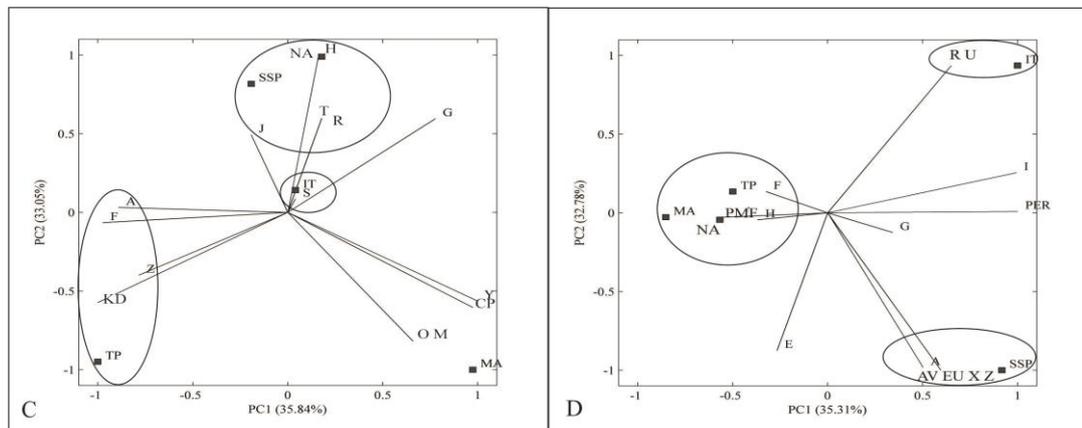
A análise dos componentes principais para o meio de cultura DG18 sem desinfecção superficial (C) e com desinfecção superficial (D) é ilustrada na figura 16, onde os dois componentes principais foram responsáveis por 35,84% e 35,81% de variação. Observou-se que sem a desinfecção superficial da amostra houve uma correlação positiva das amostras A3 e A5 com os fungos *A. niger* agregados, *A. japonicus* e *A. aculeatus*. A espécie ocratoxigênica

A. ochraceus se correlacionou positivamente com a amostra A5, como era de se esperar, uma vez que foi relatada uma alta frequência dessa espécie nessa amostra. A espécie *A. foetidus* se correlacionou com a amostra A5. Como foi observado no meio DRBC na amostra A1 houve uma correlação com *Fusarium* spp. e a amostra A2 correlacionou-se com os fungos: *Fusarium* sp.1, *P. Seção Citrina*, *Penicillium* sp.4, *P. brevicompactum* e *Penicillium* sp 6. A espécie *A. niger*, correlacionou-se positivamente com as amostras A3, A4 e A5.

Quando se utilizou a desinfecção superficial, observou-se que as amostras A1, A2 e A3 se correlacionaram com os fungos *P. brevicompactum*, *P. sp.4*, *F. sp.4*. As espécies *A. aculeatus* e *A. sp 5* se correlacionaram com a amostra A4. Já a amostra A5, se correlacionou com os fungos *Eurotium* sp., *A. versicolor* agregado, *P. Seção citrina*, *F. oxysporum* e *Alternaria* sp.

De acordo com Paterson; Lima; Taniwaki (2014), na secagem do café é provável que ocorram temperaturas muito altas, que podem inibir o crescimento de espécies de *Penicillium*, enquanto *Aspergillus* podem crescer bem. No presente estudo, foi observado que com exceção da amostra A1, houve um alto percentual de ocorrência de *Aspergillus* spp.

Figura 16 - Análise dos componentes - PCA do meio de cultura DG18 sem (C) e com desinfecção superficial.



Legenda: TP- Três Pontas; IT- Itaipé; MA- Machado; SSP- São Sebastião do Paraíso; NA- Natércia; A- *F. oxysporum*; C- *F.sp.1*; D- *F. sp.2*; E- *F.sp.3*; F- *F. sp.4*; G- *A. niger*; H- *A.niger* agregado; I- *Complexo cladosporium cladosporioides*; J- *A. ochraceus*; K- *P. sp.1*; M- *P. brevicompactum*; O- *P. sp.4*; R- *A. aculeatus*; S- *A. foetidus*; T- *A.japonicus*; U *A. sp.5*; Z- *P. Seção Citrina*; Y- *P. sp5*; EU- *Eurotium* sp; AV- *A. versicolor* agregado, X- *Alternária* sp. Fonte: Do autor (2020).

3.4 Análise dos perfis proteicos por MALDI-TOF MS

Os isolados foram submetidos a uma análise do perfil proteico para uma possível

identificação por MALDI-TOF MS. Apenas cinco isolados foram identificados, onde 2 apresentaram identificação a nível de gênero (*Penicillium* sp.) pertencentes à amostra A4 e apresentaram score de 1,952 e 1,888. Os outros três isolados foram identificados como *A. niger*, o primeiro pertencente à amostra A4 e apresentou score de 1,72, os outros dois isolados identificados eram pertencentes à amostra A5 e apresentaram score de 1,722 e 1,792.

Dessa forma, os isolados identificados por MALDI-TOF MS confirmaram a identificação morfológica atribuída aos mesmos, demonstrando ser uma técnica precisa e rápida, porém, não aceitável como o único procedimento de identificação, embora auxilie no agrupamento dos perfis protéicos dos isolados. Os demais isolados analisados não apresentaram picos bons o bastante para a identificação em nível de gênero ou espécie.

3.5 Identificação molecular dos isolados

Na taxonomia microbiana, muito evidente em taxonomia fúngica, a associação de dados como avaliação de micotoxinas, metabólitos secundários e análises moleculares podem muitas vezes ser mais aplicados que dados para uma finalidade específica, dessa forma, uma abordagem de múltiplas técnicas geram dados de maior qualidade, mais precisos e úteis (SIMÕES et al., 2013). Neste contexto, os isolados foram agrupados e selecionados através da análise morfológica e Maldi Tof-MS, sendo assim vinte e quatro isolados foram submetidos ao sequenciamento das regiões ITS (*Penicillium*) e β - tubulina (*Aspergillus*), sendo oito pertencentes ao gênero *Penicillium* e dezesseis à *Aspergillus*. Na tabela 4 é possível observar que vinte e dois isolados foram identificados em nível de espécie e dois em nível de gênero.

Tabela 4 – Isolados dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* relacionados com a espécie mais próxima disponível no BLAST e os respectivos valores de cobertura (cobert.) e máxima identidade (continua).

Isolado	Fragmento (pb)	Referência do N° de acesso	Cobert. (%)	Max. Ident. (%)	N° do acesso
301 D	487	<i>A. niger</i> ZHX4	99	98,1	MG518465.1
281 D	437	<i>P. citrinum</i>	100	99,5	MG925209.1
135 D	421	<i>P. bilaiae</i>	98	99,8	NR_111679.1
165D	505	<i>A. niger</i> S20	98	99,8	KF669409.1
53D	422	<i>A. pseudoustus</i> IBT 22361	95	99,7	MN735978.1
118D	501	<i>A. niger</i> S20	100	99,2	KF669409.1
160D	501	<i>A. niger</i> S20	100	98	KF669409.1
1D	514	<i>P. brevicompactum</i> CBS 287.53	99	99,6	MH857204.1
300D	551	<i>A. niger</i> CrP13	100	99,6	KF669409.1
245D	559	<i>A. niger</i> S20	100	99,6	KF669409.1
185D	504	<i>A. niger</i>	99	99,5	KF669409.1
139D	503	<i>A. niger</i> S20	99	99,5	KF669409.1
214D	504	<i>A. niger</i> AIS5_D33	99	99,6	JX463319.1
54D	508	<i>Penicillium</i> sp. ECCN243	100	99,2	MT239576.1
205D	504	<i>A. niger</i> S20	99	99,5	KF669409.1
262D	496	<i>A. caelatus</i>	99,2	99,5	MK119759.1
141D	501	<i>A. niger</i> S20	99	99,6	KF669409.1
272D	522	<i>A. pallidofulvus</i> G23- 1_T1	100	99,5	MN233625.1
18D	536	<i>Penicillium</i> sp. CLE161	99	99	MN543997.1

72D	486	<i>P. crustosum</i> FRR 1669	99	99,1	NR_077153.1
290D	532	<i>A. westerdijkiae</i> NRRL 3174	99	99,4	AY819975.1
32D	533	<i>A. westerdijkiae</i> NRRL 3174	99	99,6	EF661329.1
339D	522	<i>Penicillium</i> <i>cairnsense</i> CBS 126226	99	98,6	MH863991.1
224D	466	<i>P. cairnsense</i> CBS 126226	100	99,6	NR_121508.1

Fonte: Do autor (2020).

A árvore filogenética para o gênero *Aspergillus* (figura 17), agrupou isolados em quatro Seções distintas. Os isolados da Seção *Nigri* identificados como *A. niger* agregados, foram identificados como *A. niger*, ainda, foi possível observar que os dois isolados de *Aspergillus* Seção *Circumdati* identificados morfológicamente como *A. ochraceus* e *A. sp1*, responsáveis pelas maiores concentrações de OTA do presente estudo, são *A. westerdijkiae*, sendo estes, identificados com identidade máxima maiores que 99%.

O isolado identificado morfológicamente como *A. sp 2* mostrou ser a espécie *A. pseudoustus*, pertencente à Seção *Usti*, descrito por Samson et al. (2011). Ainda, um isolado da Seção *Flavi*, identificado como *A. sp 4* é a espécie *A. caelatus*, descrita por Samson et al. (2014). Dentro da Seção *Circumdati*, os isolados se agruparam em duas espécies distintas, *A. westerdijkiae* e *A. pallidofulvus*, espécies intimamente próximas a *A. ochraceus*, esta foi posteriormente dividida em três espécies e uma delas, *A. westerdijkiae*, é agora reconhecida como a principal fonte de OTA no café arábica (SAMSON et al., 2004).

Taniwaki et al. (2003) relataram que *A. ochraceus* foi a espécie de *Aspergillus* Seção *Circumdati* predominante no café brasileiro, no entanto, antes da descrição de *A. westerdijkiae* realizada por Samson et al. (2004), caracterizando a espécie como um membro distinto da Seção *Circumdati*. Essas duas espécies intimamente relacionadas possuem morfologia semelhante, podendo ser facilmente mal identificadas (NOONIM et al., 2008).

Em um estudo realizado por Morello et al. (2007) utilizando sequências do gene β -tubulina para a diferenciação de isolados de café brasileiro previamente identificados como *A.*

ochraceus, foi constatado que 84% dos isolados eram na verdade *A. westerdijkiae*. *A. westerdijkiae* é provavelmente a fonte mais significativa para a contaminação de OTA (NOONIM et al., 2008).

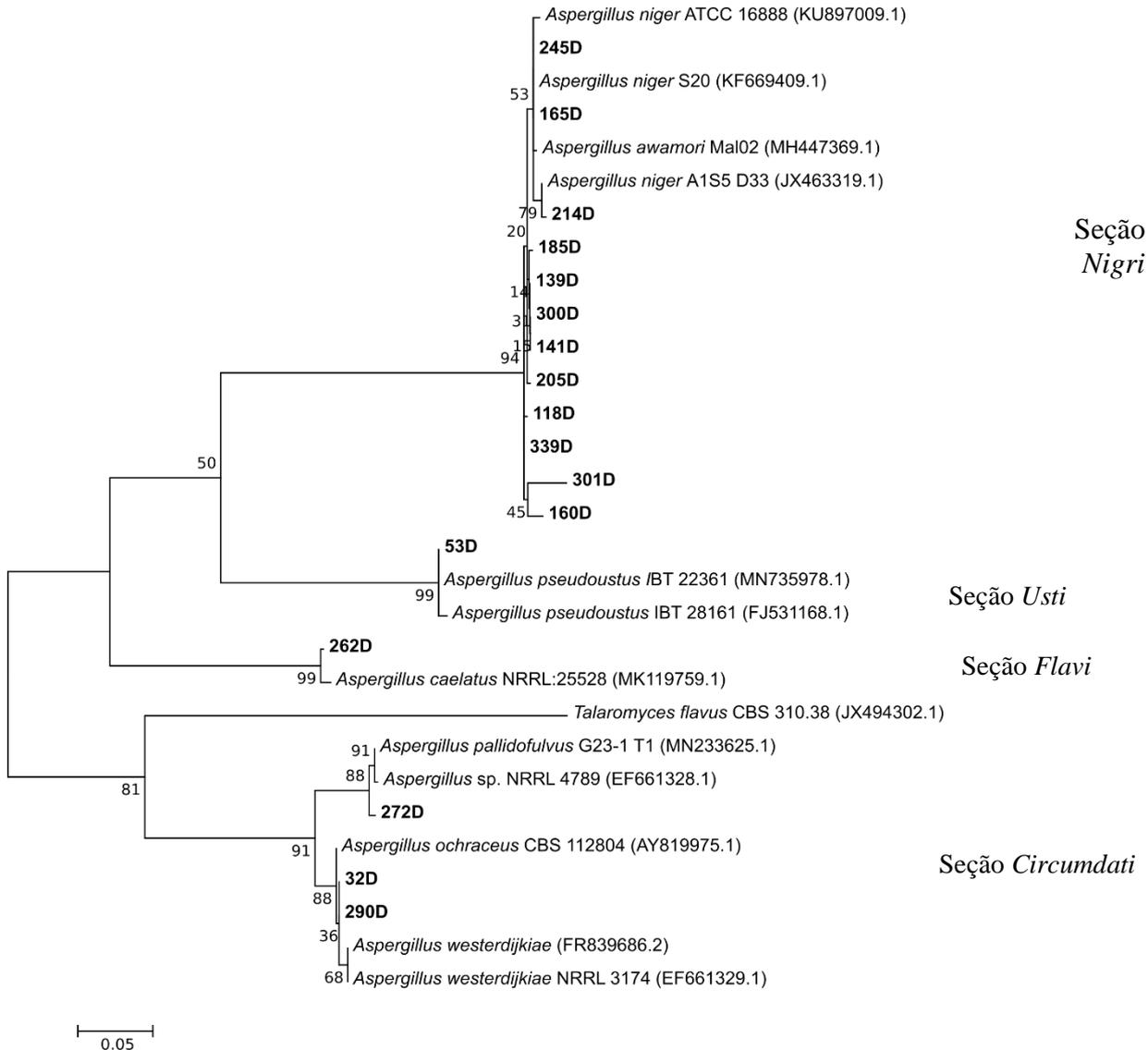
Na análise filogenética, os isolados de *Penicillium* apresentam identificações divergentes para cada isolado representante, o único isolado identificado em nível de espécie pelas características morfológicas como *P. brevicompactum* teve a sua identificação confirmada pelo sequenciamento, apresentando 99,6% de identidade máxima. O isolado *P. sp.* Seção Citrina, foi identificado como *P. citrinum*. Os demais isolados caracterizados como *Penicillium spp.* foram identificados como: *P. bilaiae*, *P. crustosum*, *P. cairnsense*, *Penicillium sp* CLE161 e *Penicillium sp.* ECCN243, os dois últimos somente em nível de gênero..

Pode ser observadas na tabela 4, que a maioria das espécies apresentou altas porcentagens de identidade, maiores que 98%. Entretanto, esta análise somente norteia a construção das árvores, pois muitas vezes resultados quase perfeitos nessa ferramenta, ainda representam espécies diferentes (BENSON et al., 2013).

Em uma revisão feita por Visagie et al. (2014) das espécies de *Penicillium* identificadas, foi sugerida que a região ITS seja utilizada como código de barras desse gênero. Apesar disto, as árvores geradas utilizando sequências ITS para o gênero *Penicillium* no presente estudo não foram tão informativas, pois não possibilitou realizar a separação das espécies, e, portanto, não foram aqui mostradas.

A caracterização morfológica é dificultosa em vários aspectos, além disso, há uma escassez de chaves de identificações de espécies recentemente identificadas, uma vez que o surgimento constante de novas espécies faz da identificação morfológica uma ferramenta indefinida, sendo indispensável à junção de técnicas de biologia molecular para uma identificação mais segura e confiável.

Figura 17 - Árvore filogenética de máxima verossimilhança inferida a partir do alinhamento das seqüências do gene β -tubulina para os fungos do gênero *Aspergillus*.



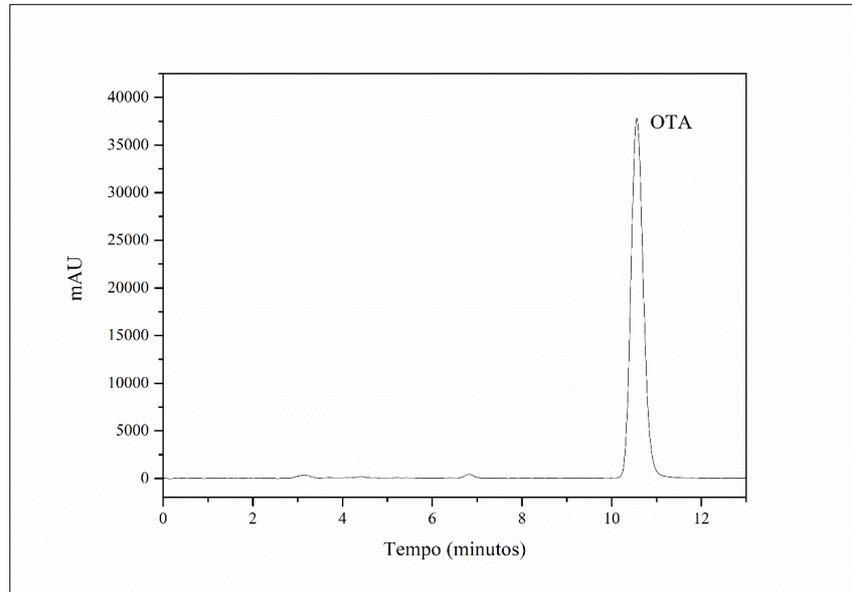
Fonte: Do autor (2020).

3.6 Quantificação de OTA dos isolados ocratoxigênicos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - CLAE

Foram reativados 191 isolados potencialmente ocratoxigênicos e sua produção de OTA foi analisada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência-CLAE. A figura 18 ilustra o perfil cromatográfico da solução padrão de Ocratoxina A, com concentração de 0,3 $\mu\text{g/g}$,

podendo ser observado um tempo de retenção médio de 11 minutos.

Figura 18 - Cromatograma da solução padrão de OTA.



Fonte: Do autor (2020).

A amostra A1, apresentou a menor ocorrência de fungos potencialmente ocratoxigênicos, sendo identificados apenas 2 isolados, Na amostra A2 foram identificados 45 isolados. A amostra A3 apresentou a maior ocorrência de fungos potencialmente ocratoxigênicos, sendo identificados 58 isolados. A amostra A4, apresentou sendo identificados 47. Por fim, na amostra A5 foram identificados 39 isolados. Os percentuais de isolados ocratoxigênicos quando comparados com o total de isolados é mostrado na tabela 5.

Tabela 5 - Percentual de fungos ocratoxigênicos isolados a partir das amostras.

Amostras	Total de isolados	Isolados ocratoxigênicos (%)
A1	71	2,82%
A2	77	58,44%
A3	72	38,89%
A4	92	51,08%
A5	77	50,64%

Fonte: Do autor (2020).

A distribuição dos isolados ocratoxigênicos, bem como os níveis de contaminação de OTA são mostrados na tabela 6. Na amostra A1, os dois isolados ocratoxigênicos identificados mostraram-se altamente produtores de OTA, em níveis maiores que 4 µg/g, um deles é ilustrado na figura 19. Na amostra A2, 36% dos isolados produziram OTA e não houve produção em níveis maiores que 5 µg/g. Embora a amostra A3 tenha apresentado maior ocorrência de fungos potencialmente ocratoxigênicos, apenas 36,21% dos isolados foram produtores de OTA, 31% em concentrações baixas entre 0.001-1.0 µg/g e apenas 5,15% produziram OTA em concentrações maiores que 1 µg/g.

A maior ocorrência de fungos produtores de OTA se deu à amostra A4, onde 61,70% dos isolados foram produtores, 55% em concentrações baixas e 6,38% em concentrações mais elevadas, maiores que 5 µg/g. As concentrações mais elevadas de OTA foram obtidas por isolados pertencentes à amostra A5, onde 23% dos isolados produziram OTA em concentrações maiores que 5 µg/g, isso por ser explicado pelo fato de a amostra A5 apresentar um alto nível de contaminação por espécies de *Aspergillus* Seção *Circumdati*, caracterizados como significativas de OTA em café, ainda, pode-se observar que 25,64% dos isolados foram produtores em concentrações mais baixas nessa amostra e 51,28% não produziram OTA.

De forma geral, 41,88% dos isolados produziram OTA. Fungos do gênero *Aspergillus* Seção *Nigri* e *Circumdati* foram comuns nas amostras de grãos de café analisadas. *Aspergillus* Seção *Nigri* foram mais frequentes, correspondendo a 90,58% do total de isolados potencialmente ocratoxigênicos, no entanto, apenas 39,5% produziram OTA. Os isolados da Seção *Circumdati* corresponderam a 10,42% dos isolados potencialmente ocratoxigênicos e 67% dos isolados foram produtores de OTA.

Resultados semelhantes foram encontrados por Oliveira, (2016), que estudou a incidência de fungos do gênero *Aspergillus* Seções *Nigri* e *Circumdati* em grãos de café em Minas Gerais, constatou que 43,2% dos isolados da Seção *Nigri* foram produtores de OTA, em contrapartida, outros autores encontraram resultados divergentes. Pardo et al. (2004), ao estudarem a ocorrência de fungos ocratoxigênicos em grãos de café verde, encontraram 7,3% dos isolados da Seção *Nigri* como produtores de OTA. Em estudos semelhantes realizados por Urbano et al. (2001), os autores constataram que 11,5% dos isolados da Seção *Nigri* foram produtores de OTA. Taniwaki et al. (2014), investigaram a presença de fungos ocratoxigênicos em grãos de café defeituosos em amostras provenientes do cerrado mineiro e de Sorocabana-SP e seu potencial em produzir OTA em meios de cultura, e constataram que 23% dos isolados da Seção *Nigri* foram produtores de OTA.

A. niger foi a espécie de maior incidência entre os isolados da Seção *Nigri* (70,68%) e da Seção *Circumdati*, *A. ochraceus* (50%). Essas espécies têm sido identificadas em outros estudos de frutos e grãos de café (ALVES DA SILVA et al., 2020; GEREMEW et al., 2016; TANIWAKI et al., 2014; NOONIM et al., 2008; BATISTA et al., 2009; PALACIOS-CABRERA et al., 2004; SUÁREZ-QUIROZ et al., 2004; BATISTA et al., 2003).

Diferentes tipos de *Aspergillus* Seção *Nigri* foram relatados em grãos de café de diferentes países em que *A. niger* e *A. carbonarius* ocorreram com mais frequência (TANIWAKI, 2006). Desde a primeira descrição de produção de OTA por *A.niger* (ABARCA et al., 1994), esta espécie vem adquirindo uma maior importância no que diz respeito no teor de OTA em algumas *commodities* alimentares como uvas, vinhos e também no café (CABAÑES; BRAGULAT, 2018).

No presente estudo, pôde-se observar um percentual relativamente alto de cepas de *A. niger* produtoras de OTA, em que 39,5% dos isolados foram produtores, no entanto, em concentrações variando de baixas a moderadas (tabela 6). Esses resultados diferem dos relatos feitos por Noonim et al. (2008), que encontraram apenas 13% dos isolados de *A. niger* como produtores de OTA. A maior contaminação e a alta porcentagem de *A. niger* como produtor da toxina, quando comparadas com dados de outros trabalhos, sugerem que ocorreram condições favoráveis para a produção de OTA (BATISTA et al., 2009; ASTORECA et al., 2009).

Dos isolados pertencentes à *Aspergillus* Seção *Circumdati*, *A. ochraceus* foi a espécie predominante e 100% de isolados foram produtores de OTA. A porcentagem de *A. ochraceus* produtores de OTA encontrada neste estudo foi semelhante à encontrada por Rezende et al. (2013), encontraram 89,55% de *A. ochraceus* com capacidade de produzir OTA. Taniwaki et al. (2003) cujo estudo 75% de *A. ochraceus* foram produtores de OTA.

Embora, neste estudo, os isolados de *A. niger* tenham sido encontrados com maior frequência, a média de concentração de OTA produzida por esses fungos (0,90 µg/g) foi bem menor que a média de concentração de OTA quando comparada por *A. ochraceus* (80 µg/g). Entre os fungos do gênero *Aspergillus* da seção *Circumdati*, *A. ochraceus* é o maior produtor de OTA em café (BATISTA et al., 2009).

De acordo com Paterson et al. (2014), as principais fontes de contaminação por fungos ocratoxigênicos no café são solo, equipamentos e superfícies do pátio de secagem na fase pós-colheita. Correlações entre a incidência de fungos ocratoxigênicos com a OTA em grãos é crucial (BATISTA et al., 2009), tal associação é importante para a adoção de práticas de

manejo que busquem a redução da incidência desses fungos, cuja presença apresenta risco de contaminação por OTA.

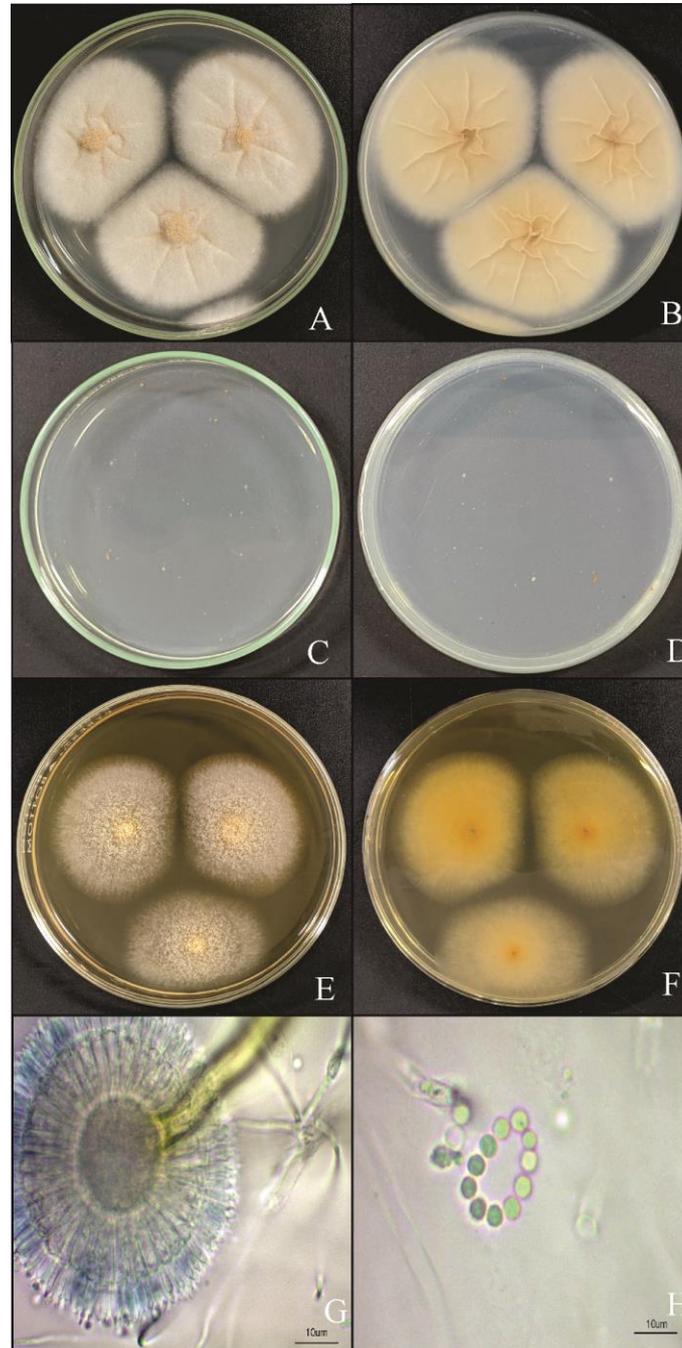
A produção de OTA por fungos do gênero *Aspergillus* é dependente da interação de vários fatores ambientais, juntamente com práticas agrícolas (MÜHLENCOERT et al., 2004). O maior percentual de isolados ocratoxigênicos se deu à amostra A4, proveniente do município de Itaipé-MG, o que pode estar associado com os fatores citados acima.

Tabela 6 - Valores das concentrações de OTA dos isolados.

Amostra	Espécies	Nº de isolados	ND	Isolados ocratoxigênicos	Concentração de OTA µg/g
A1	A	1	0	1	4,040
	B	1	0	1	142,620
A2	C	45	33	12	0,001- 5,0
	C	39	26	13	0,007- 0,340
A3	D	19	11	8	0,010- 2,240
	C	30	6	24	0,011- 92,080
A4	D	11	7	4	0,037-0,195
	E	5	4	1	0,030
A5	A	1	0	1	37,250
	C	19	13	6	0,006-14,733
	D	10	5	5	0,008- 9,240
	A	7	0	7	60,723-95,155
	E	3	2	1	0,096

Legenda: ND – Não detectável; A- *A. ochraceus*; B- *A. westerdijkiae*; C- *A.niger*; D- *A. niger* agregados, E- *Aspergillus*. Sp 5. Fonte: Do Autor (2020).

Figura 19 - Isolado produtor de ocratoxina A isolado de grãos de café proveniente da amostra A1.



Legenda: *A. westerdijkiae*; CYA 25° C frente (A); CYA 25°C reverso; CYA 37°C frente (C); CYA 37°C reverso (D); MEA 25°C frente; MEA 25°C reverso; conidióforo (G) e conídios (H). Produção de OTA: 142, 62646310 µg/g. Fonte: Do autor (2020).

4. CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo demonstram que os cafés cultivados e processados nos municípios de Três Pontas e Machado, embora apresentem maior diversidade de fungos filamentosos, a incidência de fungos ocratoxigênicos nessas áreas é baixa, o que pode estar associado à boas práticas agrícolas.

As condições encontradas no município de Natércia tendem a favorecer o crescimento de *Aspergillus* spp. Os cafés provenientes dos municípios de Itaipé e São Sebastião do Paraíso apresentaram maior incidência de isolados produtores de OTA em concentrações mais altas.

Os isolados de *A. niger* foram os maiores produtores de OTA, embora a média de concentração de OTA produzida por esses fungos tenha sido menor quando comparada com a concentração de OTA produzida por *A. ochraceus*.

A presença de fungos toxigênicos não indica necessariamente a presença de OTA, mas indica um risco potencial. A adoção de diferentes métodos taxonômicos é essencial para uma segura identificação das espécies, contudo, a identificação genética, hoje bastante habitual, torna esta busca mais simplificada, uma vez que há bancos de dados prontamente disponíveis para comparações específicas.

REFERÊNCIAS

- ABARCA, M. L. et al. Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. **Applied and environmental microbiology**, v. 60, n. 7, p. 2650-2652, 1994
- ALVES DA SILVA, S. et al. Fungi associated to beans infested with coffee berry borer and the risk of ochratoxin A. **Food Control**, v. 113, n. February, p. 107204, 2020.
- ASTORECA, A. et al. Ecophysiological factor effect on growth rate, lag phase and ochratoxin A production by *Aspergillus niger* Aggregate strains on irradiated peanut seeds. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 129, n. 2, p. 131-135, Feb. 2009.
- BATISTA, L. R. et al. Ochratoxin A in coffee beans (*Coffea arabica* L.) processed by dry and wet methods. **Food Control**, v. 20, n. 9, p. 784–790, 2009.
- BATISTA, L. R. et al. Toxigenic fungi associated with processed (green) coffee beans (*Coffea arabica* L.). **International Journal of Food Microbiology**, v. 85, n. 3, p. 293–300, 2003.
- BENSON, D. A. et al. GenBank. **Nucleic Acids Research**, v. 41, p. 36-42, 2013.
- BRAGULAT, M. R.; ABARCA, M. L.; CABAÑES, F. J. An easy screening method for fungi producing ochratoxin A in pure culture. **International Journal of Food Microbiology**, v. 71, n. 2–3, p. 139–144, 2001.
- CABAÑES, F. J.; BRAGULAT, M. R. Black aspergilli and ochratoxin A-producing species in foods. **Current Opinion in Food Science**, v. 23, p. 1-10, 2018.
- CHALFOUN, S. M. et al. Antifungal potential of *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries metabolites in reduction of coffee contamination by toxigenic *Aspergillus* genera. **BioMicroWorld**, Lisboa, n. 259, p. 113-117, Dec. 2009.
- CHALFOUN, S.M. Biological control and bioactive microbial metabolites: a coffee quality perspective. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, n. 5, p. 1071-1085, 2010.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO-CONAB. **Primeiro levantamento da safra 2019/2020. Disponível em:** : <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 24 ago. 2020.
- DUARTE, S. C.; PENA, A.; LINO, C. M. A review on ochratoxin A occurrence and effects of processing of cereal and cereal derived food products. **Food Microbiology**, v. 27, n. 2, p. 187–198, 2010.
- GEREMEW, T. et al. Occurrence of toxigenic fungi and ochratoxin A in Ethiopian coffee for local consumption. **Food Control**, v. 69, p. 65–73, 2016.
- GIL-SERNA, J. et al. Revision of ochratoxin A production capacity by the main species of *Aspergillus* section *Circumdati*. *Aspergillus steynii* revealed as the main risk of OTA

contamination. **Food Control**, v. 22, n. 2, p. 343–345, 2011.

Harris, D. C. 2008. Análise química quantitativa, 7th ed. LTC Editora, Rio de Janeiro.
KLICH, Maren A. Identification of common *Aspergillus* species. **Centraalbureau voor schimmelcultures**, 2002.

IAMANAKA, B. T. et al. The mycobiota of coffee beans and its influence on the coffee beverage. **Food Research International**, v. 62, p. 353–358, 2014.

Instituto Nacional de Meteorologia (INMET). **Banco de Dados Meteorológicos para Ensino e Pesquisa** (2020). Disponível em: <<http://www.inmet.gov.br>>. Acesso em: 05 Jul. 2020.

KLICH, Maren A. Identification of common *Aspergillus* species. **Centraalbureau voor schimmelcultures**, 2002.

LIMA, N.; SANTOS, C. MALDI-TOF MS for identification of food spoilage filamentous fungi. **Current Opinion in Food Science**. 13:26–30. 2017.

MORELLO, L. G. et al. Detection and quantification of *Aspergillus westerdijkiae* in coffee beans based on selective amplification of β -tubulin gene by using real-time PCR. **International Journal of Food Microbiology**, v. 119, n. 3, p. 270–276, 2007.

MÜHLENCOERT, E. et al. Production of ochratoxin A by *Aspergillus ochraceus*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 110, n. 5-6, p. 651-659, 2004.

NIELSEN, K. F. et al. Review of secondary metabolites and mycotoxins from the *Aspergillus niger* group. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 395, n. 5, p. 1225-1242, Nov. 2009.

NOONIM, P. et al. Isolation, identification and toxigenic potential of ochratoxin A-producing *Aspergillus* species from coffee beans grown in two regions of Thailand. **International Journal of Food Microbiology**, v. 128, n. 2, p. 197–202, 2008.

OLIVEIRA, M. M. E. et al. Development and optimization of a new MALDI-TOF protocol for identification of the *Sporothrix* species complex. **Research in microbiology**, v. 166, n. 2, p. 102-110, 2015.

OLIVEIRA, G. **Incidência de fungos do gênero *Aspergillus* Seção *Circumdati* e *Nigri* em grãos de café cultivados em Minas Gerais e o efeito in vitro de fatores abióticos no crescimento e na biossíntese de ocratoxina A**. 98p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016.

PALACIOS-CABRERA, H. et al. The production of ochratoxin A by *Aspergillus ochraceus* in raw coffee at different equilibrium relative humidity and under alternating temperatures. **Food Control**, v. 15, n. 7, p. 531–535, 2004.

PALYS, Thomas; NAKAMURA, L. K.; COHAN, Frederick M. Discovery and classification of ecological diversity in the bacterial world: the role of DNA sequence data. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 47, n. 4, p. 1145-1156, 1997.

PARDO, E. et al. Occurrence of ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in green coffee from different origins. **Food Science and Technology International**, London, v. 10, n. 1, p. 45-50, Feb. 2004.

PATERSON, R. R. M.; LIMA, N.; TANIWAKI, M. H. Coffee, mycotoxins and climate change. **Food Research International**, v. 61, p. 1–15, 2014.

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

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

PINHEIRO, A. C. M.; NUNES, C. A.; VIETORIS, V. SensoMaker: a tool for sensorial characterization of food products. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 37, n. 3, p. 199-201, 2013.

PITT, J. I. Toxigenic fungi: which are important?. **Sabouraudia**, v. 38, n. Supplement_1, p. 17-22, 2000.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. 3rd ed. Dordrecht: Springer, 2009. 503 p.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. *Fungi and food spoilage*. Blackie Academic & Professional. **New South Wales, Australia**, 1997.

REZENDE, E. DE F. et al. Enzymatic and toxigenic potential of fungi isolated from coffee beans. **Coffee Science**, v. 8, n. 1, p. 69–77, 2013.

SAMSON, R. A. et al. New taxa in *Aspergillus* Section Usti. **Studies in Mycology**, v. 69, p. 81–97, 2011.

SAMSON, R. A. et al. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. **Studies in Mycology**, v. 78, n. 1, p. 141–173, 2014.

SAMSON, R. A. et al. **Food and Indoor Fungi**. Utrecht (The Netherlands): CBS, 2010.

SAMSON, Robert A. et al. **Introduction to food-and airborne fungi**. Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), 2004.

SHREYA et al. Optimization of culture conditions for extracellular fungal lipase production by submerged fermentation process. **Plant Science Today**, v. 5, n. 3, p. 135-141, 2018.

SIMÕES, M.F. et al. Polyphasic identification and preservation of fungal diversity: Concepts and applications. In: MALIK, A.; GROHMANN, E.; ALVES, M. (Eds.). **Management of Microbial Resources in the Environment**. Netherlands : Ed. Springer, 2013. 530 p.

SILVA, C. F.; BATISTA, L. R.; SCHWAN, R. F. Incidence and distribution of filamentous fungi during fermentation, drying and storage of coffee (*Coffea arabica* L.) beans. **Brazilian**

Journal of Microbiology, v. 39, n. 3, p. 521–526, 2008.

SILVA, C. F. et al. Microbial diversity during maturation and natural processing of coffee cherries of *Coffea arabica* in Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 60, n. 2–3, p. 251–260, 2000.

STACKEBRANDT, EaBMG; GOEBEL, Brett M. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 44, n. 4, p. 846-849, 1994.

SUÁREZ-QUIROZ, M. et al. Study of ochratoxin A-producing strains in coffee processing. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 39, n. 5, p. 501–507, 2004.

TANIWAKI, Marta H. An update on ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in coffee. In: **Advances in food mycology**. Springer, Boston, MA, 2006. p. 189-202.

TANIWAKI, M. H.; PITT, J. I.; MAGAN, N. Aspergillus species and mycotoxins: occurrence and importance in major food commodities. **Current Opinion in Food Science**, v. 23, p. 38–43, 2018.

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**, v. 82, n. 2, p. 173–179, 2003.

TANIWAKI, M. H. et al. Ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in defective coffee beans. **Food Research International**, v. 61, p. 161–166, 2014.

URBANO, G. R. et al. Occurrence of ochratoxin A-producing fungi in raw Brazilian coffee. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 8, p. 1226–1230, 2001.

VILELA, D. M. et al. Molecular ecology and polyphasic characterization of the microbiota associated with semi-dry processed coffee (*Coffea arabica* L.). **Food Microbiology**, v. 27, n. 8, p. 1128–1135, 2010.

VISAGIE, C.M. et al. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. **Studies in Mycology**, v. 78, p. 343-371, 2014.