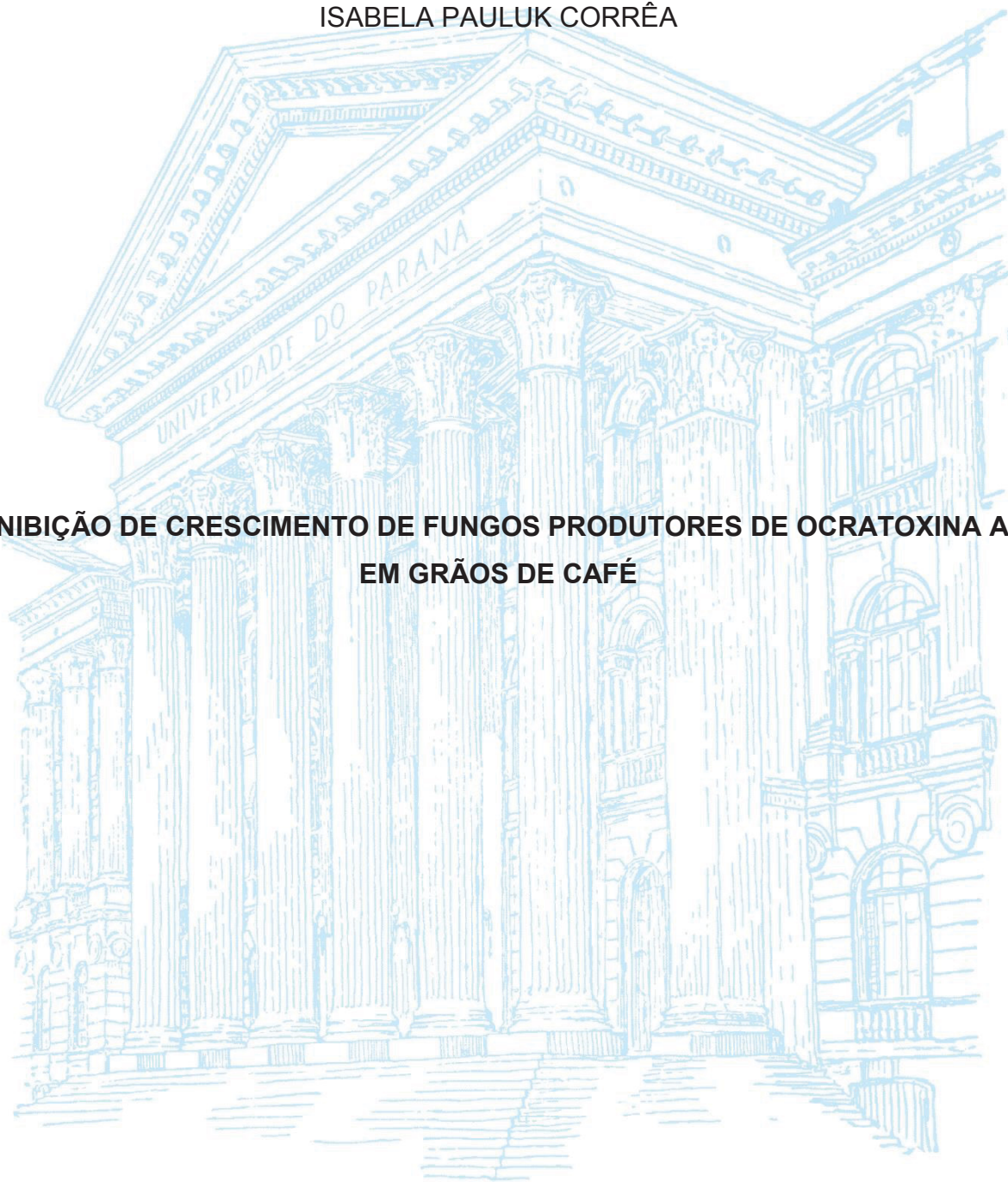


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ISABELA PAULUK CORRÊA

**INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO DE FUNGOS PRODUTORES DE OCRATOXINA A
EM GRÃOS DE CAFÉ**



CURITIBA

2015

ISABELA PAULUK CORRÊA

**INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO DE FUNGOS PRODUTORES DE OCRATOXINA A
EM GRÃOS DE CAFÉ**

Dissertação apresentada como requisito à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ida Chapaval Pimentel

Co-orientadoras: Prof^a. Dr^a. Patricia do Rocio Dalzoto

MSc. Angela Bozza de Almeida

CURITIBA

2015

Corrêa, Isabela Pauluk

Inibição de crescimento de fungos produtores de ocratoxina A em grãos de café. / Isabela Pauluk Corrêa. – Curitiba, 2015.

84 f.: il. ; 30cm.

Orientador: Ida Chapaval Pimentel

Coorientadores: Patricia R. Dalzoto e Angela Bozza de Almeida

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

1. Ocratoxinas 2 Café 3. Levedos 4. Aspergillus I. Título II. Pimentel, Ida Chapaval III. Dalzoto, Patricia do Rocio IV. Almeida, Angela Bozza de V. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

CDD (20. ed.) 589.23



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Patologia Básica
Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

TERMO DE APROVAÇÃO

**“Inibição de crescimento de fungos produtores de Ocratoxina A
em grãos de café.”**

por

ISABELA PAULUK CORRÊA

**Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia,
Parasitologia e Patologia, pela Comissão formada pelos
professores:**

Prof^a. Dr^a. Ida Chapaval Pimentel (presidente)

Prof^a. Dr^a. Lucy Ono

Prof^a. Dr^a. Marcia Regina Beux

Curitiba, 27 de fevereiro de 2015.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e minha irmã pela paciência, dedicação, compreensão e por estarem sempre ao meu lado.

À minha orientadora, Profa. Dra. Ida Chapaval Pimentel, pela confiança, acompanhamento e orientação.

Às minhas co-orientadoras MSc Angela Bozza de Almeida e Profa. Dra. Patricia do Rocio Dalzotto, pelas contribuições, sugestões e acompanhamento nos experimentos.

Aos integrantes do Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (LabMicro) pelo constante apoio e companheirismo.

Aos amigos do LabMicro, Germana, Gheniffer, Mariana e Jason, pela companhia, ajuda e apoio nos momentos difíceis.

A técnica Maria da Graça Toledo, por estar sempre pronta a cooperar.

Ao programa de Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia pela oportunidade.

À CAPES, pelo auxílio financeiro.

RESUMO

A ocratoxina A (OTA) é uma micotoxina produzida pelos fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium*, normalmente encontrada em cereais, uva e café. A OTA é nefrotóxica, neurotóxica, imunossupressora e é considerada um possível causador de câncer em humanos. No Brasil, os principais fungos produtores de ocratoxina A são *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus westerdijkiae*, *Aspergillus carbonarius* e *Aspergillus niger*, sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade de microrganismos isolados de grãos de café na inibição do crescimento e produção de ocratoxina A de espécies de *Aspergillus* sp.. Foram isolados bactérias e fungos filamentosos de grãos de café verde (*Coffea arabica*) provenientes do Instituto Agrônomo do Paraná, inoculando os grãos em placas de Petri contendo meios de cultivo seletivos. Foi testada a capacidade de bactérias, fungos filamentosos e leveduras isolados de grãos de café na inibição de crescimento de *A. ochraceus*, *A. westerdijkiae*, *A. carbonarius* e *A. niger* produtores de OTA. Através da técnica de crescimento radial, as bactérias e leveduras foram capazes de inibir os fungos testados, sendo que a porcentagem de inibição variou de 0% a 100%. Dentre as espécies testadas, *A. westerdijkiae* foi mais suscetível, apresentando porcentagem média de inibição de 78,34% para leveduras e 67,6% para bactérias. As leveduras isoladas de grãos de café foram identificadas a partir do sequenciamento da região ITS do DNA ribossomal como *Pichia anomala*, *Pichia burtonii*, *Pichia caribbica*, *Pichia guilliermondii*, *Aureobasidium pullulans* e *Cryptococcus heveanensis*. Analisando a capacidade de redução da produção de OTA por espécies de *Aspergillus* sp. pelo método de *plug-agar*, encontrou-se que as leveduras isoladas pertencentes ao gênero *Pichia* foram capazes de reduzir em até 100% a produção de OTA das quatro espécies de *Aspergillus* sp. testadas. Por fim, conclui-se que microrganismos isolados de grãos de café possuem potencial inibitório contra as espécies testadas, podendo ser uma alternativa no controle de espécies de *Aspergillus* sp. e ocratoxina A em alimentos.

Palavras-chave: Ocratoxina A. Inibição de crescimento. Café. Leveduras. Bactérias. *Aspergillus ochraceus*. *Aspergillus niger*. *Aspergillus westerdijkiae*. *Aspergillus carbonarius*.

ABSTRACT

Ochratoxin A (OTA) is a mycotoxin produced by fungi of the genus *Aspergillus* and *Penicillium*, usually found in cereals, grapes and coffee. OTA is nephrotoxic, neurotoxic, immunosuppressive and is considered a possible cause of human cancer. In Brazil, the main producers of OTA are *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus westerdijkiae*, *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus niger*, so the aim of this study was to evaluate the ability of microorganisms isolated from coffee beans in inhibiting the growth and OTA production from *Aspergillus* species. It was isolated bacteria and filamentous fungi from green coffee beans (*Coffea arabica*) from the Agronomic Institute of Paraná, inoculating beans in Petri dishes containing the specific culture media. It was tested the ability of bacteria, yeast and fungi isolated from green coffee beans to inhibit the growth of OTA producers *A. ochraceus*, *A. westerdijkiae*, *A. carbonarius* and *A. niger*. The bacteria and yeast were able to inhibit the fungi tested, the inhibition percentage ranged from 0% to 100%. Among the tested species, *A. westerdijkiae* was more susceptible, with inhibition mean percentages of 78,34% for yeast and 67,6% for bacteria. Yeasts isolated from green coffee beans it was identified from sequencing of the ribosomal DNA ITS region as *Pichia anomala*, *Pichia burtonii*, *Pichia caribbica*, *Pichia guilliermondii*, *Aureobasidium pullulans* and *Cryptococcus heveanensis*. Analysing the ability of reduction of OTA production by yeasts using the *plug-agar* method, it was found that the yeasts belonging to the genus *Pichia* could reduce OTA production up to 100% of the four *Aspergillus* species tested. Finally, it is concluded that microorganisms isolated from coffee beans have inhibitory potency against the species tested, and may be an alternative to control of species of *Aspergillus* and ochratoxin A in foods.

Key-words: Ochratoxin A. Growth Inhibition. Coffee. Yeast. Bacteria. *Aspergillus ochraceus*. *Aspergillus niger*. *Aspergillus westerdijkiae*. *Aspergillus carbonarius*.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ESTRUTURA GERAL DAS OCRATOXINAS.....	20
FIGURA 2 - ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS E FUNGOS NOS GRÃOS DE CAFÉ...	27
FIGURA 3 - MICROMORFOLOGIA DAS BACTÉRIAS ISOLADAS DOS GRÃOS DE CAFÉ, PELA COLORAÇÃO DE GRAM.	31
FIGURA 4 - FUNGOS ISOLADOS DOS GRÃOS DE CAFÉ EM MEIO DE CULTURA ÁGAR SABOURAUD INCUBADOS A 28°C ±0,5°C POR 7DIAS.....	39
FIGURA 5 - TESTES DE INIBIÇÃO DE <i>Aspergillus</i> seção <i>Circumdati</i> PELA BACTÉRIA 113-2 A1 (MORFOTIPO 14).....	43
FIGURA 6 - TESTES DE INIBIÇÃO DE <i>Aspergillus</i> seção <i>Nigri</i> PELA BACTÉRIA 113-2 A1 (MORFOTIPO 14).....	44
FIGURA 7 - TESTES DE INIBIÇÃO DE <i>Aspergillus</i> seção <i>Circumdati</i> PELA LEVEDURA <i>Pichia anomala</i> (CAT 1 L1).	49
FIGURA 8 - TESTES DE INIBIÇÃO DE <i>Aspergillus</i> seção <i>Nigri</i> PELA LEVEDURA <i>Pichia anomala</i> (CAT 1 L1).....	50
FIGURA 9 - TESTE DE INIBIÇÃO DE <i>Aspergillus carbonarius</i> POR <i>Aspergillus</i> seção <i>Circumdati</i> (107 3 F3).....	55
FIGURA 10 - TESTE DE INIBIÇÃO DE <i>Aspergillus ochraceus</i> PELO FUNGO <i>Mucor</i> sp. (176 1 B2)	55

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - ESTRUTURA DOS ANÁLOGOS DA OTA	21
TABELA 2 - LEVEDURAS ISOLADAS DOS GRÃOS DE CAFÉ IDENTIFICADAS A PARTIR DO SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO ITS.....	34

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - PORCENTAGENS DE INIBIÇÃO DE <i>A.westerdijkiae</i> POR BACTÉRIAS.	46
GRÁFICO 2 - PORCENTAGENS DE INIBIÇÃO DE <i>A.ochraceus</i> POR BACTÉRIAS.	47
GRÁFICO 3 - PORCENTAGENS DE INIBIÇÃO DE <i>A.niger</i> POR BACTÉRIAS.	47
GRÁFICO 4 - PORCENTAGENS DE INIBIÇÃO DE <i>A.carbonarius</i> POR BACTÉRIAS.	48
GRÁFICO 5 - PORCENTAGENS DE INIBIÇÃO DOS TESTES DE INIBIÇÃO DE LEVEDURAS CONTRA <i>A.westerdijkiae</i>	51
GRÁFICO 6 - PORCENTAGENS DE INIBIÇÃO DOS TESTES DE INIBIÇÃO DE LEVEDURAS CONTRA <i>A.ochraceus</i>	51
GRÁFICO 7 - PORCENTAGENS DE INIBIÇÃO DOS TESTES DE INIBIÇÃO DE LEVEDURAS CONTRA <i>A.niger</i>	52
GRÁFICO 8 - PORCENTAGENS DE INIBIÇÃO DOS TESTES DE INIBIÇÃO DE LEVEDURAS CONTRA <i>A.carbonarius</i>	52
GRÁFICO 9 - PORCENTAGENS DE REDUÇÃO DA PRODUÇÃO DE OTA DE <i>A. westerdijkiae</i> POR LEVEDURAS.....	57
GRÁFICO 10 - PORCENTAGENS DE REDUÇÃO DA PRODUÇÃO DE OTA DE <i>A. ochraceus</i> POR LEVEDURAS	58
GRÁFICO 11 - PORCENTAGENS DE REDUÇÃO DA PRODUÇÃO DE OTA DE <i>A. niger</i> POR LEVEDURAS.....	58
GRÁFICO 12 - PORCENTAGENS DE REDUÇÃO DA PRODUÇÃO DE OTA DE <i>A. carbonarius</i> POR LEVEDURAS	59

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	13
2.	OBJETIVOS	15
2.1	OBJETIVO GERAL.....	15
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
3.1	MICOTOXINAS	16
3.2	OCRATOXINA A	18
3.3	CAFÉ.....	23
4.	MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1	MATERIAL BIOLÓGICO	26
4.2	ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS DE GRÃOS DE CAFÉ.....	26
4.3	IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS.....	27
4.4	TESTES DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO DE FUNGOS PRODUTORES DE OCRATOXINA A POR MICRORGANISMOS.....	27
4.4.1	Fungos	27
4.4.2	Bactérias e leveduras.....	28
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	28
4.6	IDENTIFICAÇÃO POR BIOLOGIA MOLECULAR DOS MICRORGANISMOS QUE APRESENTARAM ATIVIDADE INIBITÓRIA.....	29
4.7	TESTE DE REDUÇÃO DA PRODUÇÃO DE OCRATOXINA A EM <i>Aspergillus</i> sp.	30
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1	ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS	31
5.1.1	Isolamento de bactérias	31
5.1.2	Isolamento de leveduras	33
5.1.3	Isolamento de actinobactérias.....	37
5.1.4	Isolamento de fungos	38
5.2	RELAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE OCRATOXINA A ENCONTRADA NOS GRÃOS DE CAFÉ COM OS FUNGOS ISOLADOS DOS MESMOS	41
5.3	TESTE DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO DE FUNGOS PRODUTORES DE OCRATOXINA A POR MICRORGANISMOS.....	42
5.3.1	Bactérias	42

5.3.2	Leveduras.....	48
5.3.3	Fungos	54
5.4	TESTE DE REDUÇÃO DA PRODUÇÃO DE OCRATOXINA A EM ESPÉCIES DE <i>Aspergillus</i>	57
6.	CONCLUSÕES	61
	REFERÊNCIAS	62
	APÊNDICES	75

1. INTRODUÇÃO

A Organização Mundial da Saúde reconhece que as micotoxinas são um problema de saúde pública e destaca a necessidade de ações para combatê-las (STROSNIDER, 2006; WILD; GONG, 2010).

Uma das micotoxinas que gera problemas na agricultura é a ocratoxina A (OTA), produzida por fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* (EFSA, 2006). Contaminando alimentos como cereais, uvas e café, antes e após a colheita, é resistente a altas temperaturas, tornando seu controle difícil. Diversos locais já possuem legislações que limitam a concentração da OTA em alimentos, como a União Européia (níveis máximos de OTA em café torrado (5µg/Kg) e solúvel (10µg/Kg)) e o Brasil (limite de OTA em café torrado e solúvel: 10µg/Kg) (FAO, 2006; FAO, 2015).

O café é um dos produtos mais importante no mercado mundial, principalmente em países em desenvolvimento. Em 1996 em uma conferência da *International Life Sciences Institute* (ILSI), foi relatada a ocorrência de várias amostras de café contaminadas com a ocratoxina A. Um estudo mais aprofundado nesta área mostrou que a torrefação do café não é capaz de eliminar completamente essa micotoxina. Ainda, na década de 90, o Comitê Misto FAO-OMS de Peritos em Aditivos Alimentares (JECFA) concluiu que a OTA é nefrotóxica e possivelmente cancerígena aos humanos (EFSA, 2006; FAO, 2015; IARC, 1993).

Silva *et al.* (2000), pesquisaram a microbiota dos frutos maduros do café na fase inicial de secagem, os autores verificaram que a mucilagem era um importante substrato a microrganismos contaminantes, pois esta apresenta fontes de carbono e nitrogênio. Foram isolados microrganismos dos grãos do café no estágio cereja, onde a quantidade destes foi alta, dentre os principais isolados estavam fungos filamentosos, bactérias e leveduras.

Pesquisas relacionadas com a inibição de fungos possivelmente produtores de OTA já foram realizadas, como por exemplo, Kapetanakou *et al.* (2012) que testou a inibição de *Aspergillus carbonarius* e a redução da produção de OTA, por leveduras e bactérias isoladas da fermentação de diversos produtos de origem animal e vegetal. Os resultados mostraram que nenhuma bactéria foi eficaz na inibição de *A. carbonarius*, enquanto que as leveduras se mostraram capazes de inibi-lo. A diminuição da produção de OTA não foi realizada de maneira eficaz nas bactérias

(decrécimo variou de 2 a 25%) já as leveduras apresentaram uma grande diminuição de OTA (65%).

Portanto, o objetivo do presente trabalho foi testar a capacidade inibitória de microrganismos isolados de grãos de café frente a fungos potencialmente produtores de ocratoxina A e testar a capacidade destes microrganismos na redução da produção desta micotoxina.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a capacidade de inibição do crescimento e produção de ocratoxina A de espécies de *Aspergillus* sp. por microrganismos isolados de grãos de café verde (*Coffea arabica*).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar e identificar fungos filamentosos, leveduras, bactérias (incluindo actinobactérias) de grãos de café, a partir de macro e micromorfologia;
- Correlacionar a concentração de ocratoxina A encontrada nos grãos de café com os fungos isolados dos mesmos;
- Testar o potencial inibitório de microrganismos isolados de grãos de café frente a espécies de *Aspergillus* produtoras de OTA;
- Identificar, através de sequenciamento de regiões específicas, os microrganismos que apresentarem ação de inibição dos fungos produtores de ocratoxina A;
- Testar o potencial de redução da produção de OTA por *Aspergillus* sp., utilizando microrganismos isolados de grãos de café.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 MICOTOXINAS

Micotoxinas são metabólitos secundários produzidos pelos fungos do gênero *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* em condições de estresse, podendo ser produzidas durante a armazenagem em resposta a uma alteração de pH, ou adição de H₂O₂ (ABRUNHOSA, 2008; TURNER; SUBRAHMANYAM; PILETSKY, 2009; SUBRAMANIAM; RAMPITSCH, 2013). Elas podem ocorrer em qualquer local do planeta, já que os fungos que as produzem estão presentes em diversos alimentos como, cereais, nozes, amendoim, frutas, café, cacau, especiarias, podendo também ser encontradas em produtos acabados como cerveja e no vinho, quando estes são produzidos por cevada e uva contaminados (TURNER; SUBRAHMANYAM; PILETSKY, 2009). As micotoxinas são resistentes ao cozimento, congelamento e digestão (MATSUDA *et al.*, 2013), por isso são um problema de saúde pública, podendo causar danos aos humanos e outros animais (TURNER; SUBRAHMANYAM; PILETSKY, 2009).

A severidade dos problemas causados por essas depende da quantidade de toxina ingerida, da idade do indivíduo, seu estado nutricional e se há um sinergismo entre a micotoxina e outros compostos químicos com os quais esta pode entrar em contato (ABRUNHOSA, 2008; PERAICA, 1999). Quando são ingeridas em pequenas doses por um longo período, elas são capazes de gerar doenças crônicas e tumores em órgãos vitais (ABRUNHOSA, 2008).

Desde a idade média as micotoxinas já causavam diversos transtornos para a população, naquela época o ergotismo ou fogo de Santo Antônio gerava epidemias na Europa. Esta doença é causada pelos alcaloides do esporão-do-centeio (*Claviceps purpurea*), a dietilamida do ácido lisérgico (LSD), que era produzida durante a panificação quando utilizado trigo contaminado, causando sensação de queimação, danos no sistema nervoso central e gangrena. (PERAICA, 1999; VAN DONGEN; DE GROOT, 1995). Já na década de 60, ocorreu um surto de micotoxicose em perus, e este estava relacionado com aflatoxina. Este caso, intitulado doença X dos perus ocorreu na Inglaterra, onde os perus se alimentavam com amendoim contaminado com *A. flavus* e *A. parasiticus* proveniente do Brasil, assim iniciaram-se os estudos em micotoxicologia, com a avaliação dos efeitos da aflatoxina. Relatos na literatura

indicam que surtos causados por micotoxinas são mais comuns na área veterinária, já que a alimentação dos animais é baseada quase totalmente em grãos (PERAICA, 1999; SARGEANT; SHERIDAN; OKELLY, 1961).

As micotoxinas compõem aproximadamente 700 compostos químicos (TURNER; SUBRAHMANYAM; PILETSKY, 2009), entretanto apenas 20 dessas são de interesse, podendo causar surtos alimentares e doenças (ABRUNHOSA, 2008). Várias delas são potencialmente carcinogênicas, como a zearalenona, ocratoxina A, fumonisina e aflatoxina (BENNETT E KLICH, 2003).

A aflatoxina é uma substância causadora de carcinoma hepatocelular, sendo classificada no grupo 1 segundo a IARC (cancerígena para humanos). É produzida principalmente pelos fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, sendo classificada em B1, B2, G1, G2 e M1. A aflatoxina M1 é um metabólito da aflatoxina, excretado no leite de animais que se contaminaram com a aflatoxina B1. O fungo *A. flavus* é comumente encontrado em locais de clima temperado quente, como Estados Unidos e Austrália, e por ser o produtor de uma toxina amplamente conhecida ele é o fungo de importância alimentar mais relatado, sendo encontrado principalmente em milho, amendoim e algodão (IARC, 2002).

A Citrinina é produzida por fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium*, e foi inicialmente isolada do fungo *Penicillium citrinum*, causadora da doença do arroz no Japão (SAITO; ENOMOTO E TATSUNO, 1971; BENNETT E KLICH, 2003). É uma nefrotoxina, encontrada em alimentos como trigo, aveia, milho e arroz (BENNETT E KLICH, 2003).

Os alcalóides do ergot são produzidos por fungos do gênero *Claviceps*, encontrados comumente em espécies gramíneas e no trigo. Tem seus efeitos colaterais bem elucidados, sendo estes usados na produção de medicamentos, por exemplo, o Methergin, medicamento para o controle de hemorragias após o parto e também na síntese de droga alucinógena, o LSD (BENNETT E KLICH, 2003).

A Fumonisina é uma micotoxina produzida por fungos do gênero *Fusarium*, sendo seu principal produtor o *Fusarium verticillioides*, contaminante de todas as espécies de milho (MARSHALL, 1983). Pode causar edema pulmonar, hepatotoxicidade, câncer, apoptose no fígado de diversos animais (HARRISON *et al.*, 1990; GELDERBLOM *et al.*, 1988; POZZI *et al.*, 2000).

A Patulina, isolada do *Penicillium patulum*, é produzida por fungos do gênero *Penicillium* e *Aspergillus*. Esta micotoxina é conhecida por apresentar atividade

antibacteriana, antiviral e antiprotozoária, porém é tóxica em plantas e animais (CIEGLER, 1976). Também é produzida pelo fungo *Penicillium expansum*, causador do bolor azul em maçãs e peras é encontrado em suco de maçã e cidra, tendo o limite estabelecido em alimentos de 0,4 mg/Kg. (TRUCKSESS e TANG, 2001; BENNETT E KLICH, 2003).

A Zearalenona, produzida por *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium equiseti* e *Fusarium crookwellense* é encontrada em cereais. Seus efeitos variam de síndrome de hiperestrogenismo a aborto em porcos (HENDRICKSE, 1997). Um derivado da zearalenona, o zearalenol aumenta a atividade do estrogênio, conhecido como micoestrogênio, sendo sintetizado e utilizado no tratamento de sintomas da menopausa e em contraceptivos orais (HIDY *et al.*, 1977; BENNETT E KLICH, 2003). Sua toxicidade é baixa, com DL50 de 10.000 mg/Kg em ratos, estudos epidemiológicos do Canadá e Escandinávia indicam que o risco desta micotoxina em humanos é mínimo, com dose recomendada máxima diária de 0,05 g/Kg (KUIPER-GOODMAN, SCOOT E WATANABE, 1987). Porém não se deve ignorar que a zearalenona é uma micotoxina, e pode causar danos à saúde (BENNETT E KLICH, 2003).

Vários países já possuem legislações que regulam a quantidade máxima de micotoxinas nos alimentos. Para evitá-las é necessário se ter um controle restrito dos alimentos e da armazenagem dos grãos, pois as micotoxicoses podem ocorrer tanto em países industrializados quanto em desenvolvimento, surgindo quando condições ambientais, sociais e econômica são combinadas com condições meteorológicas (umidade e temperatura) favorecendo o crescimento fúngico. (PERAICA, 1999).

3.2 OCRATOXINA A

A ocratoxina A (OTA) é uma micotoxina produzida por fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* (EFSA, 2006), que são agentes de biodeterioração (TURNER; SUBRAHMANYAM; PILETSKY, 2009). A OTA foi descoberta na década de 60 (SHOTWELL; HESSELTINE; GOULDEN, 1969), durante aquela época, achava-se que apenas o *A. ochraceus* era o produtor de ocratoxina A (SHOTWELL; HESSELTINE; GOULDEN, 1969; VAN DER MERWE; STEYN; FOURIE, 1965).

Em locais com clima temperado (temperatura ótima 15-25°C) *Penicillium verrucosum* é o principal produtor de ocratoxina A, já em locais com o clima

tropical (temperatura ótima 25-30°C), existem vários produtores de OTA como *Aspergillus ochraceus* e o *Aspergillus westerdijkiae* (ABRUNHOSA; PATERSON; VENÂNCIO, 2010; MITCHELL *et al.*, 2004; RAMOS *et al.*, 1998).

Pesquisas já mostraram os efeitos da OTA em animais, sabe-se que esta toxina é rapidamente absorvida, e atinge o sistema circulatório, onde se liga a albumina sérica, esta ligação faz com que o complexo albumina-OTA circule por todo o corpo e se deposite nos tecidos (EFSA, 2006; GALTIER; ALVINERIE; CHARPENTEAU, 1981). A distribuição da OTA no corpo de ratos ocorre primeiramente nos rins, depois fígado, músculos e tecidos gordurosos (HARWIG *et al.*, 1982). Nos humanos, a eliminação da OTA é renal, enquanto que em roedores é biliar, esta característica pode ser o motivo pelas diferenças nos parâmetros cinéticos de diferentes espécies (EFSA, 2006; DIETRICH; HEUSSNER; O'BRIEN, 2005). A OTA é facilmente acumulada no sistema circulatório, fígado, tecido adiposo e muscular, e pode ser transferida se consumido carne ou outros alimentos de origem animal contaminados (SCHLATTER; STUDER-ROHR; RÁSONYI, 1996 *apud* TURNER; SUBRAHMANYAM; PILETSKY, 2009).

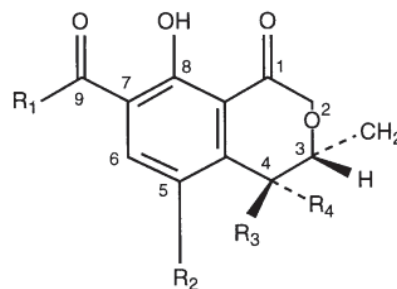
Em animais não ruminantes a OTA é nefrotóxica, isso ocorre, pois ela se acumula nos rins, onde irá causar danos como na doença conhecida como nefropatia endêmica dos Balcãs, doença que afetou a população da região dos Balcãs (Bulgária, Iugoslávia e Romênia), onde vários membros da mesma família apresentaram carcinoma de pelve renal, de ureter e bexiga. Pessoas que viviam nestas regiões na década de 80 tinham 90 vezes mais chance de desenvolver estes tipos de câncer. A hipótese de que a causa para essa grande ocorrência de câncer que ocorria nestas regiões se dá a presença da micotoxina em grande quantidade em alimentos como cereais e carne suína na Iugoslávia, enquanto que na Bulgária, 65% dos cereais consumidos estavam contaminados com OTA. Além destes dados, foi analisada a presença de OTA ligada à albumina sérica em moradores da Iugoslávia, encontrando a presença desta em muitos habitantes (PFOHL-LESZKOWICZ, 2009; KHOURY; ATOUI, 2010; RIBELIN; FUKUSHIMA; STILL, 1978; EFSA, 2006; DE CERAIN *et al.*, 2002; MEETING REPORT, 1987).

A OTA é classificada no grupo 2B da Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC), ou seja, é um possível causador de câncer em humanos. Pesquisas

concluem que os efeitos cancerígenos da OTA ocorrem devido a sua hepatotoxicidade e aos danos no DNA (IARC, 1993; MATSUDA *et al.*, 2013).

Li *et al.* (1997) estudaram a farmacocinética da ocratoxina A, trabalhando com os análogos da OTA, OTB (OTA sem cloro), OTC (OTA com etil éster), OT α (OTA sem fenilalanina), OTA-OH (ocratoxina A hidroxilada) e OTA-OP (OTA com anel de lactona aberto) (FIGURA 1 e TABELA 1). Eles determinaram a meia vida destas substâncias e a sua depuração (renal, biliar e total), injetando a toxina em ratos e coletando seu sangue, bile e urina. Revelaram que a meia vida da OTA e da OTA-OP no sangue é de 160 minutos, enquanto que a meia vida da OT α é de 31 minutos, OTA-OH é de 19 minutos e OTB de 14 minutos. A depuração renal da OTA foi de 1,49 ml/hr por kg, e a depuração total do corpo de 3,11 ml/hr por kg, enquanto que para a OT α os valores foram 20,7 ml/hr por kg na depuração renal e 39,9 ml/hr por kg na depuração total. Isto mostra que o metabolismo de derivados da OTA menos tóxicos é rápido, mostrando uma relação diretamente proporcional entre depuração e a meia vida da toxina no sangue dos ratos. O estudo ainda mostrou que a depuração da OTA, OT α e OTB é extremamente renal, enquanto que a OTA-OH é excretada via biliar. Mostram também que a OTA é excretada como OT α .

FIGURA 1 - ESTRUTURA GERAL DAS OCRATOXINAS



FONTE: Li *et al.* (1997)

TABELA 1 – ESTRUTURA DOS ANÁLOGOS DA OTA

Nome comum	Abreviação	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
Ocratoxina A	OTA	Fenilalanina	Cl	H	H	H
Ocratoxina B	OTB	Fenilalanina	H	H	H	H
Ocratoxina C	OTC	Fenilalanina	Cl	H	H	H
Ocratoxina alfa	OT α	OH	Cl	H	H	H
Ocratoxina beta	OT β	OH	H	H	H	H
Ocratoxina hidroxilada	OTA-OH	Fenilalanina	Cl	H	OH	H
Ocratoxina com anel de lactona aberto	OTA-OP	Fenilalanina	Cl	-	-	-

FONTE: Li *et al.* (1997)

Pássaros que se alimentam com produtos contaminados pela OTA podem transmitir a toxina aos seus ovos (JUSZKIEWICZ *et al.*, 1982). Ratas nutrizas tratadas com uma dose de OTA superior a 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ excretaram de 0,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a 0,7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ da toxina em seu leite (BREITHOLTZ-EMANUELSSON *et al.*, 1994). A DL50 da OTA em ratos via oral é de 46 a 58 mg/kg , e em cães é de 0,2 mg/kg (MOROI *et al.*, 1985).

Estudos realizados por Munro *et al.* (1974) que alimentaram ratos com diversas concentrações de OTA, analisaram que em baixas concentrações a toxina causa retardação do crescimento, redução do apetite e aumento da uréia sérica. Em concentrações altas a OTA causou aumento dos rins e lesões, aumento do volume da urina, além de eosinofilia e cariomegalia nas células do túbulo proximal.

A ocratoxina A é encontrada, na sua grande maioria em cereais, que muitas vezes são utilizados na alimentação de animais. Uma maneira básica de evitar a contaminação dos alimentos pela OTA é fazer a sua prevenção pós-colheita, visando que na agricultura não são realizadas ações para se evitar a proliferação de fungos produtores de OTA (EFSA, 2006; MINERVINI *et al.*, 2013; BATTACONE; NUDDA; PULINA, 2010).

Produtos que podem ser frequentemente contaminados pela OTA são, além dos cereais, o café, vinho, suco de uva, frutas secas (p. ex. figo seco e uvas passas) e condimentos. Sendo assim, a concentração máxima de OTA, de acordo com a legislação de vários países, não ultrapassa 10 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ (EFSA, 2006; TURNER; SUBRAHMANYAM; PILETSKY, 2009; NAEBPOOR; MOMENI; DEHKORDI, 2013). Stander e Steyn (2002) analisaram a presença de OTA por CLAE em 122 amostras de vinho produzido na África do Sul. A maior parte das amostras apresentou níveis de OTA abaixo do limite estabelecido pela União Europeia, apenas dois vinhos tiveram concentração de OTA acima do estabelecido, sendo estes produzidos com uvas velhas.

A OTA presente no café está relacionada com as condições de pós-colheita e armazenagem, assim como com processos de secagem e transporte (DURAND *et al.*, 2013). Vários autores já relataram a presença de OTA no café, Almeida *et al.* (2007), encontraram essa toxina em diversas amostras de café solúvel (82 amostras) com concentrações variando de 0,17 a 6,29 ng/g em 81 amostras positivas, mostrando assim a importância de um controle rígido de produção e a necessidade de metodologias rápidas para a detecção da mesma.

A presença de OTA no café tipo exportação foi avaliada por Gollücke, Taniwaki e Tavares (2004), trabalhando com 37 amostras de café verde, foi analisada por CLAE a concentração de OTA, que variou de 0,16 ng/g a 6,24 ng/g, sendo que 97% das amostras tiveram nível de OTA abaixo de 5 ng/g. Os resultados indicaram que há uma relação inversamente proporcional entre a qualidade dos grãos e a concentração de OTA nas mesmas, sendo assim o café tipo exportação (alta qualidade) apresentou uma concentração de OTA abaixo do estabelecido na legislação europeia. Taniwaki *et al.* (2014) isolaram fungos de grãos de café de dois estados brasileiros (São Paulo e Minas Gerais), e testaram a produção de OTA dos fungos *Aspergillus westerdijkiae*, *A. carbonarius*, *Aspergillus* seção *Nigri* e *Aspergillus* seção *Circumdati* através da técnica de *plug-agar*. Foram isolados *A. westerdijkiae* e *Aspergillus* seção *Nigri* das amostras das duas regiões, e *A. carbonarius* apenas no café de Minas Gerais (café com alta qualidade). A OTA foi produzida por todos os isolados de todos os tipos de grãos de café (verde, preto-verde, preto e ardido) de *A. carbonarius* e *A. westerdijkiae*. Enquanto que a produção de OTA por *Aspergillus* seção *Nigri* variou de 0 a 23% e de 54 a 100% em *Aspergillus* seção *Circumdati*.

A capacidade de produção de OTA por fungos presentes nos grãos de café foi analisada por Rezende *et al.* (2013), que isolou fungos dos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*, destes, 39 da seção *Circumdati* e 99 da seção *Nigri*. O potencial toxigênico foi avaliado pelo método de *plug-agar*, onde apenas um isolado de *Aspergillus* seção *Nigri* foi produtor de ocratoxina A, enquanto que dos isolados da seção *Circumdati*, todos os fungos *A. ochraceus*, *Aspergillus ostianus* e *A. westerdijkiae* foram produtores de OTA.

Gil-Serna *et al.* (2011) testou a capacidade de produção de ocratoxina A dos *Aspergillus* da seção *Circumdati*, *A. ochraceus*, *Aspergillus elegans*, *Aspergillus steynii* e *A. westerdijkiae* isoladas de várias matrizes alimentares em

diversos países. Após análises por CLAE, constatou-se que o *A. steynii* produziu mais OTA que o *A. westerdijkiae*, que, até o momento da publicação do trabalho, era apontado como o maior produtor de ocratoxina A. Sendo assim, essas duas espécies representam um risco potencial para a contaminação de OTA, já que estas podem contaminar diversas espécies alimentares. Os mesmos pesquisadores em 2014 avaliaram a capacidade ocratoxigênica dos fungos *A. westerdijkiae* e *A. steynii* isolados de grãos de café e uva, respectivamente. Os fungos cresceram em meio café verde sob diferentes condições de temperatura (23, 28, 32, 37, 42 °C) e atividade de água (0.89, 0.91, 0.93, 0.95, 0.97, 0.99). Os resultados mostram que o *A. steynii* conseguiu crescer e produzir OTA em condições mais extremas que o *A. westerdijkiae*, porém nenhum dos fungos cresceu em baixa atividade de água (0,89), mostrando que para prevenir o surgimento de OTA no café é necessário manter a atividade de água dos grãos baixa.

3.3 CAFÉ

O café é o segundo produto mais exportado por países em desenvolvimento. O Brasil é o maior produtor de café arábica, rico em sabor e óleos aromáticos (ABIC, 2015). Existem duas formas de processamento de café, a via úmida, onde são retiradas a casca e a mucilagem da cereja com o auxílio de água e seguida de fermentação, lavagem e secagem e a via seca. Na via seca, após a colheita do café, este passa pelo processo de abanação, para remover impurezas grandes que podem estar junto com os grãos. Em seguida o café é lavado, e então são separados os grãos cereja e verde dos boia (passa e seco). Depois os grãos de boa qualidade (cereja e verde) vão para os terreiros para o processo de secagem, ou para secadores mecânicos. Na secagem em terreiro os grãos são espalhados e ficam em exposição ao sol, nesta etapa dependendo das condições climáticas pode ocorrer o reumedecimento dos grãos, por isso os grãos devem ser espalhados em camadas finas, ser protegidos da chuva e sereno. Os grãos devem ser revolvidos por no mínimo 10 vezes ao dia para a secagem ser mais rápida evitando o crescimento fúngico. A secagem dura de 10 a 20 dias, e no final do processo a umidade dos grãos deve ser de 11 a 13%.

Após passar pelo processo de secagem o café é armazenado, em tulhas geralmente de madeira, onde são reduzidas as variações de temperatura, garantindo a qualidade do café, cada metro cúbico da tulha comporta até 10 sacos de café. O

café é preferencialmente armazenado sem passar pelo processo de beneficiamento (retirada das cascas e separação dos grãos, para obtenção do fruto seco, o café beneficiado ou café verde), a fim de conservar mais as características do produto. O produto é armazenado nas tulhas por no mínimo 30 dias, com temperatura média de 20°C, a luminosidade do ambiente também deve ser controlada, para evitar o branqueamento do fruto. No beneficiamento do café ocorre a eliminação das cascas e a separação dos grãos de impurezas. O café beneficiado é armazenado em sacas de aniagem ou junta em local arejado e sem contato direto com o sol. Após o beneficiamento o café é novamente armazenado, podendo este ficar em sacos de junta ou silos, esta armazenagem pode durar até 3 anos (EMBRAPA, 2004).

Estudos mostraram que a mucilagem do café pode ser um bom substrato para diversos microrganismos. A contaminação ocorre principalmente durante o processamento do café pela via seca, na qual a mucilagem não é retirada antes do armazenamento (SILVA *et al.*, 2000). Diversos pesquisadores analisaram a microbiota do café, dentre eles, Nayak *et al.* (2012) que isolou uma bactéria da polpa do café, a *Brevibacterium* sp., coco Gram positivo capaz de degradar a cafeína. De Barros e Juliatti (2012) isolaram fungos patogênicos ao café, encontrando as espécies *Colletotrichum* sp., *Fusarium* sp. e *Cercospora* sp.. Vilela *et al.* (2010) trabalhando com amostras de café arábica, isolaram 382 leveduras, sendo a maioria, *Pichia anomala*, *Torulaspota delbrueckii* e *Rhodotorula mucilaginosa*, todas encontradas durante a fermentação do café.

Ainda, Pardo *et al.* (2004) analisaram a microbiota e a presença de OTA em 57 amostras de café (41 arábica e 16 robusta) coletadas de diversas regiões do mundo, os autores encontraram fungos do gênero *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Rhizopus*, sendo os fungos *Aspergillus* seção *Nigri* os mais isolados nos dois tipos de café (67,4% café arábica e 86,9% café robusta). A média de concentração de OTA analisada foi de 6,7 µg/kg, com valores variando de 1,3 a 31,5 µg/kg para café arábica e 6,1 µg/kg com valores variando de 1,7 a 23,3 µg/kg para café robusta. Apenas 59,7% das amostras tiveram uma concentração de OTA abaixo de 5 µg/kg (o limite estabelecido para a União Europeia), ainda, foi determinado que amostras provenientes da África apresentaram maiores níveis de OTA do que o café da Ásia e América.

Nganou *et al.* (2014) isolaram microrganismos de café processados pelas vias seca e úmida em diferentes estágios de crescimento. Na safra de 2010 isolaram 70%

de *Aspergillus* spp. potencialmente produtores de OTA no café processado por via seca, sendo 20% *A. carbonarius*, 35% *Aspergillus niger* e 6% *A. ochraceus*. Ainda isolaram 60% de *Aspergillus* spp. em café processado por via úmida, destes 15% *A. carbonarius*, 40% *A. niger* e 2% *A. ochraceus*. Couto *et al.* (2014), isolaram fungos de grãos de café cultivados no sistema orgânico e tradicional, utilizando 18 amostras, foram isolados 346 fungos que pertencem a 32 espécies e 14 gêneros, dentre eles *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, entre outros, sendo isolado *A. flavus* e *A. ochraceus*, fungos importantes por sua toxicidade. Do café cultivado no sistema orgânico foi isolada uma maior variabilidade de fungos filamentosos, 12 das 32 espécies isoladas foram encontradas apenas no café cultivado no sistema orgânico (*Fusarium solani*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Aspergillus tamarii*, *Trichoderma harzianum*, *Phoma* sp., *Bipolaris* sp., *Glomerella cingulata*, *Mucor hiemalis*, entre outros) mostrando que o cultivo orgânico permite maior riqueza na gama de espécies isoladas em relação ao cultivo tradicional.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL BIOLÓGICO

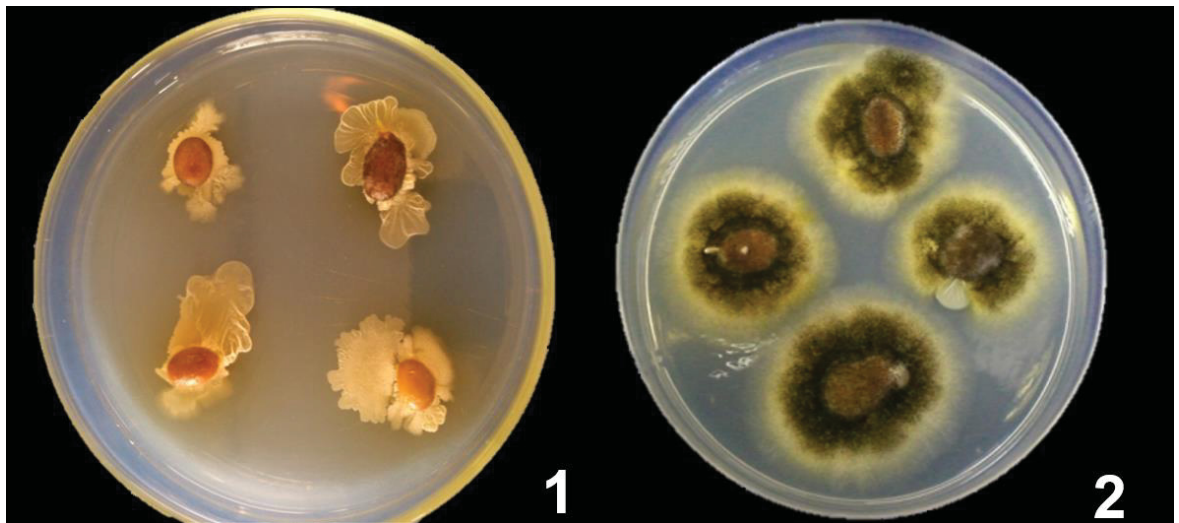
Os grãos de café verde (*Coffea arabica*) foram cedidos pelo IAPAR (Instituto Agrônômico do Paraná), situado na cidade de Londrina, Paraná. A linhagem padrão de *Aspergillus ochraceus* 40013 (ATCC 22947) produtora de OTA foi obtida no Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz localizado na cidade do Rio de Janeiro. As linhagens de *Aspergillus niger* UEL, *Aspergillus carbonarius* 187 UEL e *Aspergillus westerdijkiae* 91 UEL, também produtoras de ocratoxina A, foram cedidas pelo Laboratório de Biologia Molecular da UEL (Universidade Estadual de Londrina).

4.2 ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS DE GRÃOS DE CAFÉ.

O isolamento dos microrganismos de 78 amostras dos grãos de café foi realizado segundo Noonim *et al.* (2008) e Silva *et al.* (2000), com modificações. Para o isolamento foram testados os seguintes meios de cultivo: Sabouraud (Acumedia, USA) acrescido de antibiótico Tetraciclina (200 µg/mL), para os fungos filamentosos; meio TSA (Trypticase Soy Agar) (Acumedia, USA) para bactérias, meio Caseinato nutritivo (Himedia, Índia) e Czapek-Dox (Himedia, Índia) para actinobactérias e os meios YM (Yeast-Malt) (Acumedia, USA), DRBC (Dicloran Rosa Bengala Cloranfenicol Base) (Himedia, Índia), M-Green (Laborclin, Brasil) para leveduras. Os isolados foram depositados no banco biológico do LabMicro (Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular) da Universidade Federal do Paraná.

Em placa contendo meio de cultura para o isolamento dos microrganismos de interesse foram depositados 4 grãos de café em condições assépticas e incubadas em câmara BOD a 28°C ±0,5°C, por 7 dias para fungos filamentosos, 2 dias para leveduras e 24 horas para bactérias.

FIGURA 2 - ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS E FUNGOS NOS GRÃOS DE CAFÉ



FONTE: O AUTOR (2015).

NOTA: ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS (1) E ISOLAMENTO DE FUNGOS (2)

4.3 IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS

A identificação dos microrganismos foi realizada pela técnica de microcultivo segundo Kern e Blewins (1999) para os isolados fúngicos e actinobactérias. As bactérias, actinobactérias e leveduras foram coradas pela coloração de Gram de acordo com as técnicas de Koneman *et al.* (2008) e identificadas presuntivamente em microscópio óptico.

4.4 TESTES DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO DE FUNGOS PRODUTORES DE OCRATOXINA A POR MICRORGANISMOS

4.4.1 Fungos

O antagonismo dos fungos isolados de grãos de café foi realizado pelo método da cultura pareada, chamado também de método do pareamento, que consiste no confronto direto do provável antagonista (isolados) com as linhagens padrões de *Aspergillus* sp., em placas de Petri contendo meio ágar Sabouraud (MARIANO 1993 apud LÓPEZ, 2010). Após o crescimento dos fungos por 5 dias em câmara BOD a $28^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, discos de 7 mm foram retirados e colocados em meio ágar Sabouraud, entre o *Aspergillus* e o fungo isolado dos grãos de café utilizou-se a distância de 4 cm, as placas foram incubadas por 7 dias em câmara BOD a $28^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. O experimento

foi realizado em quintuplicata e como controle negativo foram utilizadas placas contendo apenas as linhagens padrões de *Aspergillus* sp..

Para determinar a porcentagem de inibição do crescimento, foi medido o diâmetro das colônias. Os cálculos foram realizados de acordo com Edginton, Knew e Barron (1971), pela seguinte fórmula: $PI(\%) = \frac{(D_c - D_t)}{D_c} \times 100$

Sendo D_t o diâmetro médio da colônia da linhagem padrão de *Aspergillus* sp. crescida na placa contendo o fungo testado e D_c o diâmetro médio da colônia de controle de *Aspergillus* sp..

4.4.2 Bactérias e leveduras

As leveduras foram inoculadas em placas contendo ágar Sabouraud e as bactérias em ágar TSA, incubadas por 48 a 72 horas em BOD à 28°C e em seguida transferidas para tubos contendo solução salina 0,85% (NaCl 8,5g/L, água destilada 1000mL/L) para obtenção de suspensões com concentração de $1,5 \times 10^8$ células/mL, correspondente à solução 0,5 da escala de McFarland. Em placas de Petri esterilizadas contendo ágar Sabouraud a suspensão foi espalhada com o auxílio de um *swab* estéril (NCCLS, 2003), e em seguida utilizando um vazador de rolhas, foi retirado um disco de 7mm de diâmetro do centro de cada placa e inserido um disco de meio ágar Sabouraud contendo micélio das linhagens padrões de *Aspergillus* após 5 dias de incubação em câmara BOD a 28°C $\pm 0,5^\circ\text{C}$ (ZHU *et al.*, 2015). O experimento foi realizado em quintuplicata e como controle negativo foram utilizadas placas contendo apenas as linhagens padrões de *Aspergillus*. A avaliação foi realizada através da medição do diâmetro da colônia da linhagem padrão após 7 dias de incubação em câmara BOD a 28°C $\pm 0,5^\circ\text{C}$ utilizando a equação postulada por Edginton, Knew e Barron (1971) (item 4.4.1).

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Uma Análise de Variância (ANOVA), foi realizada segundo o delineamento inteiramente casualizado (DIC) para todas as medições dos testes de inibição de crescimento de *Aspergillus* sp. por leveduras e bactérias. Quando encontrada significância para o teste F, as análises foram complementadas com o teste de Tukey

ao nível de 5% de probabilidade, utilizando o software ASSISTAT 7.6 2011 (SILVA, 1996).

A análise de ocratoxina A dos grãos foi realizada pela Companhia Cacique de Café Solúvel, também situado na cidade de Londrina, Paraná. Para correlacionar a concentração de ocratoxina A encontrada nos grãos de café com os fungos isolados dos mesmos foi realizado o teste R de correlação linear, onde $R=0$ significa que não há correlação entre os dados, $R= -1$ significa que há correlação negativa perfeita (dados inversamente proporcionais) e $R=1$ significa que há correlação positiva perfeita (dados diretamente proporcionais), utilizando o programa STATISTICA 8.0 (UDOVIČIĆ *et al.*, 2007).

4.6 IDENTIFICAÇÃO POR BIOLOGIA MOLECULAR DOS MICRORGANISMOS QUE APRESENTARAM ATIVIDADE INIBITÓRIA

A extração de DNA foi realizada segundo Badali *et al.* (2009). Para a amplificação da região de interesse para identificação de fungos filamentosos e leveduras, foram utilizados os seguintes oligonucleotídeos iniciadores: ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC), responsáveis pela amplificação da região ITS1-5,8S-ITS2 do DNA ribossomal. Para a amplificação da região de interesse para a identificação bactérias e actinobactérias foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores Fd1(AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) e Rd1 (AAGGAGGTGATCCAGCC) responsáveis pela amplificação da região 16S do DNA ribossomal (CHEN *et al.*, 2011; MULÈ *et al.*, 2004; GLASS; DONALDSON, 1995; MALDONADO *et al.*, 2005.).

Os fragmentos foram sequenciados no sequenciador automático ABI 3500 (*Applied Biosystems*). A edição das sequências obtidas foi realizada com o auxílio do pacote do programa Staden versão 1.6 (BONFIELD *et al.*, 2002). As sequências obtidas foram alinhadas pelo programa MAFFT versão 7.0 e comparadas com outras sequências existentes no banco de dados NCBI pelos programas MEGA versão 4.0 (TAMURA *et al.*, 2006) permitindo a detecção de similaridade de uma sequência biológica com sequências caracterizadas já existentes. Para a análise das sequências obtidas neste trabalho foi utilizado o programa BLASTn (ALTSCHUL *et al.*, 1997) que compara as sequências de nucleotídeos com um banco de dados de sequências de nucleotídeos.

4.7 TESTE DE REDUÇÃO DA PRODUÇÃO DE OCRATOXINA A EM *Aspergillus* sp.

A realização do teste de redução da toxicidade da OTA nas linhagens de *Aspergillus* sp. foi realizada pelo método de *plug-agar*. Três pequenas alíquotas (*plugs*) da linhagem fúngica foram retiradas após o teste de inibição (item 4.4), esta amostra foi transferida a um tubo de ensaio onde foi adicionado 1,5mL de metanol, esta suspensão ficou em repouso por uma hora no escuro, e em seguida foi centrifugada a 4000 rpm. O líquido foi filtrado em lã de vidro e evaporado em banho-maria, a toxina foi ressuspensa com a fase móvel utilizada no aparelho de CLAE, água acidificada 2%-acetonitrila (50:50) e filtrada novamente em filtro com poro de 0,22 µm. As amostras foram analisadas em aparelho de CLAE (ProStar 410, Varian, EUA) com detector de fluorescência (modelo 363 série 00956), e os dados foram expressos em nanogramas por litro (ng/L) (TANIWAKI *et al.*, 2003; MASOUD E KALTOFT, 2006).

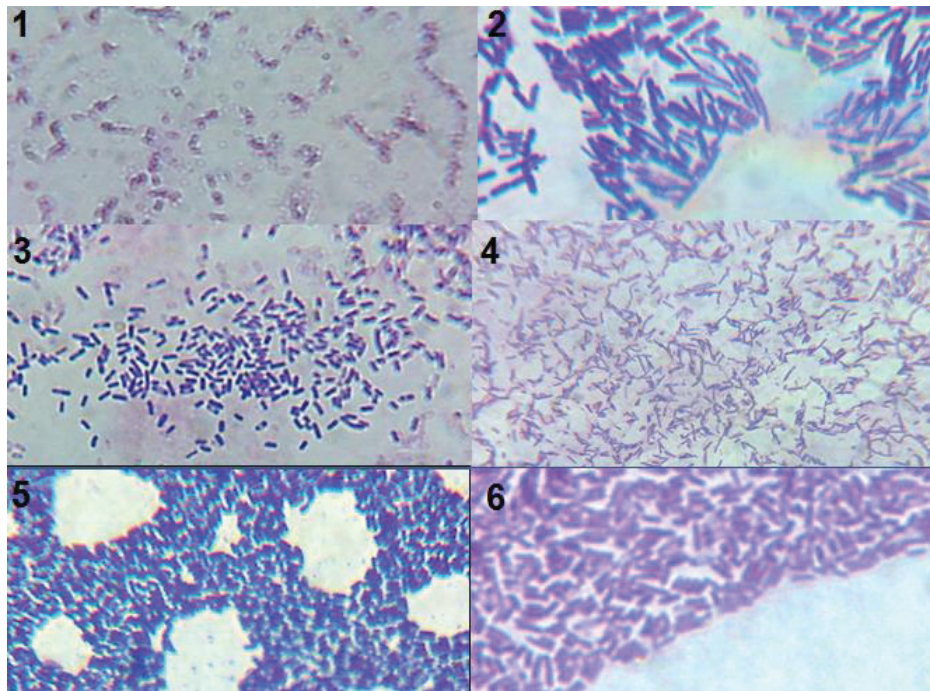
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS

5.1.1 Isolamento de bactérias

Foram obtidos 2259 isolados bacterianos dos grãos de café que foram agrupados pela sua macromorfologia em 23 morfotipos através da coloração de Gram, foi possível identificar cocos (8,7%) e bacilos (91,3%) Gram positivos. (FIGURA 3)

FIGURA 3 - MICROMORFOLOGIA DAS BACTÉRIAS ISOLADAS DOS GRÃOS DE CAFÉ, PELA COLORAÇÃO DE GRAM.



FONTE: O AUTOR (2015)

NOTAS: 1 - ISOLADO COCO GRAM POSITIVO E 2 - 6 ISOLADOS BACILOS GRAM POSITIVOS. AUMENTO DE 1000X.

Os resultados condizem com Pagnoncelli *et al.* (2000), que isolaram 30 bactérias da polpa de café cereja fermentado, selecionando 10 destes isolados, foi realizada análise de identificação morfológica, onde encontraram bacilos e cocos Gram positivos. Djossou *et al.* (2011), isolaram o *Lactobacillus plantarum* sp. um bacilo Gram positivo de grãos do café, esta bactéria, produtora de ácido lático, se mostrou capaz de inibir o crescimento do *Aspergillus carbonarius*. Silva¹ *et al.* (2008), isolaram bactérias dos grãos de café no início da sua fermentação, e identificaram que 68%

dos isolados eram bactérias, e destes 85,5% eram Gram positivos, sendo majoritariamente bacilos.

Nayak *et al.* (2012), pesquisando bactérias relacionadas com a degradação da cafeína, isolou da polpa de café cereja, uma bactéria Gram positiva, identificada microscopicamente como coco, a *Brevibacterium* sp., que foi capaz de degradar cafeína. Muñoz Moreno *et al.* (2010), que testaram a capacidade de degradação biológica da ocratoxina A pelas bactérias *B. casei*, *B. linens*, *B. iodinum* e *B. epidermidis*. A degradação biológica foi confirmada por análise de CLAE, onde a ocratoxina A foi biodegradada através destes microrganismos para a sua forma menos tóxica, a ocratoxina α .

Vilela *et al.* (2010) isolaram microrganismos do café arábica processado pela via semi-seca (onde a retirada da mucilagem é realizada por equipamentos). Utilizando meios de cultura específicos para bactérias (ágar nutriente e MRS(De Man, Rogosa e Sharpe ágar)), isolaram 286 bactérias, e assim como no presente trabalho, a maioria das bactérias isoladas foram identificadas como Gram-positivas (214) e 72 Gram-negativas. Os autores isolaram as bactérias *Enterobacter agglomerans*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus macerans* e *Lactobacillus plantarum* que são naturalmente encontradas no processo de fermentação e em solo e plantas. Também foram isoladas as bactérias *Erwinia herbicola*, *Klebsiella pneumoniae* e *Lactobacillus brevis* que são pectinolíticas e as bactérias *Bacillus subtilis* e *Acinetobacter* sp. que já foram identificados em café no Brasil.

Avallone *et al.* (2001) analisaram os microrganismos presentes na fermentação do café. Foram isoladas as bactérias pectinolíticas *Klebsiella ozaenae*, *Erwinia herbicola*, além das bactérias láticas *Leuconostoc mesenteroides dextranicum* e *Leuconostoc brevis* naturalmente encontradas em fermentação de vegetais. Outros autores também avaliaram a presença de bactérias durante a fermentação do café, sendo a maioria delas Gram-positivas como o encontrado no presente trabalho, Silva¹ *et al.* (2008), isolaram 940 microrganismos em 22 dias de fermentação. A maioria das bactérias foram isoladas nos primeiros 8 dias, sendo 80,4% Gram-positivas identificadas como *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus macerans*, *Acinetobacter* sp., *Bacillus polymyxa*, *Arthrobacter* sp., *Enterobacter agglomerans* e *Yersinia* sp..

5.1.2 Isolamento de leveduras

Não foi obtida nenhuma levedura em nenhuma das técnicas e condições utilizadas. Sakiyama *et al.* (2000), em sua pesquisa isolou apenas 8% de leveduras, em um total de 1042 microrganismos isolados, mostrando assim a dificuldade de se isolar leveduras. A pesquisa relacionou os microrganismos isolados do grão de café com os estágios de maturação do mesmo, e expôs que quanto menor a maturação do grão, maior a população de bactérias e menor a de fungos filamentosos e leveduras. Silva *et al.* (2000), mostraram que há uma relação inversamente proporcional entre as leveduras e as bactérias no grão de café, ou seja, quando há um aumento na população bacteriana, há um declínio na população de leveduras. Estes resultados são confirmados com o presente estudo, que encontrou uma grande população de bactérias, em contrapartida, nenhuma levedura foi isolada.

Pela dificuldade do isolamento de leveduras nas amostras de café verde, foram utilizadas leveduras isoladas pelo presente grupo de pesquisa de grãos de café verde da safra de 2011, estas foram isoladas 2 meses após a colheita. Trabalhos importantes em relação ao isolamento de microrganismos logo após a colheita dos grãos foram realizados por Silva *et al.* (2000). Os autores isolaram leveduras de grãos de café, trabalhando com grãos que foram processados por via seca, os grãos permaneceram em terreiro por até 6 dias, onde há pouca perda de umidade. Masoud *et al.* (2004), isolaram leveduras de grãos de café e encontraram que a maior parte das leveduras isoladas eram do gênero *Pichia*, que estava presente durante a fermentação e a secagem dos grãos.

Silva *et al.* (2008)² isolaram leveduras do café utilizando o meio de DG18 (dicloran glicerol 18% ágar). A contagem de leveduras foi elevada durante o período de fermentação dos grãos e decaiu consideravelmente durante o período de armazenagem. De 940 isolados, 202 eram leveduras, sendo a *Debaryomyces hansenii* a mais isolada (42,6% dos isolados) e em seguida a *Pichia guilliermondi* (20,6%). Também foram isoladas 18 outras espécies de leveduras como, por exemplo, *Pichia anomala*, *Pichia burtonii*, *Debaryomyces polymorphus*, *Arxula adenivorans* e *Pichia holstii*. Pereira *et al.* (2014) isolaram leveduras do café processado pela via úmida. Durante as 48 horas de fermentação do café, foram retiradas alíquotas do meio de fermentação dos grãos para a realização do isolamento das leveduras. Foram isoladas 144 leveduras identificadas de acordo com o

sequenciamento da região ITS como *Pichia fermentans*, *Pichia kluyveri*, *Candida glabrata*, *Candida quercitrusa*, *Saccharomyces* sp., *Pichia guilliermondii*, *Pichia caribbica* e *Hanseniaspora opuntiae*, estas são frequentemente isoladas no solo, frutas e árvores.

As leveduras utilizadas neste trabalho foram identificadas a partir do sequenciamento da região ITS, sendo elas *Pichia anomala*, *Pichia burtonii*, *Pichia caribbica*, *Aureobasidium pullulans*, *Pichia guilliermondii* e *Cryptococcus heveanensis* (TABELA 2).

TABELA 2 - LEVEDURAS ISOLADAS DOS GRÃOS DE CAFÉ IDENTIFICADAS A PARTIR DO SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO ITS

Código	Identificação	Tamanho do fragmento (pb)	Homologia (%)	Nº de acesso no GenBank
CAT 1 L1	<i>Pichia anomala</i>	593	99	KP638728
103 3 L1	<i>Pichia anomala</i>	570	99	KP638741
102 1 L2B	<i>Pichia burtonii</i>	443	99	N/D
102 2 L2	<i>Pichia burtonii</i>	432	97	KP638737
102 2 L1	<i>Pichia burtonii</i>	443	99	KP638729
102 1 L1	<i>Pichia burtonii</i>	403	99	KP638735
102 2 L3	<i>Pichia burtonii</i>	790	99	KP638736
CAT 2 L1	<i>Pichia caribbica</i>	607	99	KP638738
102 3 L1	<i>Pichia caribbica</i>	607	100	KP638733
104 3 L1	<i>Aureobasidium pullulans</i>	582	98	KP638730
106 3 L2	<i>Aureobasidium pullulans</i>	582	99	KP638731
102 1 L2N	<i>Aureobasidium pullulans</i>	535	99	KP638732
104 3 L2	<i>Aureobasidium pullulans</i>	584	99	KP638734
107 1 F1	<i>Pichia guilliermondii</i>	616	99	KP638727
102 3 L2	<i>Cryptococcus heveanensis</i>	585	98	KP638739

FONTE: O AUTOR (2015)

NOTA: N/D LEVEDURA NÃO DEPOSITADA NO GenBank.

A utilização da levedura *Pichia anomala* pode ser uma alternativa no controle de fungos potencialmente toxigênicos em grãos, pois esta tem a capacidade de crescer em condições de stress como pH alto e baixo, atividade de água baixa e condições anaeróbicas (FREDLUND *et al.*, 2002; PASSOTH *et al.*, 2005). Autores já analisaram a capacidade inibitória desta levedura, como Olstorpe *et al.* (2012) que avaliaram o potencial de inibição de *P. anomala* contra enterobactérias presente em cereais armazenados em mini silos. Onze das treze bactérias testadas quando co-inoculadas com a levedura tiveram seu crescimento inibido. Druvefors e Schnurer (2005) estudaram a inibição de *Penicillium roqueforti* por *P. anomala* em trigo

armazenado em mini silos em alta umidade. Foram inoculadas no trigo suspensões de 10^3 esporos/g de *P. roqueforti* e 10^5 UFC/g de levedura, estas foram armazenadas em tubos de ensaio parcialmente vedados, para simular o escape de ar em silos de larga escala, a fim de aumentar a umidade do ambiente. Após incubação a 25°C encontrou-se que a levedura inibiu o fungo a níveis menores que 10^3 UFC/g⁻¹. Boysen, Bjorneholm e Schnurer (2000) utilizaram a *Pichia anomala* na inibição de *P. roqueforti*, *P. carneum* e *P. paneum* contaminantes de trigo. Utilizando um modelo experimental de mini silo, e uma concentração de 10^4 UFC/g⁻¹ da levedura, co-inoculada com os três fungos observou-se um efeito inibitório da *P. anomala*, e quando utilizado a concentração de 10^5 UFC/g⁻¹ ocorreu um efeito fungicida sobre os fungos.

Há poucos relatos na literatura de análises sobre o potencial inibitório de *Pichia burtonii*, porém Druvefors e Schnurer (2005) durante os seus estudos de leveduras capazes de inibir o *P. roqueforti* utilizaram a *P. burtonii*, que após 14 dias inoculada juntamente com o fungo, foi capaz de reduzi-lo de 10^5 UFC/g⁻¹ a menos que 10^3 UFC/g⁻¹.

A levedura *Pichia guilliermondii* já foi testada na inibição de diversos fungos em diversos alimentos, como nas análises de Droby *et al.* (1993) que efetuou testes de inibição do fungo *Penicillium digitatum*, causador do mofo verde em citros. Encontrando que a levedura foi capaz de diminuir a decomposição dos frutos causada pelo fungo em experimentos de escala piloto e larga escala em locais de armazenamentos comerciais. Hashem e Alamri (2009) utilizaram leveduras na inibição do fungo *Botryodiplodia theobromae*. O fungo *B. theobromae* é conhecido por ser o causador de doenças pós-colheita em várias frutas, como por exemplo, a goiaba. Utilizando 5 leveduras, os autores observaram se as leveduras inibiam o crescimento do fungo em lesões causadas nas frutas, e encontraram que a levedura *P. guilliermondii* inibiu em até 26,67% as lesões comparado com o controle.

Paster *et al.* (1993) trabalhando com grãos armazenados, estudaram a eficácia de *P. guilliermondii* na inibição de *Aspergillus flavus*. Os grãos entraram em contato com a suspensão de levedura a 10^7 e 10^9 células/ mL⁻¹ por 2 minutos, e em seguida foi pulverizando uma suspensão do fungo, então avaliou se que o crescimento de *A. flavus* na superfície dos grãos de soja foi menor que o controle, resultando assim na inibição do fungo. Zhang *et al.* (2011) relataram a ação da levedura *P. guilliermondii* contra o *Botrytis cinerea* em maçãs em condições de armazenamento. As maçãs foram feridas e contaminadas com o fungo e ficaram por 1 minuto imersas em um

tanque contendo uma suspensão de 10^8 células/mL⁻¹ da levedura, os frutos foram armazenados a 1°C e 95% de umidade relativa. Após o período de 120 dias foi avaliada a porcentagem de mofo cinzento onde a levedura reduziu de 45,3% (controle) para 20% (teste).

A levedura *Aureobasidium pullulans* já foi amplamente estudado na inibição de fungos contaminando frutas armazenadas, como nos estudos de Ippolito *et al.* (2000) que testaram a capacidade inibitória de *A. pullulans* contra *Botrytis cinerea* e *Penicillium expansum* em maçãs. As frutas foram feridas, e nestas foram inoculados os fungos patogênicos, então foram tratadas com suspensões da levedura a 6×10^7 UFC/mL⁻¹, sendo armazenadas a 24°C em 95% umidade por 14 dias. Foi avaliado o crescimento dos fungos mostrando que a levedura é eficaz no controle de *B. cinerea* e *P. expansum*, onde o crescimento destes foi de 11% e 33% respectivamente, enquanto que no controle os fungos cresceram 100%. Lima *et al.* (1996) utilizaram a levedura *A. pullulans* na inibição de *B. cinerea* e *Rhizopus stolonifer*, pulverizando estes em morangueiros cultivados em tubos de plástico. O provável antagonista foi capaz de diminuir o crescimento dos fungos em temperaturas variando de 20°C a 33°C, reduziu em 78% o crescimento do *R. stolonifer* e 84% o *B. cinerea*, mostrando que a ação inibitória se deve a competição por nutrientes.

Schena *et al.* (1999) analisaram a capacidade de *A. pullulans* contra *Penicillium digitatum*, *Botrytis cinerea*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus stolonifer* em frutas. Realizaram cortes em maçãs, *grapefruit*, uva e tomate cereja e inseriram nestas uma suspensão de 5×10^4 esporos/mL⁻¹ do fungo e uma de 1×10^6 células/mL⁻¹, 1×10^7 células/mL⁻¹ e 1×10^8 células/mL⁻¹ da levedura, as frutas foram armazenadas a 20°C por 5 dias. A inibição de *B. cinerea* em maçãs foi significativa, com redução de 93% de redução de podridão, nas concentrações 1×10^7 células/mL⁻¹ e 1×10^8 células/mL⁻¹. O *A. pullulans* reduziu a podridão de *P. digitatum* em *grapefruit*, *B. cinerea*, *R. stolonifer* e *A. niger* em uvas, e *B. cinerea* e *R. stolonifer* em tomate cereja. Na menor concentração 1×10^6 células/mL⁻¹ a levedura ainda foi capaz de reduzir o crescimento de *B. cinerea* em uva, tomate cereja, e de *A. niger* e *P. digitatum* em *grapefruit*.

Não consta na literatura análises de inibição da levedura *Cryptococcus heveanensis*, porém Chan e Tian (2005) trabalharam com uma levedura do mesmo gênero, o *Cryptococcus albidus*. Os autores analisaram a ação da levedura contra fungos patogênicos de maçãs (*Monilinia fructicola*,

Penicillium expansum e *Rhizopus stolonifer*). Foi analisada a interação da levedura com as linhagens fúngicas patogênicas em placas de Petri contendo meio ágar suco de maçã, também foi analisada a interação entre os microrganismos *in vivo* onde foram realizados cortes em maçãs e inoculados nestas suspensões da levedura e do fungo. Analisando a interação entre a levedura e os fungos, se observou pouca adesão da levedura ao micélio do fungo, mostrando que a levedura *C. albidus* não se apresenta eficaz na inibição de fungos patogênicos.

Bautista-Rosales *et al.* (2013) utilizaram a levedura *Meyerozyma (Pichia) caribbica* para inibir o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* isolados de mangas. Os microrganismos foram inoculados em mangas através de feridas, para avaliar a inibição do fungo foi analisada a adesão da levedura no patógeno. Os resultados mostraram que a levedura inibiu em 86,7% o dano causado pelo fungo, se comparado ao controle. Ao comparar a inibição causada pela levedura com a inibição gerada por um fungicida comercial (Benomyl 0,1) não houve diferença estatisticamente significativa entre as inibições. Na avaliação do parasitismo de *M. caribbica* sobre o fungo, observou-se que esta se aderiu ao micélio do patógeno, enquanto que o controle utilizado (*Saccharomyces cerevisiae*) não se aderiu, analisando esta interação em microscópio eletrônico, observou-se que a levedura produziu entalhes nas hifas do fungo, gerando uma tensão não letal sobre este. Sendo assim, os autores indicam o potencial inibitório da levedura *M. caribbica* no controle biológico do fungo *C. gloeosporioides*.

5.1.3 Isolamento de actinobactérias

Não foi obtida nenhuma actinobactéria dos grãos de café, outros trabalhos relataram o isolamento de actinobactérias como o realizado por Dupont *et al.* (2014), que estudou actinobactérias das esponjas marinhas (*Phorbas tenacior*) do gênero *Citricoccus*, que já foi também isolada de biorreatores, solo de deserto e sedimentos marinhos.

Tan, Deng e Cao (2014), trabalharam com actinobactérias provenientes de fezes de ruminantes, onde a maioria dos isolados pertencia ao gênero *Streptomyces*, *Amycolatopsis*, *Micromonospora*, e *Cellulosimicrobium*, sendo estes capazes de crescer em meio onde a única fonte de carbono disponível era pectina, celulose ou xileno. González *et al.* (2005) encontraram grande diversidade de actinobactérias

presentes em líquens retirados de rochas, granito, florestas, entre outros. Destas, a maior parte dos isolados pertencia aos gêneros *Micromonospora* (40%) e *Streptomyces* (36%). Actinobactérias estão comumente presentes no solo, onde ficam na presença de fontes de proteína (SILVA, 2012). Porsani *et al.* (2013), isolaram 116 actinobactérias das areias de uma praia no Paraná, e encontraram que 68% dos microrganismos foram capazes de inibir o crescimento das linhagens patogênicas testadas.

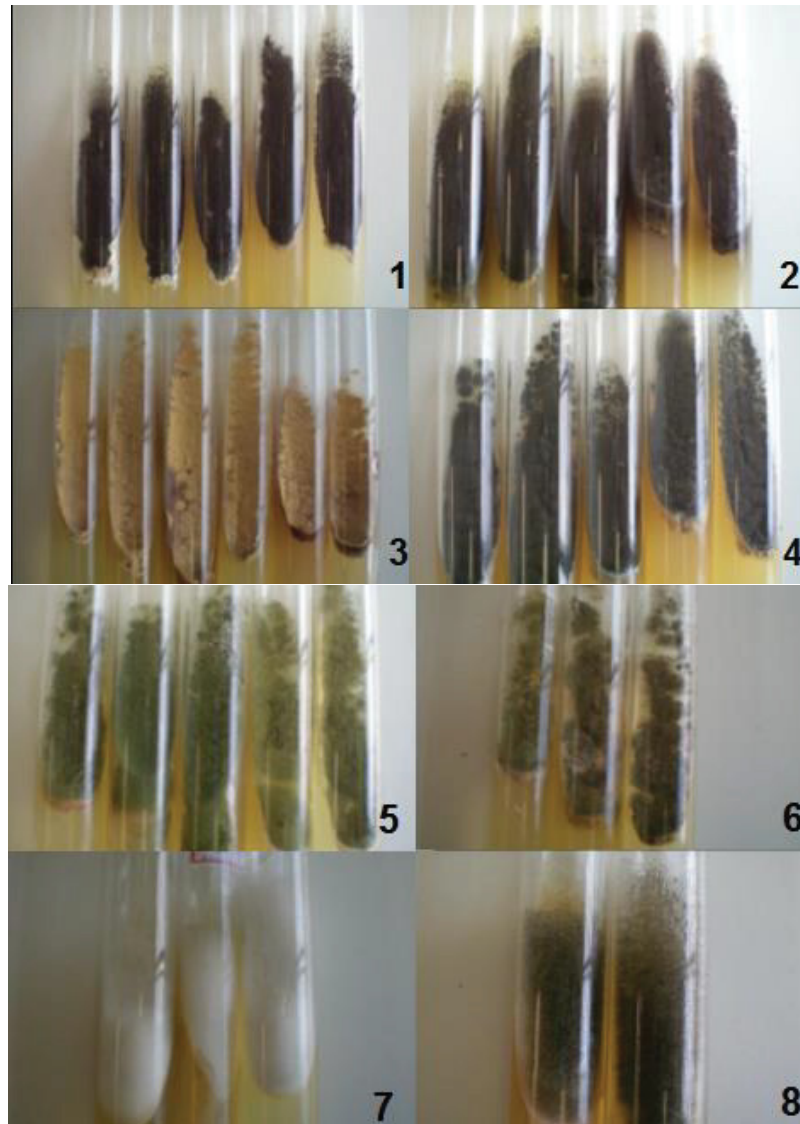
Tonial (2010), em suas análises, trabalhou com os microrganismos endofíticos da aroeira, isolando um total de 128 fungos e 3 actinobactérias. Todas as actinobactérias pertenciam ao gênero *Streptomyces* sp., que apresentou atividade antimicrobiana frente a *Candida albicans*. Enquanto que Savi (2011) estudou os actinobactérias endofíticas da planta *Vochysia divergens* (Cambará), onde foram isoladas 18 actinobactérias, e destas 7 apresentaram atividade contra o fungo *Phyllosticta citricarpa* na técnica de cultura pareada.

Até o momento não há registro de isolamento de actinobactérias de grãos de café.

5.1.4 Isolamento de fungos

Foi realizado o isolamento de fungos filamentosos provenientes de 78 amostras de grãos de café, onde se observou o crescimento de 1795 isolados fúngicos, que foram analisados e classificados de acordo com a sua micromorfologia e macromorfologia em 8 grupos. O gênero *Aspergillus* sp. foi o gênero com o maior número de isolados, totalizando 91,70%, seguidos de 8,30% isolados representantes dos demais gêneros (*Mucor* sp. e *Rhizopus* sp.) (FIGURA 4).

FIGURA 4 - FUNGOS ISOLADOS DOS GRÃOS DE CAFÉ EM MEIO DE CULTURA ÁGAR SABOURAUD INCUBADOS A 28°C ±0,5°C POR 7 DIAS.



FONTES: O AUTOR (2015)

NOTAS: MACROMORFOLOGIA DE *Aspergillus* seção *Nigri* (1 e 2), *Aspergillus* seção *Circumdati* (3), *Aspergillus* sp. (4, 5 e 6). FUNGOS DO GÊNERO *Mucor* sp. (7) e *Rhizopus* sp. (8).

Silva *et al.* (2008)¹, também encontraram um grande número de fungos filamentosos (263) sendo o gênero majoritário o *Aspergillus* sp. (112) nos grãos de café. O elevado número de isolados fúngicos, se comparado com bactérias e leveduras, pode ser devido a diminuição da atividade de água no decorrer das análises, esta diminuição favorece o crescimento de fungos e dificultando o de bactérias e leveduras. Rezende *et al.* (2013) relatam que no Brasil a espécie de *Aspergillus* seção *Nigri* tem sido isolada com maior frequência nos grãos de café.

Os resultados de Silva *et al.* (2008)² também condizem com os resultados encontrados no presente trabalho, que utilizando grãos de café arábica, provenientes

de Minas Gerais, isolaram fungos filamentosos no final da fermentação das amostras e quando as amostras estavam com baixa atividade de água, o total de fungos isolados foi de 363, identificados como *Aspergillus* (132), *Penicillium* (101), *Cladosporium* (44), *Fusarium* (15), *Pestalotia* (15) e *Paecilomyces* (13). Vilela *et al.* (2010), trabalharam isolando e identificando a microbiota do café processado semi-seco, onde os grãos são despulpados na horizontal por meio de equipamentos específicos. Os fungos isolados primeiramente foram identificados microscopicamente, seguido de técnicas de biologia molecular, onde a presença de fungos filamentosos foi maior no início da fermentação do café, e praticamente nula no final do experimento, sendo totalizado um montante de 60 fungos, destes, a grande maioria foram do gênero *Aspergillus*.

Bozza *et al.* (2009), isolaram fungos filamentosos de grãos de café provenientes da árvore e coletados no solo, observaram um grande número de isolados nas amostras da árvore (5393) em relação as amostras do solo (1523). Os gêneros identificados foram *Absidia*, *Acremonium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Mucor*, *Paecilomyces* e *Penicillium*, sendo o *Aspergillus* o gênero com maior número de isolados. Relacionando-se estes resultados com a prova da xícara, observou-se que os grãos que permanecem mais tempo em seus locais de origem, possuem uma diminuição na qualidade da bebida.

De acordo com Pitt e Hocking (1997), os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* competem pelo substrato disponível e usualmente apenas um dos gêneros é encontrado predominantemente. Assim, pode-se explicar a grande ocorrência de fungos do gênero *Aspergillus* e nenhum isolado dos gêneros *Penicillium* e *Fusarium*. Os autores também postulam que a grande quantidade de *A. niger* e *A. ochraceus* encontrada ocorre, pois, estas espécies são xerofílicas, se desenvolvem em baixa atividade de água, ou seja, em condições de armazenamento.

Taniwaki e colaboradores (2014) analisaram a população fúngica em grãos de café deteriorados, a fim de encontrar fungos produtores de ocratoxina A e fungos deterioradores dos grãos. Trabalhando com amostras de café (normal, ardido, preto, preto-verde e verde) provenientes do estado de São Paulo e Minas Gerais, foram isolados fungo utilizando os meios; ágar extrato de levedura Czapeck (CYA) e ágar extrato de malte (MEA). Foram isolados os fungos *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus flavus*, *A. westerdijkiae*, *Aspergillus sydowii*, *Alternaria* sp., *Cladosporium cladosporioides*, *Eurotium chevalieri*, *Eurotium repens*,

Eurotium rubrum, *Eurotium* spp., *Fusarium equiseti*, *Fusarium lateritium*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium semitectum*, *Fusarium* spp., *Mucor* sp., *Nigrospora sphaerica*, *Penicillium brevicompactum*, *Penicillium* spp..

Ferreira *et al.* (2011) isolaram fungos de grãos de café coletados na Bahia. Encontrando os gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*, sendo o fungo do gênero *Aspergillus* o mais isolado. Foram isolados os fungos *A. ochraceus*, *A. niger*, *A. flavus*, *A. foetidus*, *A. tubingensis*, *A. auricomus*, *A. sojae* e *A. oryzae*, os autores indicam que o maior risco de contaminação dos grãos e produção de OTA ocorre quando estes entram em contato com o solo.

Iamanaka e colaboradores (2014) relacionaram os microrganismos isolados de grãos de café com sua influência no sabor do produto final. Os fungos isolados foram *Penicillium brevicompactum*, *Penicillium* sp., *Aspergillus* seção *Nigri*, *A. westerdijkiae* e *Fusarium lateritium*, e há uma relação inversamente proporcional entre a quantidade de fungos isolados e a avaliação sensorial dos grãos, ou seja, quanto mais fungos foram isolados, menor é a qualidade da bebida. A presença de *Aspergillus* seção *Nigri* e *A. westerdijkiae* está ligada ao produto de baixa qualidade, com avaliação sensorial negativa e com grãos mofados.

5.2 RELAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE OCRATOXINA A ENCONTRADA NOS GRÃOS DE CAFÉ COM OS FUNGOS ISOLADOS DOS MESMOS

No apêndice 3 estão presentes os resultados das análises da concentração de OTA realizados por CLAE das amostras de café. A concentração de OTA nos grãos de café foi realizada pela Companhia Cacique de Café Solúvel, os dados foram expressos em $\mu\text{g}/\text{kg}$, as concentrações variaram de 0 a 9,64 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Após analisar os resultados da concentração de OTA das amostras relacionando com os fungos isolados das mesmas (total de 781 isolados da seção *Nigri* e 173 isolados da seção *Circumdati*), foi encontrada a relação onde, quanto maior a população de fungos *Aspergillus* seção *Nigri*, menor foi o número de isolados *Aspergillus* seção *Circumdati*, e conseqüentemente, menor a concentração de OTA encontrada nos grãos de café. Rezende *et al.* (2013), isolou *Aspergillus* sp. de grãos de café e testou a capacidade destes de produzir OTA e encontrou que os *Aspergillus* seção *Circumdati* são potencialmente mais ocratoxigênicos em relação ao *Aspergillus* seção *Nigri*. Chalfoun e Batista (2006) analisaram a incidência de

ocratoxina A em diferentes frações de grãos de café arábica, e seus resultados de concentração de OTA foram condizentes com os obtidos no presente estudo, onde a grande maioria das amostras do fruto verde apresentaram uma concentração de ocratoxina A menor que 5 µg/kg, ainda constataram que o *Aspergillus ochraceus* foi o maior produtor de OTA, apresentando esta micotoxina em 95% dos isolados.

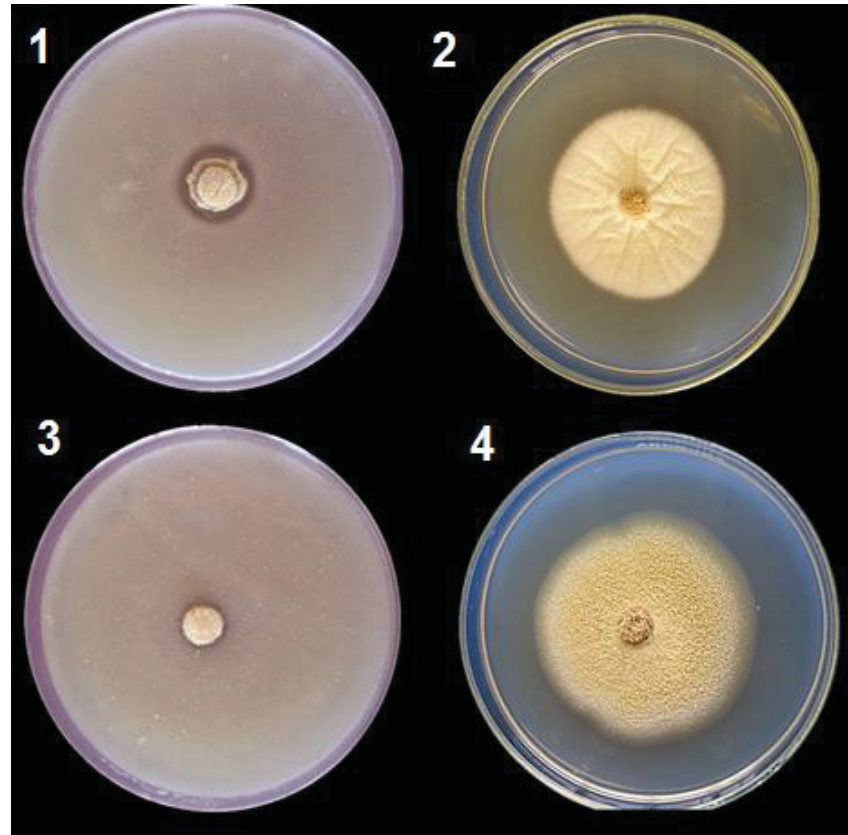
Batista *et al.* (2009), encontraram que a concentração de OTA é maior em café com baixa qualidade (varrição) (100 µg/kg), e neste foi isolado o maior número de fungos filamentosos (73% *Aspergillus* seção *Nigri*). Os *Aspergillus* seção *Circumdati* estão presente em maior quantidade nos grãos de café, sendo o *Aspergillus ochraceus* o maior produtor de OTA, enquanto que o *Aspergillus niger* não apresentou potencial ocratoxigênico.

5.3 TESTE DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO DE FUNGOS PRODUTORES DE OCRATOXINA A POR MICRORGANISMOS

5.3.1 Bactérias

Os testes de inibição foram realizados com uma bactéria de cada morfotipo, sendo 23 no total e em quintuplicata, pela técnica de crescimento radial. (FIGURAS 5 e 6).

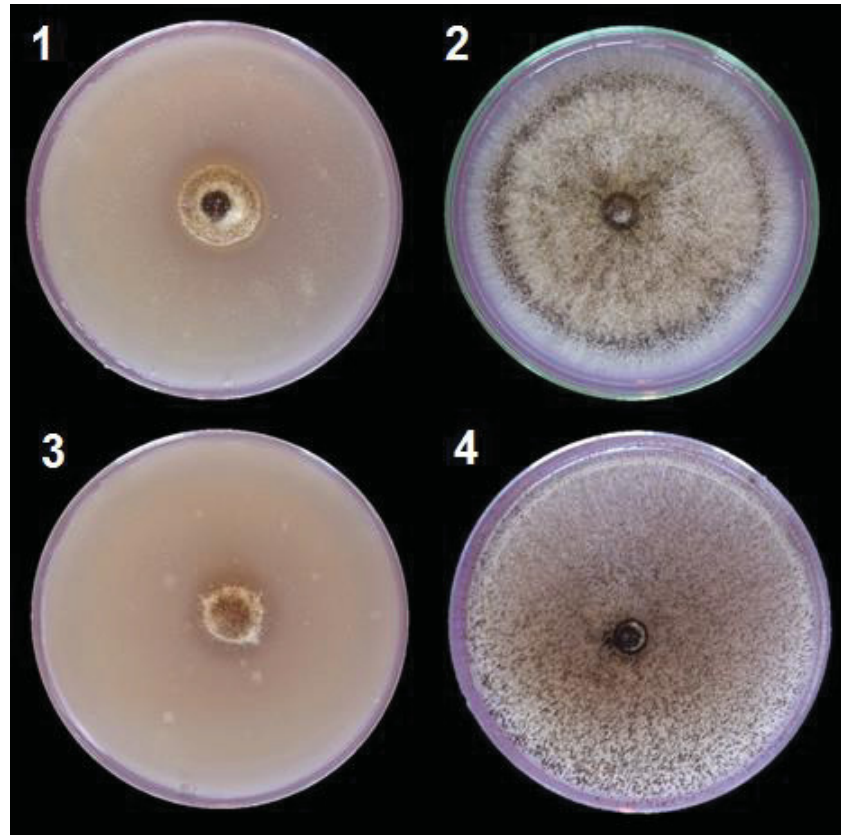
FIGURA 5 - TESTES DE INIBIÇÃO DE *Aspergillus* seção *Circumdati* PELA BACTÉRIA 113-2 A1 (MORFOTIPO 14).



FONTE: O AUTOR (2015)

NOTAS: TESTES DE INIBIÇÃO COM A BACTÉRIA 113-2 A1 FRENTE A *Aspergillus westerdjikiae* (1) E *Aspergillus ochraceus* (3). CONTROLE *Aspergillus westerdjikiae* (2) E *Aspergillus ochraceus* (4) EM 7 DIAS A $28^{\circ}\text{C} \pm 0,5$ EM MEIO ÁGAR SABOURAUD.

FIGURA 6 - TESTES DE INIBIÇÃO DE *Aspergillus* seção *Nigri* PELA BACTÉRIA 113-2 A1 (MORFOTIPO 14)



FONTE: O AUTOR (2015)

NOTAS: TESTES DE INIBIÇÃO COM A BACTÉRIA 113-2 A1 FRENTE A *Aspergillus niger* (1) E *Aspergillus carbonarius* (3). CONTROLE *Aspergillus niger* (2) e *Aspergillus carbonarius* (4) EM 7 DIAS A 28°C ±0,5 EM MEIO ÁGAR SABOURAUD.

As porcentagens de inibição calculadas variaram de 0% a 100%. As médias das porcentagens de inibição foram 45,58% para *A. niger*, 53,78% para *A. carbonarius* 62% para *A. ochraceus* e 67,6% para *A. westerdijkiae* (GRÁFICO 1 - 4). As medidas de inibição segundo o teste estatístico de variância foram significativas ($p < 0,001$), as inibições dos fungos *A. ochraceus* e *A. westerdijkiae* não apresentaram diferença estatística (APÊNDICE 1).

A porcentagem de inibição do *Aspergillus carbonarius*, foi de 53,78%, mostrando resultados semelhantes com Jiang *et al.* (2014) que utilizando a bactéria *Bacillus subtilis* analisaram a sua capacidade de inibir *Aspergillus carbonarius*, utilizando uma suspensão de células na concentração de 1×10^8 (UFC)/mL⁻¹. Após 5 dias da inoculação, observou-se uma significativa inibição ($p < 0,05$).

Shi *et al.* (2014) testaram a capacidade inibitória do *B. subtilis* contra *A. ochraceus* e *A. carbonarius* utilizando a técnica de cultura dupla, onde a bactéria é inoculada em um terço do diâmetro da placa e o fungo em dois terços do diâmetro. A porcentagem de inibição encontrada foi de 30% para *A. ochraceus* e 33,3% para *A. carbonarius*, esta inibição pode ter ocorrido por uma competição aos nutrientes do meio, por espaço ou por substâncias inibitórias difundidas pelo *B. subtilis*, segundo os autores.

Nos experimentos de Djossou *et al.* (2011), usando sete linhagens de *Lactobacillus plantarum*, somente duas linhagens apresentaram grande potencial inibitório, com zona de inibição entre 20 e 30 mm de diâmetro para três ensaios com a linhagem de *A. carbonarius* testada. Estes dados condizem com os encontrados no presente trabalho, mostrando que as porcentagens de inibição foram significativas ($P < 0,001$) em ambos os trabalhos.

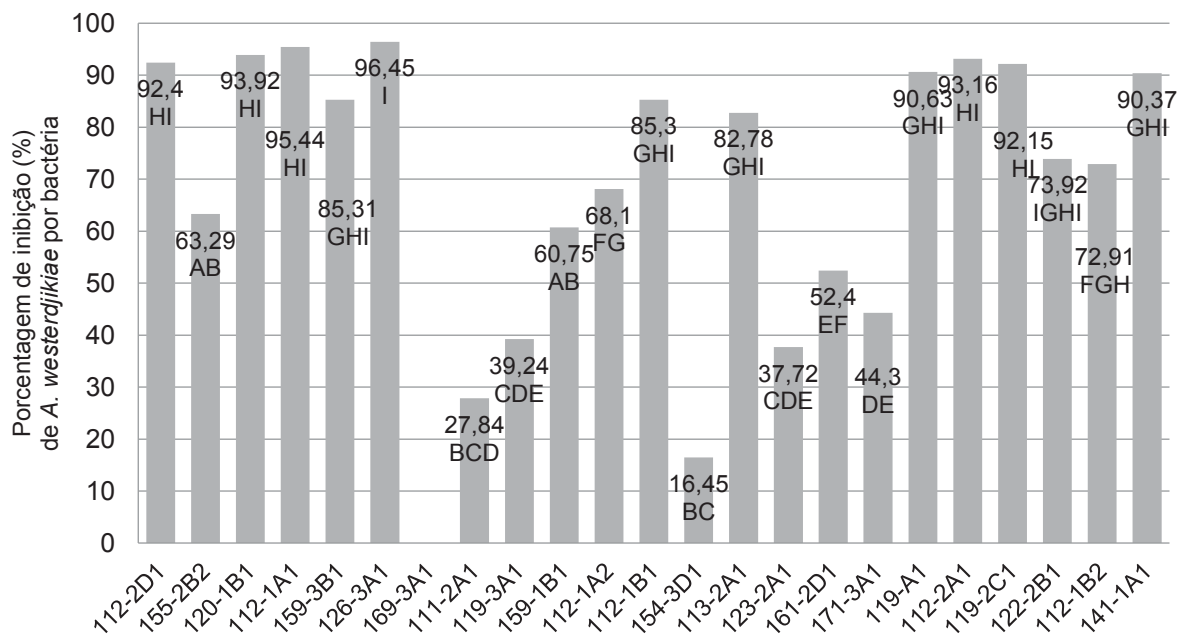
O fungo que teve uma menor inibição foi o *Aspergillus niger* (42,02%), corroborando com o trabalho de Gerez *et al.* (2014) que postularam se bactérias lácticas eram capazes de inibir *A. niger*. Inocularam no preparo de um pão a bactéria *Lactobacillus plantar* um isolado do trigo e testaram se essa era capaz de inibir um contaminante do pão o *A. niger*, encontrando uma porcentagem de inibição de 24%. Valério *et al.* (2009) trabalharam com bactérias lácticas na inibição de fungos contaminantes do trigo, *A. niger*, *P. roqueforti*, e *Endomyces fibuliger*. A interação das culturas foi avaliada em placas de microdiluição, encontrando que todas as bactérias inibiram o *E. fibuliger*. Os produtos da fermentação das bactérias influenciaram no crescimento de *P. roqueforti*, tendo porcentagens de inibição maiores que 65,52%. Três (3) das 17 bactérias não inibiram o crescimento de *A. niger*, os valores de inibição variaram de 23,78% a 99,96%. Estes dados corroboram com os obtidos no presente trabalho, mostrando que dentre vários fungos, o *A. niger* apresentou pouca inibição (45,56%). Mela *et al.* (2011) estudaram as interações que ocorrem durante a inibição fúngicas, confrontando a bactéria *Collimonas fungivorans* frente ao *A. niger*. A bactéria, presente no solo, sofreu um confronto direto (antagonismo) com o fungo, inibindo visivelmente seu crescimento pela placa do teste. Analisando as interações entre os microrganismos, observou-se uma disputa por fontes de nitrogênio, ocorrendo um sequestro de NH_3 , diminuição do pH e antibiose causada pela bactéria, inibindo assim a expansão das hifas. Estas

interações podem ter ocorrido durante os testes, gerando assim a inibição dos fungos filamentosos.

A média da porcentagem da inibição de *Aspergillus westerdijkiae* foi de 67,6%, enquanto que Petchkongkaew *et al.* (2008) encontrou 34%, quando isolaram 23 bactérias de soja fermentada da Tailândia. Doze isolados inibiram o crescimento de *A. flavus* e oito (8) inibiram o crescimento de *A. westerdijkiae*. A bactéria identificada como *Bacillus licheniformis*, foi capaz de inibir o *A. westerdijkiae* e o *A. flavus*, além de ser potente na degradação da aflatoxina B1 e da OTA.

Sete bactérias testadas nesse trabalho não foram capazes de inibir o *A. carbonarius* e o *A. niger*, estes resultados corroboram com os resultados obtidos por Kapetanakou *et al.* (2012), pois os pesquisadores analisaram a capacidade inibição de bactérias contra *A. carbonarius*, trabalhando com suspensões de bactérias nas concentrações 10^2 e 10^5 UFC/mL⁻¹, e atestaram que as bactérias não foram capazes de inibir o crescimento de *Aspergillus carbonarius*.

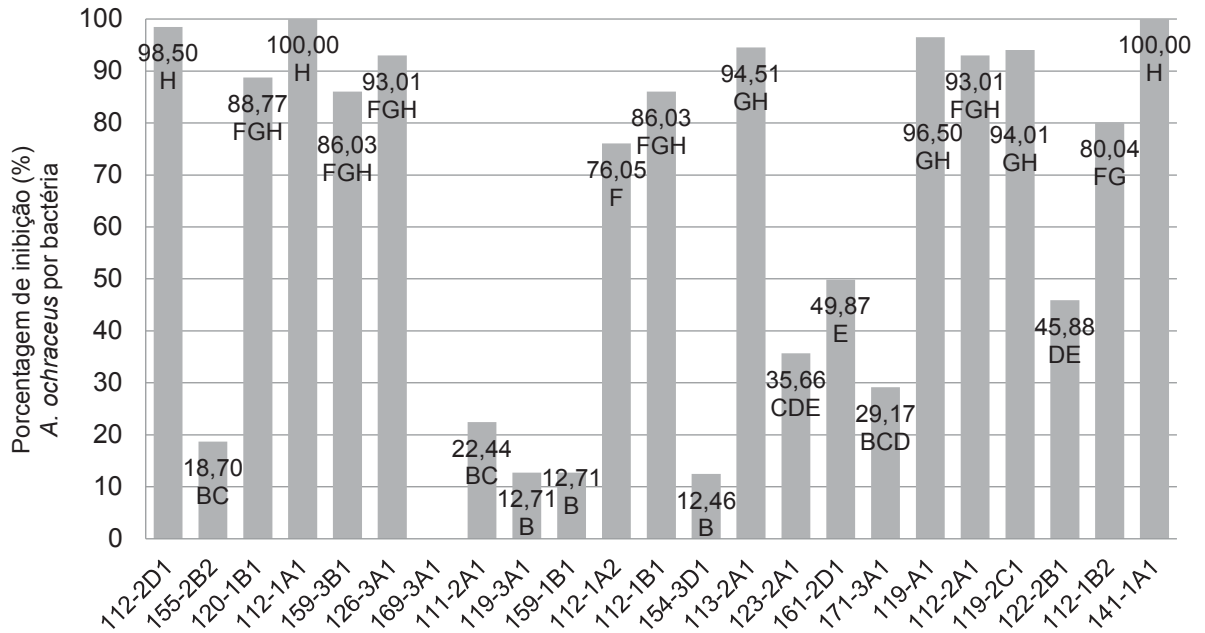
GRÁFICO 1 - PORCENTAGENS DE INIBIÇÃO DE *A. westerdijkiae* POR BACTÉRIAS.



FONTE: O AUTOR (2015)

NOTAS: OS VALORES SEGUIDOS PELA MESMA LETRA NÃO DIFEREM ESTATISTICAMENTE ENTRE SI.

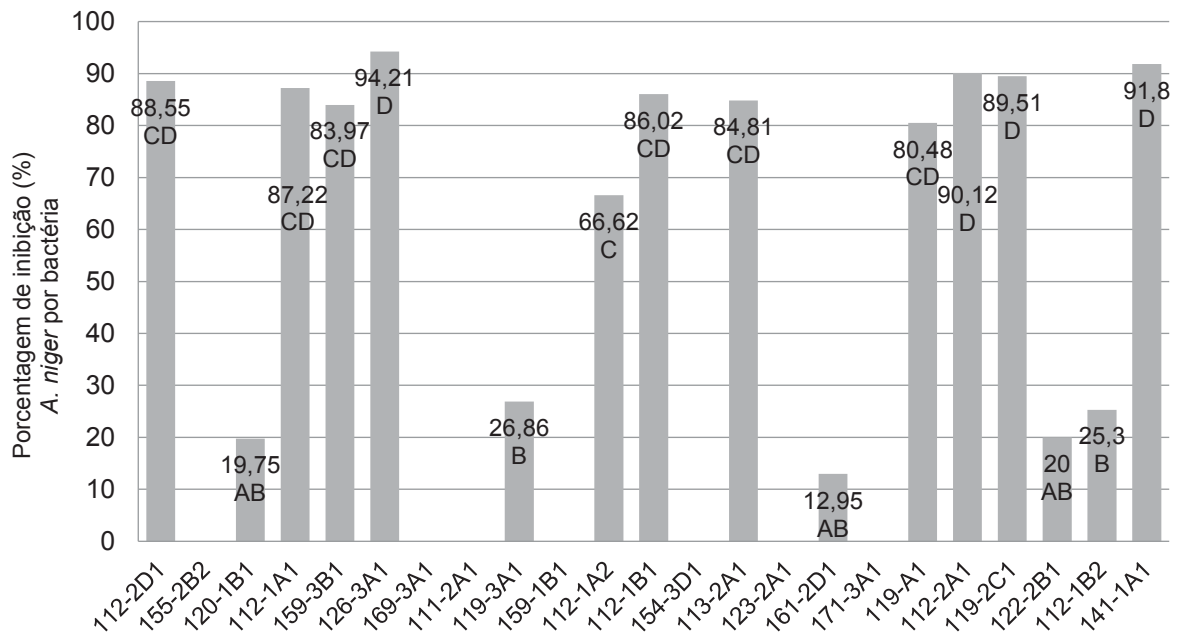
GRÁFICO 2 - PORCENTAGENS DE INIBIÇÃO DE *A.ochraceus* POR BACTÉRIAS.



FONTE: O AUTOR (2015)

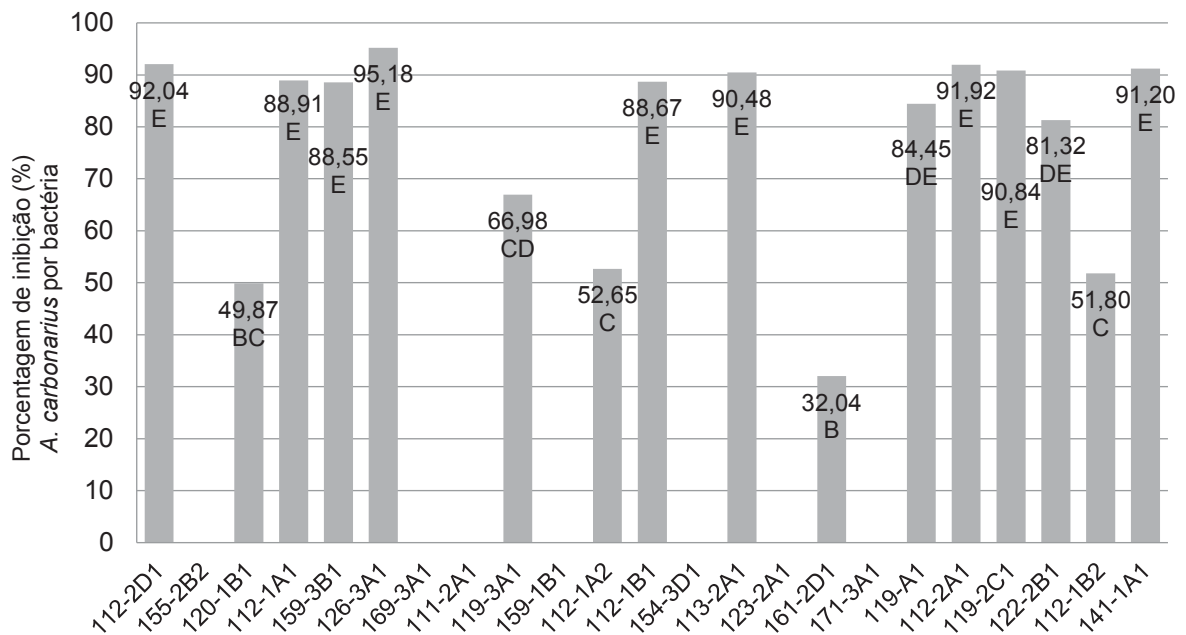
NOTAS: OS VALORES SEGUIDOS PELA MESMA LETRA NÃO DIFEREM ESTATISTICAMENTE ENTRE SI.

GRÁFICO 3 - PORCENTAGENS DE INIBIÇÃO DE *A.niger* POR BACTÉRIAS.



FONTE: O AUTOR (2015)

NOTAS: OS VALORES SEGUIDOS PELA MESMA LETRA NÃO DIFEREM ESTATISTICAMENTE ENTRE SI.

GRÁFICO 4 - PORCENTAGENS DE INIBIÇÃO DE *A. carbonarius* POR BACTÉRIAS.

FONTES: O AUTOR (2015)

NOTAS: OS VALORES SEGUIDOS PELA MESMA LETRA NÃO DIFEREM ESTATISTICAMENTE ENTRE SI.

As médias dos diâmetros de inibição variaram de 0 cm a 8,3 cm, sendo que ambos os fungos com menores diâmetros de inibição foram os *A. niger* e *A. carbonarius* que não foram inibidos pelas bactérias dos morfotipo 2, 7, 8, 10, 13, 15 e 17. Os maiores diâmetros de inibição foram realizados pelas bactérias dos morfotipos 4 e 23, que inibiram totalmente o crescimento do fungo *A. ochraceus*.

5.3.2 Leveduras

As leveduras isoladas de grãos de café foram utilizadas para a realização dos testes de inibição, em quintuplicata (FIGURAS 7 e 8). As porcentagens de inibição calculadas variaram de 0% a 100%. As médias das porcentagens de inibição foram 49,1% para *A. niger*, 53% para *A. carbonarius*, 79,5% para *A. ochraceus* e 78,3% para *A. westerdjkieae*. Apenas uma levedura não foi capaz de inibir o crescimento do *A. carbonarius* e *A. niger* (GRÁFICO 5 – 8) revelando que houve diferença significativa em relação as leveduras utilizadas na inibição dos fungos ($p < 0,001$).

As porcentagens de inibição dos fungos *A. westerdijkiae* e *A. ochraceus* não se diferiram estatisticamente, assim como as inibições geradas pelas leveduras 104 3 L1 (*Aureobasidium pullulans*), 104 3 L2 (*Aureobasidium pullulans*) e 107 1 F1 (*Pichia guilliermondii*), e as leveduras 103 3 L1 (*Pichia anomala*), CAT 1 L1 (*Pichia anomala*) e CAT 2 L1 (*Pichia caribbica*) (APÊNDICE 2).

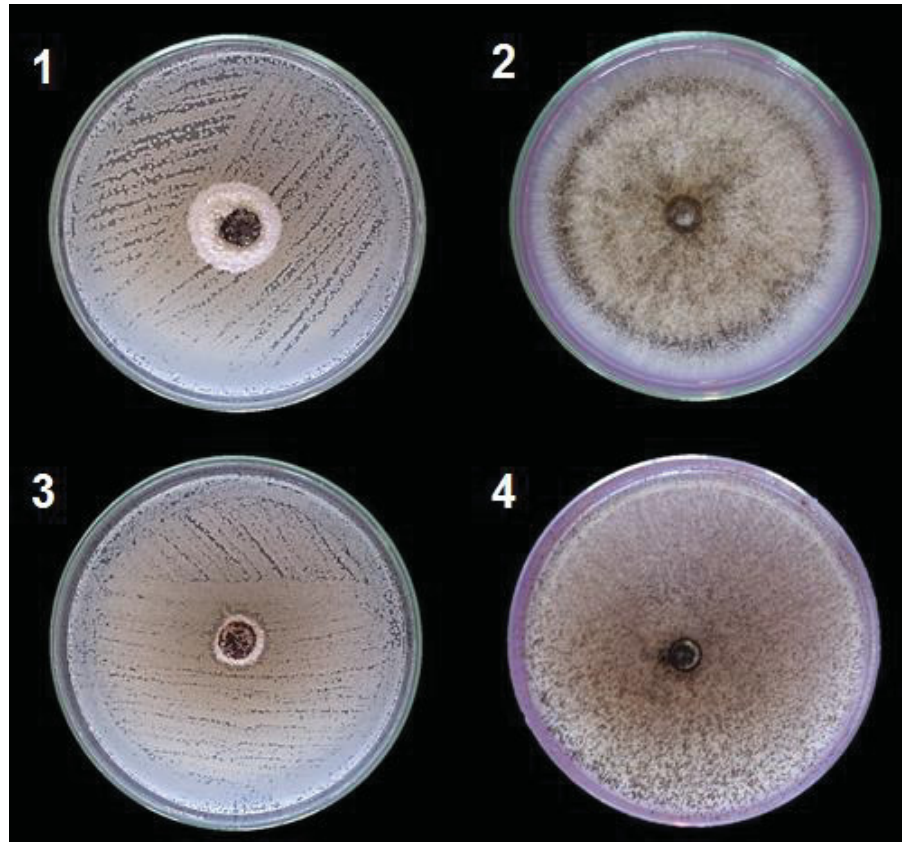
FIGURA 7 - TESTES DE INIBIÇÃO DE *Aspergillus* seção *Circumdati* PELA LEVEDURA *Pichia anomala* (CAT 1 L1).



FONTE: O AUTOR (2015)

NOTAS: TESTES DE INIBIÇÃO COM A LEVEDURA *Pichia anomala* (CAT 1 L1) FRENTE A *Aspergillus ochraceus* (1) E *Aspergillus westerdijkiae* (3). CONTROLE *Aspergillus ochraceus* (2) E *Aspergillus westerdijkiae* (4). OS TESTES FORAM REALIZADOS EM MEIO ÁGAR SABOURAUD POR 7 DIAS A 28°C ±0,5.

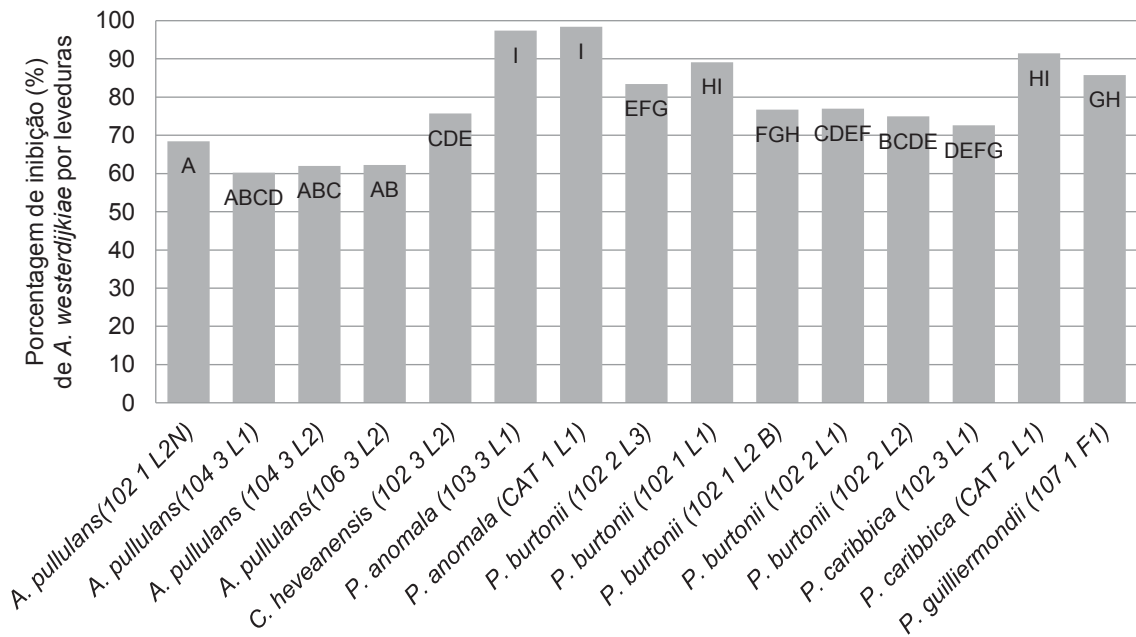
FIGURA 8 - TESTES DE INIBIÇÃO DE *Aspergillus* seção *Nigri* PELA LEVEDURA *Pichia anomala* (CAT 1 L1)



FONTE: O AUTOR (2015)

NOTAS: TESTES DE INIBIÇÃO COM A LEVEDURA *Pichia anomala* (CAT 1 L1) FRENTE A *Aspergillus niger* (1) E *Aspergillus carbonarius* (3). CONTROLE *Aspergillus niger* (2) E *Aspergillus carbonarius* (4). OS TESTES FORAM REALIZADOS EM MEIO ÁGAR SABOURAUD POR 7 DIAS A $28^{\circ}\text{C} \pm 0,5$.

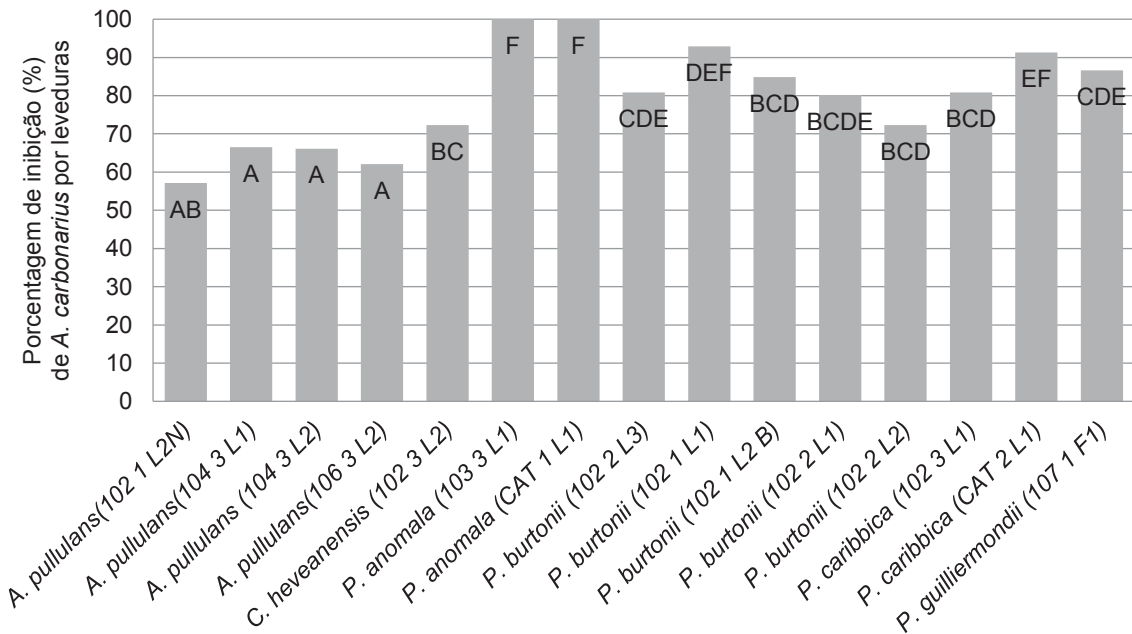
GRÁFICO 5 - PORCENTAGENS DE INIBIÇÃO DOS TESTES DE INIBIÇÃO DE LEVEDURAS CONTRA *A.westerdijkiae*.



FONTE: O AUTOR (2015).

NOTAS: OS VALORES SEGUIDOS PELA MESMA LETRA NÃO DIFEREM ESTATISTICAMENTE ENTRE SI.

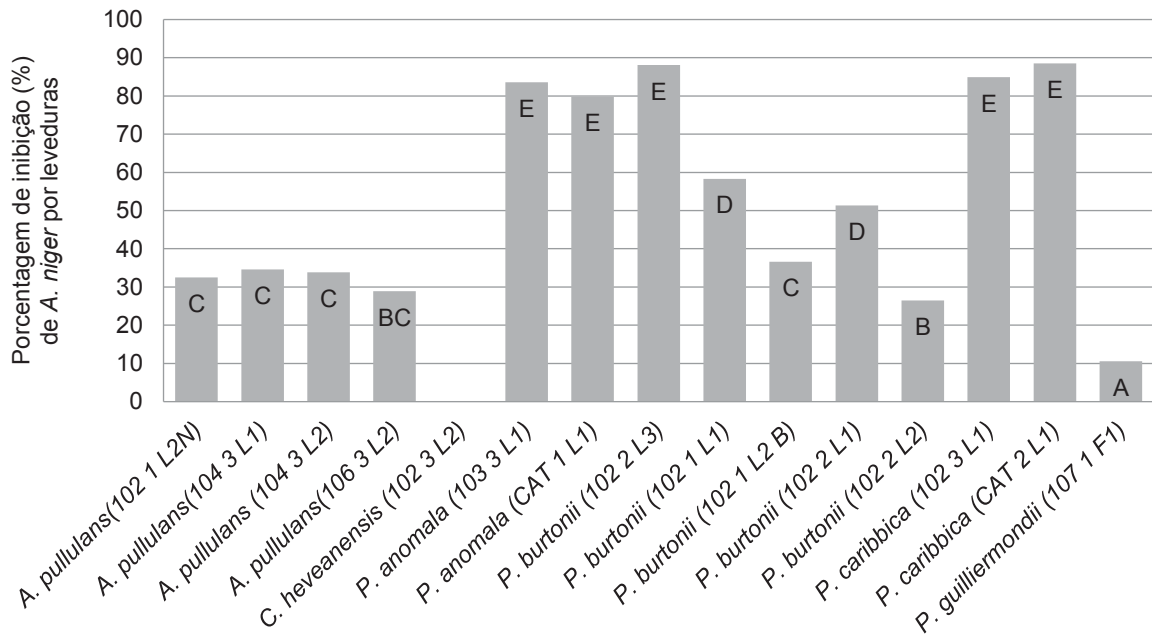
GRÁFICO 6 - PORCENTAGENS DE INIBIÇÃO DOS TESTES DE INIBIÇÃO DE LEVEDURAS CONTRA *A.ochraceus*.



FONTE: O AUTOR (2015).

NOTAS: OS VALORES SEGUIDOS PELA MESMA LETRA NÃO DIFEREM ESTATISTICAMENTE ENTRE SI.

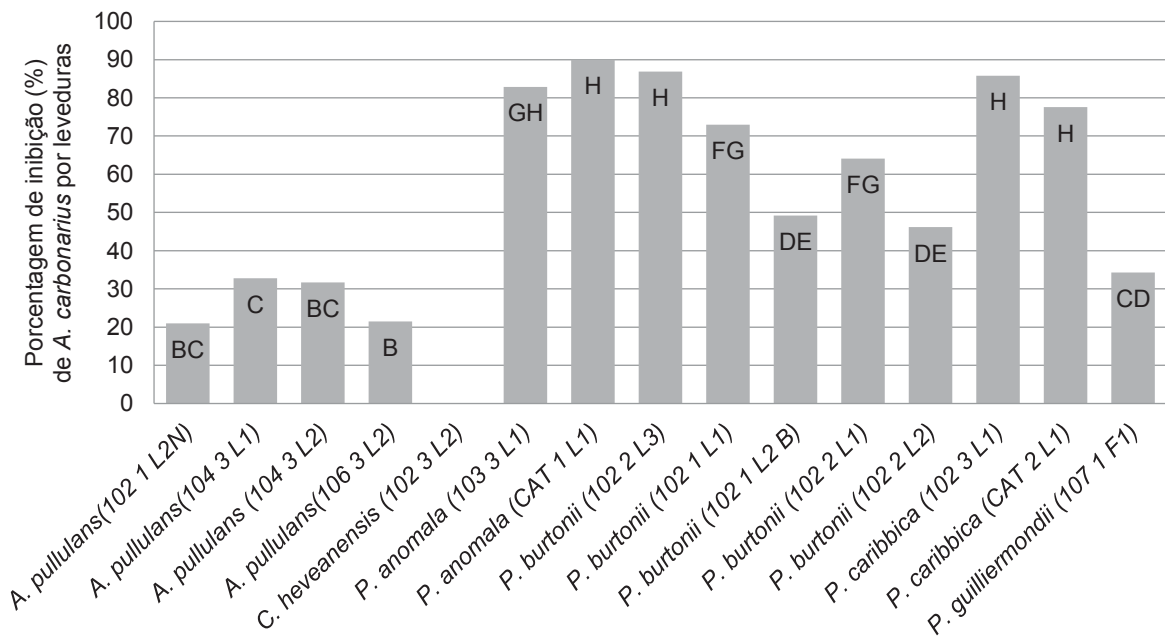
GRÁFICO 7 - PORCENTAGENS DE INIBIÇÃO DOS TESTES DE INIBIÇÃO DE LEVEDURAS CONTRA *A.niger*.



FONTE: O AUTOR (2015).

NOTAS: OS VALORES SEGUIDOS PELA MESMA LETRA NÃO DIFEREM ESTATISTICAMENTE ENTRE SI.

GRÁFICO 8 - PORCENTAGENS DE INIBIÇÃO DOS TESTES DE INIBIÇÃO DE LEVEDURAS CONTRA *A.carbonarius*



FONTE: O AUTOR (2015).

NOTAS: OS VALORES SEGUIDOS PELA MESMA LETRA NÃO DIFEREM ESTATISTICAMENTE ENTRE SI.

As médias de inibição variaram de 0 a 8,3 cm, as leveduras que apresentaram maior média de inibição foram as 103 3 L1 e CAT 1 L1 (*Pichia anomala*) inibindo totalmente o crescimento do *A. ochraceus*. Os fungos com maior crescimento no teste de inibição foram os *A. niger* e *A. carbonarius*, sendo que estes não foram inibidos apenas pela levedura 102 3 L2 (*Cryptococcus heveanensis*).

Diversas pesquisas corroboram com o presente estudo, como Cubaiu *et al.* (2012), que trabalhou com leveduras de vinho utilizando 5 linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* e 2 de *Kloeckera apiculata* para testar seu potencial inibitório contra o *A. carbonarius*. Todas as linhagens foram capazes de inibir o fungo, sendo que a porcentagem de inibição foi acima de 65%. Uma linhagem de *S. cerevisiae* foi a que mais inibiu o crescimento do fungo, além de inibir a produção de OTA em *A. carbonarius* e *A. ochraceus*, podendo ser utilizado como agente de controle biológico. Kapetanakou *et al.* (2012), pesquisaram o potencial de leveduras na inibição de *A. carbonarius*, utilizando a técnica de *pour-plate* com suspensões de 16 leveduras nas concentrações 10^2 e 10^5 UFC/mL⁻¹. Os maiores índices de inibição foram atingidos quando os pesquisadores trabalharam com uma suspensão de 10^5 UFC/mL⁻¹ de leveduras e uma de 10^2 esporos/mL⁻¹ para *A. carbonarius*, obtendo porcentagens de inibição de 61 a 93%.

Haggag e Abdall (2012) utilizaram as leveduras *Streptomyces aureofaciens* e *Rhodotorula glutinis* isoladas de folhas de uvas no Egito para testar se estas eram capazes de inibir o crescimento de *A. niger* e a sua produção de OTA. Foram utilizadas cinco linhagens de *A. niger*, e o método utilizado foi o de difusão em ágar. *R. glutinis* foi mais eficaz na atividade antifúngica e na inibição da produção de OTA, porém o *S. aureofaciens* também se mostrou eficaz nas análises realizadas.

Aspergillus ochraceus neste trabalho foi o fungo com maior média na porcentagem de inibição (79,5%), autores como Masoud e Kaltoft (2006) trabalharam com a sua inibição utilizando leveduras, e obtiveram resultados significativos, estes isolaram as leveduras *Pichia anomala*, *Pichia kluyveri* e *Hanseniaspora uvarum* de grãos de café, e utilizam uma suspensão de esporos nas concentrações 10^4 e 10^6 células/mL⁻¹ para inibir o crescimento do *A. ochraceus*. Os autores encontraram que todas as leveduras inibiram o fungo, as leveduras do gênero *Pichia* foram mais eficazes na inibição de crescimento de *A. ochraceus*, e na inibição de produção de OTA, sendo a *Pichia anomala* a melhor nos testes realizados.

Já Lotrakul *et al.* (2009) utilizando o método de disco difusão, testou se os extratos de leveduras, identificadas como *Aureobasidium pullulans* inibiram fungos do gênero *Aspergillus*. Os extratos apresentaram atividade inibitória contra *A. pullulans*, *A. terreus* e *A. flavus*, mas não foi capaz de inibir o *A. niger*, mostrando que há a dificuldade em inibir o crescimento do *A. niger*.

Estudo mostrou a capacidade inibitória de leveduras (incluindo *A. pullulans*) contra o *A. carbonarius*, Dimakopoulou *et al* (2008) isolaram estas leveduras de uvas usadas na fabricação de vinho na Grécia. O teste de inibição ocorreu em uvas colhidas, estas foram feridas e nos fermentos foi inoculado o fungo e a levedura, a avaliação da porcentagem de inibição foi calculada 8 dias após a inoculação. As porcentagens de inibição variaram de 14% a 92%, estes dados são semelhantes com os obtidos no presente trabalho, porém o *A. pullulans* inibiu em 92% o fungo, enquanto que neste trabalho a média das porcentagens de inibição foi de apenas 24,5%, mostrando que os mesmos microrganismos em ambientes diferentes apresentam atividades diferentes.

Zhu *et al.* (2015), testaram a inibição de *A. carbonarius* e *A. ochraceus* *in vitro* por leveduras. Utilizando 10 leveduras (dentre elas a *P. anomala*), foi observado que 5 destas (*Metschnikowia* aff. *fructicola*, *Pichia kluyveri*, *Pichia fermentans*, *Candida zemplinina*, *Saccharomyces cerevisiae*) foram capazes de inibir o crescimento do fungos, sendo que o fungo *A. carbonarius* foi inibido por todas as 5 leveduras, enquanto que o *A. ochraceus* foi inibido por apenas 3 leveduras, indicando que diferentes fungos do mesmo gênero são inibidos diferentemente.

5.3.3 Fungos

Os testes de inibição dos fungos do gênero *Aspergillus* potencialmente produtores de OTA por fungos isolados dos grãos de café foi realizado utilizando um fungo de cada morfotipo identificado, em quintuplicata. (FIGURA 9 e 10). Porém os fungos isolados dos grãos de café não foram eficazes na inibição dos fungos do gênero *Aspergillus*.

FIGURA 9 - TESTE DE INIBIÇÃO DE *Aspergillus carbonarius* POR *Aspergillus* seção *Circumdati* (107 3 F3).



FONTE: O AUTOR (2015)

NOTAS: TESTES DE INIBIÇÃO COM O FUNGO 107 3 F3 FRENTE A *Aspergillus carbonarius* (1). CONTROLE *Aspergillus carbonarius* (2). TESTE REALIZADOS EM MEIO ÁGAR SABOURAUD POR 7 DIAS A 28°C ±0,5.

FIGURA 10 - TESTE DE INIBIÇÃO DE *Aspergillus ochraceus* PELO FUNGO *Mucor* sp. (176 1 B2)



FONTE: O AUTOR (2015)

NOTAS: TESTES DE INIBIÇÃO COM O FUNGO 176 1 B2 FRENTE A *Aspergillus ochraceus* (1). CONTROLE *Aspergillus ochraceus* (2). TESTE REALIZADO EM MEIO ÁGAR SABOURAUD POR 7 DIAS A 28°C ±0,5.

Contudo, outros autores já realizaram testes de inibição utilizando fungos obtendo resultados positivos como Senthil *et al.* (2011) trabalharam com diversos microrganismos, entre eles os fungos como *Trichoderma harzianum* e *Trichoderma viride* para testar se estes eram eficazes na inibição de fungos que causavam danos as uvas. Os fungos patogênicos isolados de uvas foram os

Aspergillus carbonarius, *Penicillium expansum* e *Fusarium moniliforme*. Utilizando a técnica de crescimento radial para analisar o antagonismo dos fungos testados encontrou-se que o *T. viride* inibiu 10% o crescimento do *A. carbonarius*, 26,8% o *P. expansum* e 88,8% o *F. moniliforme*, enquanto que o *T. harzianum* inibiu 82,3% o *A. carbonarius*, 85,2% o *P. expansum* e 77% o *F. moniliforme*, mostrando assim o potencial de certos fungos na inibição de fungos causadores de danos em plantas.

Enquanto que na pesquisa de Kogkaki *et al.* (2015) trabalhando com a inibição de *A. carbonarius* por fungos não ocratoxigênicos isoladas de uvas, os resultados obtidos foram similares ao presente trabalho. Utilizando o método de cultura pareada observa-se que ocorreu um mutuo antagonismo no confronto entre *A. carbonarius* e *Aspergillus* seção *Nigri* e *A. flavus*. A maioria dos fungos, assim como neste trabalho, não inibiram o crescimento do *A. carbonarius*, como é o caso do *Penicillium spinulosum*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*, *Cladosporium* spp. e *B. cinerea* inoculados a 25°C.

Valero *et al.* (2007) isolaram fungos de uvas e testaram estes contra linhagens de *Aspergillus* pelo método da cultura pareada. A uma atividade de água de 0,97 o *Aspergillus carbonarius* foi inibido por *Trichoderma harzianum*, *A. alternata*, *Cladosporium herbarum*, *Penicillium decumbens* e *Penicillium janthinellum*, sendo que fungos do gênero *Trichoderma* já são conhecidos por produzir metabólitos antifúngicos (NAMPOOTHIRI *et al.*, 2004). Magan *et al.* (2010) analisaram a inibição de *A. carbonarius* por fungos (*Cladosporium* sp., *Epicoccum nigrum*, *Aspergillus* seção *Nigri*, *B. cinerea*, *Alternaria alternaria* e *Phoma* sp.) isolados de uvas em diferentes temperaturas. Encontraram que a 30°C nenhum fungo inibiu o crescimento de *A. carbonarius* e a 25°C e 20°C, os fungos cresceram sem interação. Estes resultados mostram a dificuldade de inibir o crescimento de fungos ocratoxigênicos com fungos não ocratoxigênicos.

A escassez de trabalhos mostrando a interação entre fungos não ocratoxigênio com fungos ocratoxigênicos é grande, há a falta de pesquisas relacionando estes dois grupos de fungos, justificando assim a carência de discussões sobre este tópico.

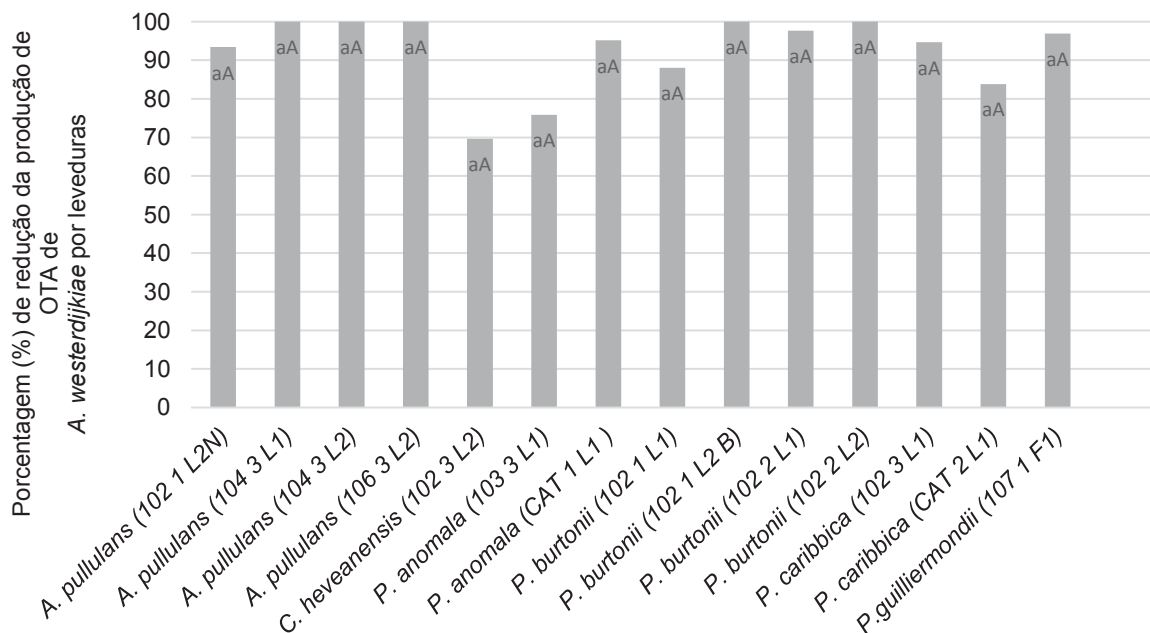
5.4 TESTE DE REDUÇÃO DA PRODUÇÃO DE OCRATOXINA A EM ESPÉCIES DE *Aspergillus*

Foi realizado o teste de redução da produção de OTA em *Aspergillus* sp. com 13 linhagens de leveduras. As porcentagens de redução da produção variaram de 0% a 100%, sendo que a levedura que mais reduziu a produção de OTA foi a *P. burtonii*, e o fungo que teve sua produção de OTA mais reduzida foi o *A. westerdijkiae*. As médias de redução da produção foram 83% para *A. westerdijkiae*, 57% para *A. ochraceus*, 77% para *A. niger* e 78% para *A. carbonarius* (GRÁFICO 9 – 12).

Gil-Serna *et al.* (2011) analisaram a produção de OTA por *Aspergillus* seção *Circumdati* isolados de vários alimentos. A produção de OTA por *A. ochraceus* isolado de pimenta vermelha foi de 12,1µg/L, enquanto que do *A. westerdijkiae* variou de 17,55 a 1183,8 µg/L, sendo que o *A. westerdijkiae* isolado do café do Brasil produziu 77 µg/L de OTA.

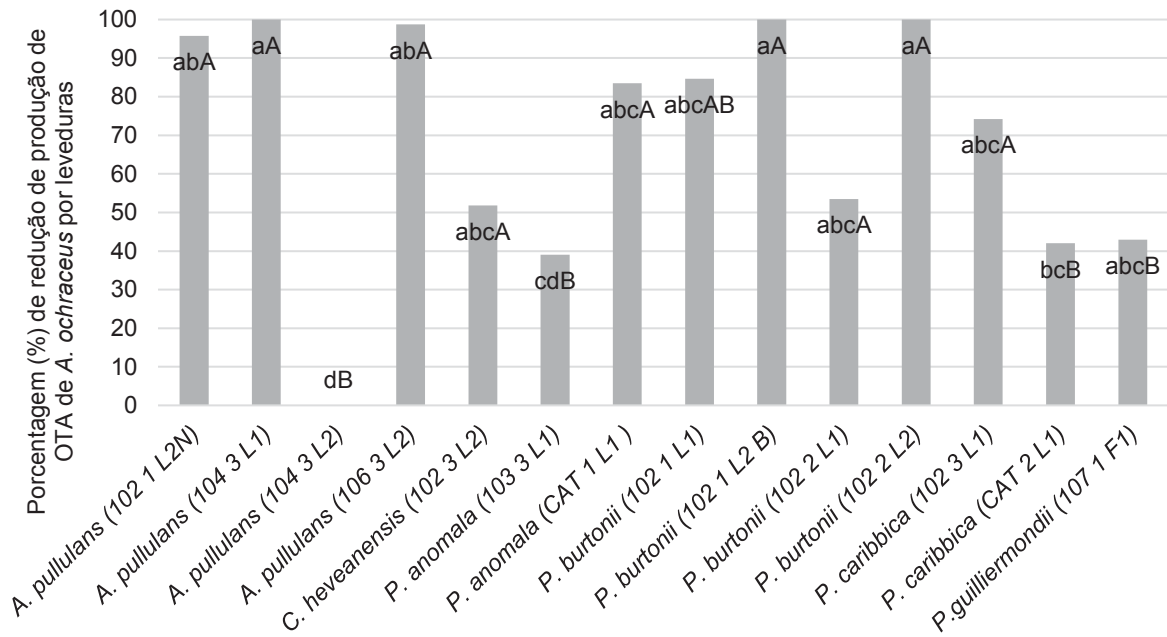
Kapetanakou *et al.* (2012) analisou a detoxificação de OTA por leveduras e bactérias. Encontrou que as leveduras reduziram em até 65% da OTA presente nas análises, enquanto que as bactérias reduziram de 2 a 25%.

GRÁFICO 9 - PORCENTAGENS DE REDUÇÃO DA PRODUÇÃO DE OTA DE *A. westerdijkiae* POR LEVEDURAS.



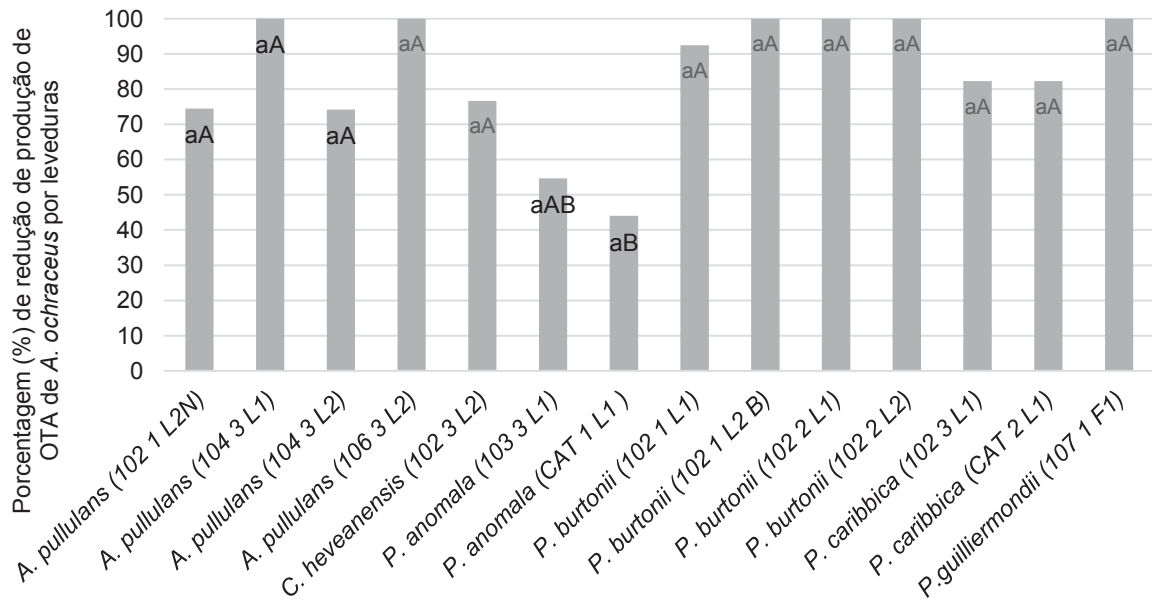
FONTE: O AUTOR (2015)

NOTAS: OS VALORES SEGUIDOS PELA MESMA LETRA NÃO DIFEREM ESTATISTICAMENTE ENTRE SI.

GRÁFICO 10 - PORCENTAGENS DE REDUÇÃO DA PRODUÇÃO DE OTA DE *A. ochraceus* POR LEVEDURAS

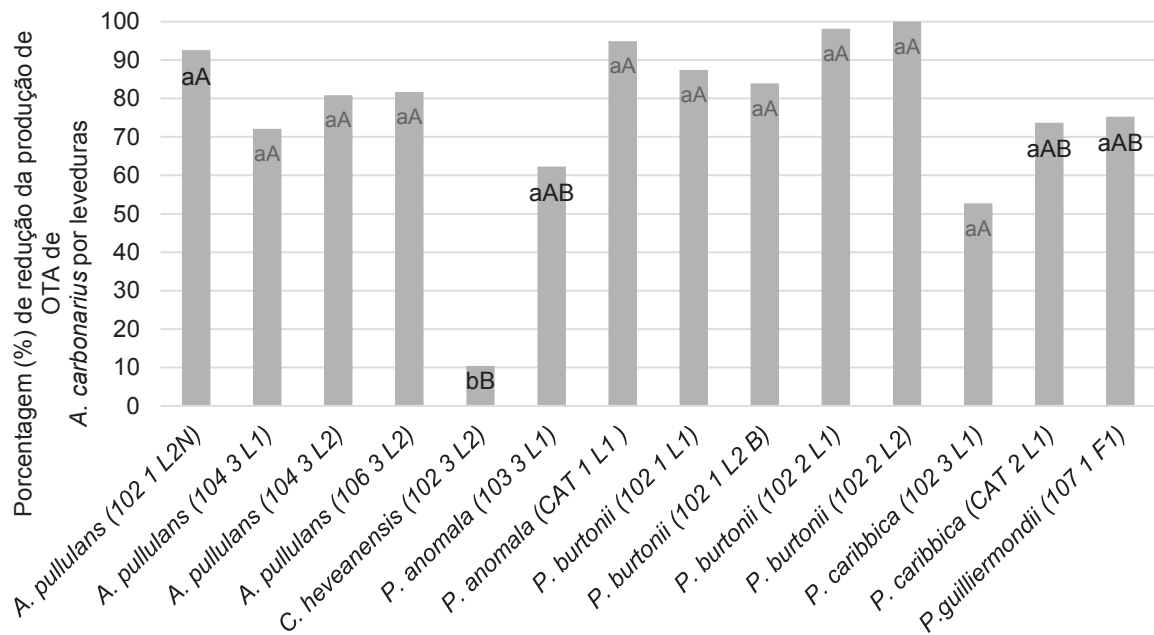
FONTE: O AUTOR (2015)

NOTAS: OS VALORES SEGUIDOS PELA MESMA LETRA NÃO DIFEREM ESTATISTICAMENTE ENTRE SI.

GRÁFICO 11 - PORCENTAGENS DE REDUÇÃO DA PRODUÇÃO DE OTA DE *A. niger* POR LEVEDURAS.

FONTE: O AUTOR (2015)

NOTAS: OS VALORES SEGUIDOS PELA MESMA LETRA NÃO DIFEREM ESTATISTICAMENTE ENTRE SI.

GRÁFICO 12 - PORCENTAGENS DE REDUÇÃO DA PRODUÇÃO DE OTA DE *A. carbonarius* POR LEVEDURAS

FONTE: O AUTOR (2015)

NOTAS: OS VALORES SEGUIDOS PELA MESMA LETRA NÃO DIFEREM ESTATISTICAMENTE ENTRE SI.

Masoud e Kalsoft (2006) encontraram que as leveduras *P. anomala* e *P. kluyveri* são capazes de prevenir a produção de OTA (níveis não detectáveis) por *A. ochraceus* quando estes foram co-inoculados. Cubaiu *et al.* (2012) testaram a atividade de detoxificação da OTA produzida por *A. carbonarius* e *A. ochraceus* utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. O controle do fungo *A. carbonarius* produziu $0,3 \pm 0,1 \mu\text{g/mL}^{-1}$, e quando este era co-inoculado com a levedura estas inibiram completamente a produção de OTA.

Patharajan *et al.* (2011), trabalhando com 6 leveduras, dentre elas a *P. guilliermondii* onde foi avaliada a degradação de OTA em diferentes temperaturas. *P. guilliermondii* degradou a OTA a 25°C com porcentagens de inibição variando de 17,8% (24 horas de incubação da levedura com OTA) 49,3% (15 dias de incubação), enquanto que a 30°C as variações foram de 18,4% (24 horas de incubação) a maior porcentagem de 65,3% (15 dias de incubação), mostrando que 30°C foi a temperatura ótima para a degradação de OTA para *P. guilliermondii*. Fiori *et al.* (2014) obtiveram dados semelhantes aos deste trabalho onde, utilizando 4 leveduras que já haviam sido estudadas como sendo inibidoras do crescimento de *P. expansum* analisaram se estas reduziam a concentração de OTA em suco de uva. As leveduras

Candida intermedia, *Cyberlindnera jadinii*, *Lachancea thermotolerans* e *Candida friedrichii* cresceram em suco de uva contendo OTA a 20ng/mL, e *C. intermedia* reduziu em 73% a OTA do suco, enquanto que *L. thermotolerans* e *C. friedrichii* reduziram em 75% e 70% respectivamente. As médias de redução encontradas no presente trabalho (83%, 57%, 77% e 78%) se assemelham ao trabalho anteriormente citado, mostrando o potencial de leveduras na redução de OTA.

De Felice *et al.* (2008) testaram o potencial de *A. pullulans* na degradação da OTA *in vitro* produzido pelos fungos *A. carbonarius* e *Aspergillus* seção *Nigri*. Primeiramente as leveduras foram inoculadas em um meio de cultura contendo 0,8 µg/mL de OTA, todas as leveduras reduziram a toxina em mais de 50%, assim como no presente trabalho (com exceção da amostra 104 3 L2 inibindo o fungo *A. ochraceus*). Quando as leveduras foram co-inoculadas em uvas com o fungo, as leveduras inibiram de 70% a 75% a ocratoxina A, a degradação foi confirmada pela presença do OT α e L- β -phenilalanina, que são produtos da degradação de OTA.

Schatzmayr *et al.* (2003), analisaram a detoxificação da OTA pelas leveduras dos gêneros *Trichosporon*, *Rhodotorula* e *Cryptococcus*. Estas foram inoculadas em meio contendo OTA, observando a detoxificação da toxina que variou de 40 a 100% a 25°C e de 80 a 100% a 35°C, os autores relataram que ela é mais degradada a 35°C do que a 25°C, indicando que os resultados do presente trabalho poderiam ser ainda mais expressivos se os testes fossem conduzidos a uma temperatura superior a temperatura utilizada.

Não consta na literatura até o momento dados sobre a redução da produção de OTA pelas leveduras *P. burtonii*, *P. caribbica* e *C. heveanensis*.

6. CONCLUSÕES

Foram isolados fungos filamentosos e bactérias Gram-positivas de grãos de café verde. Comparando os fungos isolados do gênero *Aspergillus* seção *Nigri*, *Aspergillus* seção *Circumdati* com a concentração de OTA analisada nos grãos de café, encontrou-se que a população dos fungos negros, inibe o crescimento dos fungos marrons, e esta inibição irá acarretar na diminuição da concentração de OTA nos grãos. Os microrganismos isolados de grãos de café verde possuem potencial inibitório frente a fungos do gênero *Aspergillus* produtores de ocratoxina A. As bactérias e leveduras utilizadas apresentaram potencial na inibição do crescimento de *A. ochraceus*, *A. westerdijkiae*, *A. carbonarius* e *A. niger*, sendo o *A. westerdijkiae* o mais inibido. Os fungos isolados de grãos de café não apresentaram atividade inibitória frente aos do gênero *Aspergillus* produtores de OTA, sugere-se realizar novos testes com outras metodologias para a confirmação destes resultados. Foram identificadas as leveduras *Pichia anomala*, *Pichia burtonii*, *Pichia caribbica*, *Pichia guilliermondii*, *Aureobasidium pullulans* e *Cryptococcus heveanensis* isoladas dos grãos de café, nas análises de redução da produção da toxina encontrou-se que a maioria das leveduras reduziu a produção de OTA em até 100%. Estes dados mostram o potencial dos microrganismos isolados neste trabalho como possíveis agentes no controle de espécies de *Aspergillus*.

REFERÊNCIAS

- ABRUNHOSA, L. J. **Estratégias para o controle de ocratoxina A em alimentos**. 236 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química e Biológica) - Escola de Engenharia, Universidade do Minho, Portugal, 2008.
- ABRUNHOSA, L.; PATERSON, R. R. M.; VENÂNCIO, A. Biodegradation of Ochratoxin A for Food and Feed Decontamination. **Toxins**, v. 2, n. 5, p. 1078-1099, 2010.
- ALMEIDA, A. P. D.; ALABURDA, J.; SHUNDO, L.; RUVIERI, V.; NAVAS, S. A., LAMARDO, L. C. A.; SABINO, M. Ochratoxin A in Brazilian instant coffee. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 300-303, 2007.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 25, p. 3389-3402, 1997.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DO CAFÉ (ABIC)**. Disponível em: <<http://www.abic.com.br>> Acesso em: 28/01/2015.
- AVALLONE, S.; GUYOT, B.; BRILLOUET, J.; OLGUIN, E.; GUIRAUD, J. Microbiological and Biochemical Study of Coffee Fermentation. **Current Microbiology**, v. 42, p. 252-256, 2001.
- BADALI, H.; CARVALHO, V. O.; VICENTE, V.; ATTILI-ANGELIS, D.; WIATKOWSKI, I. B.; GERRITS VAN DEN ENDE, A. H. G.; DE HOOG, G. S. *Cladophialophora saturnica* sp. nov., a new opportunistic species of *Chaetothyriales* revealed using molecular data. **Medical Mycology**, v. 47, p. 55-66, 2009.
- BATISTA, L. R.; CHALFOUN, S. M.; SILVA, C. F.; CIRILLO, M.; VARGA, E. A.; SHWAN, R. F. Ochratoxin A in coffee bean (*Coffea Arabica* L.) processed by dry and wet methods). **Food Control**, v. 20, p. 784-790, 2009.
- BATTACONE, G.; NUDDA, A.; PULINA, G. Effects of ochratoxin A on livestock production. **Toxins**, v. 2, p. 1796-1824, 2010.
- BAUTISTA-ROSALES, P. U.; CALDERON-SANTOYO, M.; SERVÍN-VILLEGAS, M.; OCHOA-ÁLVAREZ, N. A.; RAGAZZO-SÁNCHEZ, R. A. Action mechanisms of the yeast *Meyerozyma caribbica* for the control of the phytopathogen *Colletotrichum gloeosporioides* in mangoes. **Biological Control**, v. 65, p. 293-301, 2013.
- BENNETT, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n. 3, p. 497-516, 2003.
- BONFIELD, J.; BEAL, K.; JORDAN, M.; CHEN, Y.; STADEN, R. **The Staden Package Manual**. Editora: Copyright, 2002.

BOYSEN, M. E.; BJORNEHOLM, S.; SCHNURER, J. Effect of the biocontrol yeast *Pichia anomala* on interactions between *Penicillium roqueforti*, *Penicillium carneum*, and *Penicillium paneum* in moist grain under restricted air supply. **Postharvest Biology Technology**, v. 19, p. 173–179, 2000.

BOZZA, A.; TRALAMAZZA, S. M.; REYNAUD, D. T.; GABARDO, J.; VALASKI, J. C.; MARANGONI, P. R.; PIMENTEL, I. C. Isolamento de fungos associados a grãos de café cv. Iapar 59 de origem de solo e árvore em diferentes tempos de colheita. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 3, p. 1-6, 2009.

BRASIL. Resolução ANVS/MS nº 7, de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 09 de março de 2011.

BREITHOLTZ-EMANUELSSON, A.; MINERVINI, F.; HULT, K.; VISCONTI, A. Ochratoxin A in human serum samples collected in southern Italy from healthy individuals and individuals suffering from different kidney disorders. **International Journal of Food Microbiology**, v. 188, p. 60–66, 1994.

CHALFOUN, S. M.; BATISTA, L. R. Incidência de ocratoxina A em diferentes frações de grãos de café (*Coffea arabica* L.). **Coffee Science**, v. 1, n. 1, p. 28-35, 2006.

CHAN, Z.; TIAN, S. Interaction of antagonistic yeasts against postharvest pathogens of apple fruit and possible mode of action. **Postharvest Biology and Technology**, v. 36, p. 215–223, 2005.

CHEN, Y.; PRIOR, B. A.; SHI, G.; WANG, Z. A rapid PCR-based approach for molecular identification of filamentous fungi. **The Journal of Microbiology**, v. 49, p. 675-679, 2011.

CIEGLER, A.; BECKWITH, S. C.; JACKSON, L. K. Teratogenicity of patulin and patulin adducts formed with cysteine. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 32, p. 664–667, 1976.

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC), CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN ENOLOGÍA (CRA-ENO). Muñoz Moreno, M. R.; López, H. R.; Del Ray, B. L. R. G.; Poján, I. M. R.; Moruno, E. G.; Doria, F.; Costantini, A. Biological degradation of ochratoxin A into ochratoxin alpha. WO 2012/025657 A1, 01 mar 2012.

COUTO, F. A.; DE SOUZA, S. C.; MONTEIRO, M. C. P.; DA SILVA, D. M.; CIRILLO, M. A.; BATISTA, L. R. Diversity and association of filamentous fungi in coffee beans under organic and conventional cultivation. **African Journal of Microbiology Research**, v. 8, n. 26, p. 2505- 2512, 2014.

CUBAIU, L.; ABBAS, H.; DOBSON, A. D. W.; BUDRONI, M.; MIGHELI, Q. A *Saccharomyces cerevisiae* Wine Strain Inhibits Growth and Decreases Ochratoxin A Biosynthesis by *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus ochraceus*. **Toxins**, v. 4, p. 1468-1481, 2012.

- DE BARROS, F. C.; JULIATTI, F. C. Levantamento de fungos em amostras recebidas no laboratório de micologia e proteção de plantas da universidade federal de uberlândia, no período 2001-2008. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 28, n. 1, p. 77-86, 2012.
- DE CERAIN, A. L.; GONZALEZ-PENAS, E.; JIMENEZ, A.M.; BELLO, J. Contribution to the study of ochratoxin A in Spanish wines. **Food Additives and Contaminants**, v. 19, p. 1058–1064, 2002.
- DE FELICE, D. V.; SOLFRIZZO, M.; DE CURTIS, F.; LIMA, G.; VISCONTI, A.; CASTORIA, R. Strains of *Aureobasidium pullulans* can lower Ochratoxin A contamination in wine grapes. **Phytopathology**, v. 98, p. 1261-1270, 2008.
- DIETRICH, D. R.; HEUSSNER, A. H.; O'BRIEN, E. Ochratoxin A: Comparative pharmacokinetics and toxicological implications (experimental and domestic animals and humans). **Food Additives and Contaminants**, v. 22, n. 1, p. 45-52, 2005.
- DIMAKOPOULOU, M.; TJAMOS, S. E.; ANTONIOU, P. P.; PIETRI, A.; BATTILANI, P.; AVRAMIDIS, N.; MARKAKIS, E. A.; TJAMOS, E. C. Phyllosphere grapevine yeast *Aureobasidium pullulans* reduces *Aspergillus carbonarius* (sour rot) incidence in wine-producing vineyards in Greece. **Biological Control**, v. 46, p. 158–165, 2008.
- DJOSSOU, O.; PERRAUD-GAIME, I.; MIRLEAU, F. L.; RODRIGUEZ-SERRANO, G.; KAROU, G.; NIAMKE, S.; OUZARI, I.; BOUDABOUS, A.; ROUSSOS, S. Robusta coffee beans post-harvest microflora: *Lactobacillus plantarum* sp. as potential antagonist of *Aspergillus carbonarius*. **Anaerobe**, v. 17, p. 267-272, 2011.
- DROBY, S.; HOFSTEIN, R.; WILSON, C. L.; WISNIEWSKI, M.; FRIDLENDER, B.; COHEN, L.; WEISS, B.; DAUS, A.; TIMAR, D.; CHALUTZ, E. Pilot testing of *Pichia guilliermondii*: A biocontrol agent of postharvest diseases of citrus fruit. **Biological Control**, v. 3, p. 47-52, 1993.
- DRUVEFORS, U. A.; SCHNURER J. Mold-inhibitory activity of different yeast species during airtight storage of wheat grain. **FEMS Yeast Research**, v.5, p. 373–378, 2005.
- DUPONT, S.; CARRE-MLOUKA, A.; DESCARREGA, F.; ERESKOVSKY, A.; LONGEON, A.; MOURAY, E.; FLORENT, I.; BOURGUET-KONDRACKI, M. L. Diversity and biological activities of the bacterial community associated with the marine sponge *Phorbas tenacior* (Porifera, Demospongiae). **Letters in Applied Microbiology**, v. 58, n. 1, p. 42-52, 2014.
- DURAND, N.; EL SHEIKHA, A. F.; Suarez-Quiros, M.; Oscar, G.; Nganou, N. D.; Fontana-Tachon, A.; Montet, D. Application of PCR-DGGE to the study of dynamics and biodiversity of yeasts and potentially OTA producing fungi during coffee processing. **Food Control**, v. 34, p. 466-471, 2013.
- ECF- European Coffee Federation**. *Coffee facts and figures*. Amsterdam, 2006.
Disponível em:
< <http://www.ecfcoffee.org/images/stories/temporary/Coffee%20ma>

rket%20facts%20and%20figures%2010%20August%202006%20checked%2020%20October%202008.pdf> Acesso em: 28/01/2015.

EDGINTON, L. V.; KNEW, K.L.; BARRON, G. L. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds, **Phytopatology**, v. 62, n. 7, p. 42-44, 1971.

EFSA (European Food Safety Authority), 2006. Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to ochratoxin A in food. The EFSA Journal, v. 365, p. 1 – 56, 2006.

FERREIRA, G. F. P.; NOVAES, Q. S.; BATISTA, L. R.; SOUZA, S. E.; AZEVEDO, G. B.; SILVA, D. M. Fungos associados a grãos de café (*Coffea arabica* L.) beneficiados no sudoeste da Bahia. **Summa Phytopathologica**, v. 37, n. 3, p. 98-102, 2011.

FIORI, S.; URGEGHE, P. P.; HAMMAMI, W.; RAZZU, S.; JAOUA, S.; MIGHELI, Q. Biocontrol activity of four non- and low-fermenting yeast strains against *Aspergillus carbonarius* and their ability to remove ochratoxin A from grape juice. **International Journal of Food Microbiology**, v. 189, p. 45–50, 2014.

Food and agriculture organization of the united nations (FAO). Enhancement of Coffee Quality through the Prevention of Mould Formation - Final Technical Report. Roma, 2006. Disponível em < http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/agns/pdf/coffee/FTR2006.pdf> Acesso em 02/7/2013.

Food and agriculture organization of the united nations (FAO). Ochratoxin A contamination in coffee. Disponível em < <http://www.fao.org/food/food-safety-quality/a-z-index/coffee/en/>> Acesso em 02/2/2015.

Food and Agriculture Organization of the United Nations. Fao Food And Nutrition Paper 74. IPCS – International Programme on Chemical Safety, Geneva, 2001.

FREDLUND, E.; DRUVEFORS, U.; BOYSEN, M.E.; LINGSTEN, K-J.; SCHNÜRER, J. Physiological characteristics of the biocontrol yeast *Pichia anomala* J121. **FEMS Yeast Research**, v. 2, p. 395-402, 2002.

GALTIER, P.; ALVINERIE, M.; CHARPENTEAU, J.L. The pharmacokinetic profiles of ochratoxin A in pigs, rabbits and chickens. **Food Cosmetics Toxicology**, v. 19, n. 6, p. 735-8, 1981.

GELDERBLOM, W. C. A.; K. JASKIEWICZ, K.; MARASAS, W. F. O.; THIEL, P. G.; HORAK, R. M.; VLEGGAR, R.; KRIEK, N. P. J. Fumonisin- novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, p. 1806–1811, 1988.

GEREZ, C. L.; DALLAGNOL. A.; PONSONE, L.; CHULZE, S.; DE VALDEZ, G. F. Ochratoxin A production by *Aspergillus niger*: effect of water activity and a biopreserver formulated with *Lactobacillus plantarum* CRL 778. **Food Control**, v. 45, p. 115-119, 2014.

GIL-SERNA, J.; VÁZQUEZ, C.; SANDINO, F. G.; VALLE, A. M.; GONZÁLEZ-JAÉN, M. T.; PATIÑO, B. Evaluation of growth and ochratoxin A production by *Aspergillus steynii* and *Aspergillus westerdijkiae* in green-coffee based medium under different environmental conditions. **Food Research International**, v. 61, p. 127–131, 2014.

GIL-SERNA, J.; VÁZQUEZ, C.; SARDIÑAS, N.; GONZÁLEZ-JAÉN, M. T.; PATIÑO, B. 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, p. 343-345, 2011.

GLASS, N. L.; DONALDSON, G. C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p.1323-1330, 1995.

GOLLUCKE, A. P. B.; TANIWAKI, M. H. and TAVARES, D. Q. Survey on ochratoxin A in Brazilian green coffee destined for exports. **Food Science Technology**, v. 24, p. 641-645, 2004.

GONZÁLEZ, I.; AYUSO-SACIDO, A.; ANDERSON, A.; GENILLOUD, O. Actinomycetes isolated from lichens: Evaluation of their diversity and detection of biosynthetic gene sequences. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 54, p. 401–415, 2005.

HAGGAG, W. M.; ABDALL A. M. Evaluation of *Streptomyces aureofaciens* and *Rhodotorula glutinis* Against Ochratoxin A Producing *Aspergillus nigr* in Grapevines. **Journal of Microbiology Research**, v. 2, n. 6, p. 170-175, 2012.

HASHEM, M.; ALAMRI, S. The biocontrol of postharvest disease (*Botryodiplodia theobromae*) of guava (*Psidium guajava* L.) by the application of yeast strains. **Postharvest Biology and Technology**, v. 53, p. 123-130, 2009.

HARRISON, L. R.; COLVIN, B. M.; GREENE, J. T.; NEWMAN, L. E.; COLE J. R. Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B1 a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 2, p. 217–221, 1990.

HARWIG, J.; KUIPER-GOODMAN, T.; SCOTT, P. M. Microbial food toxicants: Ochratoxin. **Handbook of Foodborne Diseases of Biological Origin**, Boca Raton, FL. CRC Pres, pp 193-238. 1982.

HENDRICKSE, R. G. Of sick turkeys, kwashiorkor, malaria, perinatal mortality, heroin addicts and food poisoning: research on the influence of aflatoxins on child health in the tropics. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 91, p. 787– 793, 1997.

HIDY, P. H.; BALDWIN, R. S.; GREASHAM, R. L.; KEITH, C. L.; MCMULLEN, J. R. Zearalenone and some derivatives: production and biological activities. **Advances in Applied Microbiology**, v. 22, p. 59–82, 1977.

IAMANAKA, B.T.; TEIXEIRA, A. A.; TEIXEIRA, A. R. R.; COPETTI, M. V.; BRAGAGNOLO, N.; TANIWAKI, M. H. The mycobiota of coffee beans and its influence on the coffee beverage. **Food Research International**, v. 62, p. 353–358, 2014.

IARC - International Agency for Research on Cancer. Ochratoxin A. Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and micotoxins. Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. Lyon: IARC, v. 56, p. 489-452, 1993.

IARC - International Agency for Research on Cancer. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, v. 82, p. 1–556, 2002.

IPPOLITO, A., GHAOUTH, A.E., WILSON, C.L., WISNIEWSKI, M. Control of postharvest decay of apple fruit by *Aureobasidium pullulans* and induction of defense responses. **Postharvest Biology and Technology**, v. 19, p. 265–272, 2000.

JIANG, C.; SHI, J.; LIU, Y.; ZHU, C.; Inhibition of *Aspergillus carbonarius* and fungal contamination in table grapes using *Bacillus subtilis*. **Food Control**, v. 35, p. 41-48, 2014.

JUSZKIEWICZ, T.; PISKORSKA-PLISZCZYNSKA, J.; WISNIEWSKA, H. Ochratoxin A in laying hens: Tissue deposition and passage into eggs. **Mycotoxins and Phycotoxins. Proceedings of the V International IUPAC Symposium**, Viena, Technical University, 1-2 setembro, p. 122-125, 1982.

KAPETANAKOU, A. E.; KOLLIAS, J. N.; DROSINOS, E. H.; SKANDAMIS, P. N. Inhibition of *A. carbonarius* growth and reduction of ochratoxin A by bacteria and yeast composites of technological importance in culture media and beverages. **International Journal of Food Microbiology**, v. 152, p. 91–99, 2012.

KERN, M. E.; BLEVINS, K. S. **Micologia médica – Texto e Atlas**. 2. ed. São Paulo: Editorial Premier, 1999.

KHOURY A. E.; ATOUI, A. Ochratoxin A: General Overview and Actual Molecular Status. **Toxins (Basel)**, v. 2, n. 4, p. 461–493, 2010.

KOGKAKI, E. A.; NATSKOULIS, P. I.; MAGAN, N.; PANAGOUE, E. Z. Effect of interaction between *Aspergillus carbonarius* and nonochratoxigenic grape-associated fungal isolates on growth and ochratoxin A production at different water activities and temperatures. **Food Microbiology**, v. 46, p. 521-527, 2015.

KONEMAN, E. W. ; WILLIAM, M.J. ; SCHRECKENBERGER, P.C. ; WINN, W.C. ; ALLEN, S.D. ; WOODS, G.L. **Diagnóstico Microbiológico: texto e atlas colorido**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1565p., 2008.

KUIPER-GOODMAN, T.; SCOTT, P. M.; WATANABE, H. Risk assessment of the mycotoxin zearalenone. **Regulatory Toxicology Pharmacology**, v. 7, p. 253–306, 1987.

LI, S.; MARQUARDT, R. R.; FROHLICH, A. A.; VITTI, T. G.; CROW, G. Pharmacokinetics of Ochratoxin A and Its Metabolites in Rats. **Toxicology And Applied Pharmacology**, v. 145, p. 82–90, 1997.

LIMA, G.; IPPOLITO, A.; NIGRO, F.; SALERNO, M. Effectiveness of *Aureobasidium pullulans* and *Candida oleophila* against postharvest strawberry rots. **Postharvest Biology and Technology**, v. 10, p. 169- 178, 1996.

LÓPEZ, P. V. A. **Bioprospecção de extratos de *Croton urucurana* Baill e seus fungos endofíticos**. 138 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil, 2010.

LOTTRAKUL, P.; DEENARN, P.; PRASONGSUK, S.; PUNNAPAYAK, H. Isolation of *Aureobasidium pullulans* from bathroom surfaces and their antifungal activity against some Aspergilli. **African Journal of Microbiology Research**, v. 3, n. 5, p. 253-257, 2009.

MAGAN, N.; ALDRED, D.; HOPE, R.; MITCHELL, D. Environmental Factors and Interactions with Mycobiota of Grain and Grapes: Effects on Growth, Deoxynivalenol and Ochratoxin Production by *Fusarium culmorum* and *Aspergillus carbonarius*. **Toxins**, v. 2, p. 353-366, 2010.

MALDONADO, L. A.; STACH, J. E. M.; PATHOM-AREE, W.; WARD, A. C.; BULL, A. T. B.. GOOLFELLOW, M. Diversity of cultivable actinobacteria in geographically widespread marine sediments. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 87, p. 11-18, 2005.

MANUAL DE SEGURANÇA E QUALIDADE PARA A CULTURA DO CAFÉ. Projeto PAS Campo, Convênio CNI/SENAI/SEBRAE/EMBRAPA. Brasília: EMBRAPA/SEDE, 2004. 83 p. (Série Qualidade e Segurança dos Alimentos).

MARIANO, R. L. R. Métodos de seleção *in vitro* para o controle microbiológico de patógenos de plantas. **Revista Anual de Patologia de Plantas**, v.1, p.369-409, 1993. In: LÓPEZ, P. V. A. **Bioprospecção de extratos de *Croton urucurana* Baill e seus fungos endofíticos**. 138 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil, 2010.

MARSHALL, E. Yellow rain experts battle over corn mold. **Science**, v. 221, p. 526–529, 1983.

MASOUD, W.; CESAR, L. B.; JESPERSEN, L.; JAKOBSEN, M. Yeast involved in fermentation of *Coffea arabica* in East Africa determined by genotyping and by direct denaturing gradient gel electrophoresis. **Yeast**, v. 21, p. 549–556, 2004.

MASOUD, W.; KALTOFT, C. H. The effects of yeasts involved in the fermentation of *Coffea arabica* in East Africa on growth and ochratoxin A (OTA) production by *Aspergillus ochraceus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 106, p. 229–234, 2006.

MATSUDA, Y.; WAKAI, T.; KUBOTA, M.; OSAWA, M.; SANPEI, A.; FUJIMAKI, S. Mycotoxins are conventional and novel risk biomarkers for hepatocellular carcinoma. **World Journal of Gastroenterology**, v. 19, n. 17, p. 2587-2590, 2013.

Meeting Report. Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumors in the Balkans. **Cancer Research**, v. 47, p. 3608-3609, 1987.

MELA, F.; FRITSCHKE, K.; DE BOER, W.; VAN VEEN, J. A.; DE GRAAFF, L. H.; VAN DEN BERG, M.; LEVEAU, J. H. J. Dual transcriptional profiling of a bacterial/fungal confrontation: *Collimonas fungivorans* versus *Aspergillus niger*. **The ISME Journal**, v. 5, p. 1494–1504, 2011.

MINERVINI, F.; GIANNOCCARO, A.; NICASSIO, M.; PANZARINI, G.; LACALANDRA, G. M. First evidence of placental transfer of ochratoxin A in horses. **Toxins (Basel)**, v. 5, n. 1, p. 84-92, 2013.

MITCHELL, D.; PARRA, R.; ALDRED, D.; MAGAN, N. Water and temperature relations of growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* strains from grapes in Europe and Israel. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, p. 439–445, 2004.

MOROI, K.; SUZUKI, S.; KUGA, T.; YAMAZAKI, M.; KANISAWA, M. Reduction of Ochratoxin A toxicity in mice treated with phenylalanine and phenobarbital. **Toxicology letters**, v.25, p. 1-5, 1985.

MULÈ, G.; SUSCA, A.; STEA, G.; MORETTI, A. A species-specific PCR assay based on the calmodulin partial gene for identification of *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum* and *F. Subglutinans*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 110, p. 495-502, 2004.

MUNRO, I. C.; MOODIE, C. A.; KUIPER-GOODMAN, T.; SCOTT, P. M.; GRICE, H. C. Toxicologic changes in rats fed graded dietary levels of Ochratoxin A. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** V.28, p. 180-188, 1974.

NAEBPOOR, F.; MOMENI, M.; DEHKORDI, F. S. Incidence of ochratoxin A in raw and salted dried fruits using high performance liquid chromatography. **Journal of Toxicological Sciences**, v. 5, n. 1, p. 01-06, 2013.

NAMPOOTHIRI, K.M.; BAIJU, T.V.; SANDHYA, C.; SABU, A.; SZAKACS, G.; PANDEY, A. Process optimization for antifungal chitinase production by *Trichoderma harzianum*. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 1583–1590, 2004.

National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Padronização dos testes de sensibilidade a antimicrobianos por disco-difusão: norma aprovada. 8a ed. Brasília: ANVISA; 2003.

NAYAK, S.; HARSHITHA, M. J.; SAMPATH, C.; ANILKUMAR, H. S.; RAO, C. V. Isolation and characterization of caffeine degrading bacteria from coffee pulp. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 11, p. 86-91, 2012.

NGANOU, N. D.; DURAND, N.; TATSADJIEU, N. L.; MÉTAYER, I.; MONTET, D.; MBOFUNG, C. M. F. Fungal flora and ochratoxin A associated with coffee in Cameroon. **British Micobiology Research Journal**, v. 4, p. 1-17, 2014.

NOONIM, P.; MAHAKARNCHANAKUL, W.; NIELSEN, K. F.; FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. Isolation, identification and toxigenic potential of ochratoxina A-producing *Aspergillus* species from coffee beans grown in two regions of Thailand. **International Journal of Food microbiology**, v. 128, p. 197-202, 2008.

OLSTORPE, M.; SCHNÜRER, J.; PASSOTH, V. Growth inhibition of various *enterobacteriaceae* species by the yeast *Hansenula anomala* during storage of moist cereal grain. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 1, p. 292–294, 2012.

PAGNONCELLI, M. G. B.; SOCCOL, C. R.; SANTOS, M. C. R. Isolamento e identificação de bactérias lácticas da microflora da polpa de café cereja. In: Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, 2000, Poços de Caldas, MG, Anais, Viçosa, 2000, 702-704.

PARDO, E.; MARIN, S.; RAMOS A. J.; SANCHIS, V. Occurrence of Ochratoxigenic Fungi and Ochratoxin A in Green Coffee from Different Origins. **Food Science and Technology International**, v. 10, n. 1, p. 45-49, 2004.

PASSOTH, V.; FREDLUND, E.; DRUVEFORS, U. A.; SCHNURER, J. Biotechnology, physiology and genetics of the yeast *Pichia anomala*. **FEMS Yeast Research**, v. 6, p. 3-13, 2005.

PASTER, N.; DROBY, S.; CHALUTZ, E.; MENASHEROV, M.; NITZAN, R.; WILSON, C.L. Evaluation of the potential of the yeast *Pichia guilliermondii* as a biocontrol agent against *Aspergillus flavus* and fungi of stored soya beans. **Microbiological Research** v. 97, p. 1201-1206, 1993.

PATHARAJAN, S.; REDDY, K. R. N.; KARTHIKEYAN, V.; SPADARO, D.; LORE, A.; GULLINO, M.L.; GARIBALDI, A. Potential of yeast antagonists on in vitro biodegradation of ochratoxin A. **Food Control**, v. 22, p. 290-296, 2011.

PERAICA, M.; RADIC, B.; LUCIC, A.; PAVLOVIC, M. Toxic effects of mycotoxins in humans. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 77, n. 9, p. 754-766, 1999.

PEREIRA, G. V. M.; SOCCOL, V. T; PANDEY, A.; MEDEIROS, A. B. P.; LARA, J. M. R. A.; GOLLO, A. L.; SOCCOL, C. R. Isolation, selection and evaluation of yeasts for use in fermentation of coffee beans by the wet process. **International Journal of Food Microbiology**, v. 188, p. 60-66, 2014.

PETCHKONGKAEW, A.; TAILLANDIER, P.; GASALUCK P.; Lebrihi, A. Isolation of *Bacillus* spp. from Thai fermented soybean (Thua-nao): screening for aflatoxin B1 and ochratoxin A detoxification. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, p. 1495-1502, 2008.

PFOHL-LESZKOWICZ A. Ochratoxin A and aristolochic acid involvement in nephropathies and associated urothelial tract tumours. **Archives of Industrial Hygiene and Toxicology**, v. 60, n. 4, p. 465-483, 2009.

PITT, J.I.; HOCKING, A.D.; **Fungi and Food Spoilage**, 2ª edição, Cambridge: Chapman and Hall, 1997.

PORSANI, M. V.; AMATUZZIL, R. F.; OLIVEIRA, B. H.; BARATTO, L. C.; DALITZ, C. A.; BOZZA, A.; MARANGONIL, P. R.; DALZOTO, P. R.; KOLM, H. E.; PIMENTEL, I. C. Antimicrobial potential of fungi and actinobacteria isolated from sandy sediments of intertidal regions. **International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences**, v. 3, n. 3, p. 899-913, 2013.

POZZI, C. R.; CORREA, B.; XAVIER, J. G.; DIREITO, G. M.; ORSI, R. B.; MATARAZZO, S. V. Effects of prolonged oral administration of fumonisin B1 and aflatoxin B1 in rats. **Mycopathologia**, v. 151, p.21-27, 2000.

RAMOS, A.J.; LABERNIA, N.; MARIN, S.; SANCHÍS, V.; MAGAN, N. Effect of water activity and temperature on growth and ochratoxin production by three strains of *Aspergillus ochraceus* on a barley extract medium and on barley rains. **International Journal of Food Microbiology**, v. 44, p. 133-140, 1998.

REZENDE, E. F.; COUTO, F. A.; BORGES, J. G.; SILVA, D. M.; BATISTA, L. R. Potencial enzimático e toxigênico de fungos isolados de grãos de café. **Coffe Science**, v. 8, n. 1, p. 69-77, 2013.

RIBELIN, W.E.; FUKUSHIMA, K.; STILL, P.E. The toxicity of ochratoxin A to ruminants. **Canadian Journal of Criminology - Revue Canadienne de Criminologie**, v. 42, p. 172-176, 1978.

SAITO, M.; ENOMOTO, M.; TATSUNO, T. Yellowed rice toxins: luterokyryrin and related compounds, chlorine-containing compounds and citrinin. In CIEGLER, A.; KADIS, S.; AJL, S. J. Microbial toxins, vol. VI: fungal toxins. New York: Academic Press 1971. p. 299-380.

SAKIYAMA, C. C. H.; PAULA, E. M.; PEREIRA, P. C.; HARA, A.; SILVA, D. O. Quantificação e caracterização da microbiota da superfície de frutos de café (*Coffea arabica* L.) em Viçosa, MG durante a safra de 2000. In: Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, 2000, Poços de Caldas, MG, Anais, Viçosa, 2000, p. 179-182.

SARGEANT, K.; SHERIDAN, A.; OKELLY, J. Toxicity associated with certain samples of groundnuts. **Nature**, v. 192, p. 1096-1097, 1961.

SAVI, D. C. **Biodiversidade e bioprospecção de actinomicetos da Planta *vochysia divergens* (cambará)**. 107 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil, 2011.

SCHATZMAYR, G.; HEIDLER, D.; FUCHS, E.; MOHNL, M.; TÄUBEL, M.; LOIBNER, A.P.; BRAUN, R.; BINDER, E.M. Investigation of different yeast strains for the detoxification of ochratoxin A. **Mycotoxyn Research**, v. 19, p. 124-128, 2003.

SCHENA, L.; IPPOLITO, A.; ZAHAVI, T.; COHEN, L.; NIGRO, F.; DROBY, S. Genetic diversity and biocontrol activity of *Aureobasidium pullulans* isolates against postharvest rots. **Postharvest Biology and Technology**, v. 17, p. 189–199, 1999.

SCHLATTER, C.; STUDER-ROHR, J.; RÁSONYI, T. Carcinogenicity and kinetic aspects of ochratoxin A. **Food Additives and Contaminants**, v. 13, suppl. 43-44, 1996. in TURNER, N. W.; SUBRAHMANYAM S. PILETSKY S.A. Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 632, p. 168-180, 2009.

SENTHIL, R.; PRABAKAR, K.; RAJENDRAN, L.; KARTHIKEYAN, G. Efficacy of diferente biological control agentes against major postharvest pathogens of grapes under room temperature storage conditions. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 50, p. 55-65, 2011.

SHI, L.; LIANG, Z.; LI, J.; HAO, J.; XU, Y.; HUANG, K.; TIAN, J.; HE, X.; XU, W. Ochratoxin A biocontrol and biodegradation by *Bacillus subtilis* CW 14. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 9, p. 1879-1885, 2014.

SHOTWELL, O. L.; HESSELTINE, C. W.; GOULDEN, M. L. Ochratoxin A: Occurrence as Natural Contaminant of a Corn Sample. **Applied Microbiology**, v. 17, n. 5, p. 765-766, 1969.

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**, v. 60, p. 251–260, 2000.

SILVA, F. A.S.; The ASSISTAT Software: statistical assistance. In: **International Conference on Computer in Agriculture**, v. 6, p. 294-298, Cancun, 1996.

SILVA, M. S. **Identificação de actinobactérias e solos de cerrado mineiro durante estação de baixa pluviosidade**. 99f. Tese (Mestrado em Microbiologia Agrícola), Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

SILVA¹, C. F.; BATISTA, L.R.; ABREU, L. M.; DIAS, E. S.; SCHWAN, R. F. Succession of bacterial and fungal communities during natural coffee (*Coffea arabica*) fermentation. **Food Microbiology**, v. 25, p. 951-957, 2008.

SILVA² 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, p. 521-526, 2008.

SOLEAS, G.J.; YAN, J.; GOLDBERG, D.M. Assay of ochratoxin A in wine and beer by high-pressure liquid chromatography photodiode array and gas chromatography mass selective detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 2733–2740, 2001.

STANDER, M. A.; STEYN, P. S. Survey of Ochratoxin A in South African Wines. **South African Society for Enology & Viticulture**, v. 23, p. 9-13, 2002.

STROSNIDER, H. Workgroup Report: Public Health Strategies for Reducing Aflatoxin Exposure in Developing Countries. **Environmental Health Perspectives**, v. 114, n. 12, p. 1898-1903, 2006.

SUBRAMANIAM R.; RAMPITSCH C. Towards systems biology of mycotoxin regulation. **Toxins**, v. 5, p. 675-682, 2013.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. Mega 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, p. 1596-1599, 2006.

TAN, H.; DENG, Q.; CAO, L. Ruminant feces harbor diverse uncultured symbiotic actinobacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 3, p. 1093-1100, 2014.

TANIWAKI, M. H.; PITT, J. I.; TEIXEIRA, A. A.; IAMANAKA, B. T. The source of ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to processing methods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 82, p. 173–179, 2003.

TANIWAKI, M. H.; TEIXEIRA, A. A.; TEIXEIRA, A. R. R.; COPETTI, M. V.; IAMANAKA, B. T. Ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in defective coffee beans. **Food Research International**, v. 61, p.161–166, 2014.

TONIAL, F. **Atividade antimicrobiana de endófitos e de extratos foliares de *schinus terebenthifolius raddi* (aroeira)**. 138 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil, 2010.

TRUCKSESS, M. W.; TANG, Y. Solid phase extraction method for patulin in apple juice and unfiltered apple juice. **Mycotoxin protocols, Methods in Molecular Biology**, v. 157, p. 205–213, 2001.

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

UDOVIČIĆ, M.; BAŽDARIĆ, K.; BILIĆ-ZULLE, L.; PETROVEČKI, M. What we need to know when calculating the coefficient of correlation?. **Biochemia Medica**, v.17, n. 1, p. 10-15, 2007.

VALERIO, F.; FAVILLA, M.; DE BELLIS, P.; SISTO, A.; CANDIA, S.; LAVERMICOCCA, P. Antifungal activity of strains of lactic acid bacteria isolated from a semolina ecosystem against *Penicillium roqueforti*, *Aspergillus niger* and *Endomyces fibuliger* contaminating bakery products. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 32, p. 438–448, 2009.

VALERO, A.; SANCHIS, V.; RAMOS, A. J.; MARÍN, S. Studies on the interaction between grape-associated filamentous fungi on a synthetic medium. **International Journal of Food Microbiology**, v. 113, p. 271–276, 2007.

VAN DER MERWE, K. J.; STEYN, P. S.; FOURIE L. Mycotoxins II. The constitution of ochratoxins A, B, and C, metabolites of *Aspergillus ochraceus* With. **Journal of the Chemical Society**, n. 0, p. 7083-7088, 1965.

VAN DONGEN, P.W.J.; DE GROOT, A.N.J.A. History of ergot alkaloids from ergotism to ergometrine. **European journal of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Biology**, v. 60, p. 109-116, 1995.

VILELA, D. M.; PEREIRA, G. V. M.; SILVA, C. F.; BATISTA, L. R.; SCHWAN, R. F. Molecular ecology and polyphasic characterization of the microbiota associated with semi-dry processed coffee (*Coffea Arabica* L.). **Food Microbiology**, v. 27, p. 1128-1135, 2010.

WILD, C. P.; GONG, Y. Y. Mycotoxins and human disease: a largely ignored global health issue. **Carcinogenesis**, v. 31, n. 1, p. 71-82, 2010.

ZHANG, D.; SPADARO, D.; GARIBALDI, A.; GULLINO, M. D. Potential biocontrol activity of a strain of *Pichia guilliermondii* against grey mold of apples and its possible modes of action. **Biological Control**, v. 57, p. 193–201, 2011.

ZHU, C.; SHI, J.; JIANG, C.; LIU, Y. Inhibition of the growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus ochraceus* in vitro and in vivo through antagonistic yeasts. **Food Control**, v. 50, p. 125-132, 2015.

APÊNDICES

APÊNDICE 1 - ANÁLISE ESTATÍSTICA DA INIBIÇÃO DE FUNGOS DO GÊNERO <i>Aspergillus</i> sp. POR BACTÉRIAS.....	76
APÊNDICE 2 - ANÁLISE ESTATÍSTICA DA INIBIÇÃO DE FUNGOS DO GÊNERO <i>Aspergillus</i> sp. POR LEVEDURAS.....	80
APÊNDICE 3 - CONCENTRAÇÃO DE OTA EM $\mu\text{g}/\text{kg}$ DETECTADA NAS AMOSTRAS DE CAFÉ EM RELAÇÃO AOS ISOLADOS FUNGICOS.....	83

**APÊNDICE 1 - ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS TESTES DE INIBIÇÃO DOS
FUNGOS DO GÊNERO *Aspergillus* sp. POR BACTÉRIAS.**

ASSISTAT Versão 7.7 beta (2015) – Homepage <http://www.assistat.com>

Por Francisco de A. S. e Silva DEAG-CTRN-UFCG – Atualiz.06/01/2014

Arquivo temporário Data 11/02/2015 Hora 20:45:52

EXPERIMENTO FATORIAL

QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Fator1(F1)	22	2296.96936	104.40770	324.7300 **
Fator2(F2)	3	837.66090	279.22030	868.4342 **
Int. F1Xf2	66	602.88976	9.13469	28.4108 **
Tratamentos	91	3737.52002	41.07165	127.7415 **
Resíduo	368	118.31992	0.32152	
Total	459	3855.83994		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$)

ns não significativo ($p \geq .05$)

GL	GLR	F-crit	F	p
22	368	1.8676	324.73	<0.001
3	368	3.8208	868.4343	<0.001
66	368	1.4899	28.4108	<0.001
91	368	1.4188	127.7415	<0.001

Fator 1 = Bactérias

Fator 2 = Fungos

MÉDIAS E MEDIDAS

Médias do fator 1

12	0.81000	f
13	5.85250	ab
14	0.73750	f
15	5.40400	b
16	4.17500	c
17	5.41000	b
18	0.85500	f
19	0.51000	f
20	0.54500	f
21	2.84750	de
22	3.01750	d
23	0.44750	f

dms =	0.65179	

Médias do fator 2

1	1.48548	c
2	1.55565	c
3	4.51565	a
4	3.83609	b

dms = 0.19268

MÉDIAS DE INTERAÇÃO

Fator 1 x Fator 2 (AxB)

A	B			
	B1	B2	B3	B4
A1	0.2900 la	0.0600 Fa	0.9500 Da	0.6600 Fa
A2	3.7000 abcB	3.1400 bcB	8.3000 Aa	8.3000 Aa
A3	0.2400 lc	0.4400 Fc	6.6600 Ba	4.1600 Cb
A4	0.1800 lab	0.0000 Fb	1.0500 Da	0.9200 Fab
A5	0.5800 hiA	0.5600 Fa	1.3300 Da	0.9500 Fa
A6	0.1400 la	0.2800 Fa	0.4800 Da	0.4000 Fa
A7	4.3400 Ab	4.8800 Ab	8.3000 Aa	8.3000 Aa
A8	2.8500 bcdeB	3.1100 bcB	8.3000 Aa	8.3000 Aa
A9	2.4000 cdefC	3.5000 Bb	6.0700 Ba	2.7400 deBC
A10	3.7100 abB	3.5000 Bb	8.3000 Aa	8.3000 Aa
A11	1.2600 fghiC	0.9600 defC	2.7700 Cb	3.9300 cdA
A12	0.5800 hiA	0.5600 Fa	1.1600 Da	0.9400 Fa
A13	3.3000 abcdB	3.5100 Bb	8.3000 Aa	8.3000 Aa
A14	0.6800 hiAB	0.2200 Fb	1.2600 Da	0.7900 Fab
A15	2.4360 bcdefB	2.5800 bcB	8.3000 Aa	8.3000 Aa
A16	1.8500 efghC	2.0100 cdeC	7.2000 abA	5.6400 Bb
A17	2.2000 defgB	2.8400 bcB	8.3000 Aa	8.3000 Aa
A18	0.3700 lbc	0.1400 Fc	1.6200 cdA	1.2900 Fab
A19	0.2700 la	0.2800 Fa	0.8200 Da	0.6700 Fa
A20	0.3100 la	0.2400 Fa	0.8700 Da	0.7600 Fa
A21	1.0300 ghiC	2.1700 cdB	6.6400 Ba	1.5500 efBC
A22	1.0700 ghiC	0.8000 efC	6.2000 Ba	4.0000 cdB
A23	0.3800 la	0.0000 Fa	0.6800 Da	0.7300 Fa

dms para colunas = 1.3036 dms para linhas = 0.9241

Classific.c/letras minúsculas Classific.c/letras maiúsculas

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste

de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 2.84822

CV% = 19.91

Ponto médio = 4.15000

Normalidade dos dados (alfa = 5%)

 Teste (Estatística) Valor p-valor Normal
 Shapiro-Wilk (W) 0.79793 0.00000 Não

DADOS					5.80	5.55	5.40	5.30	8.30
					2.55	2.70	2.80	2.70	2.95
					4.05	3.70	3.80	3.30	3.70
					3.60	3.70	3.30	3.60	3.30
					8.30	8.30	8.30	8.30	8.30
					8.30	8.30	8.30	8.30	8.30
					1.15	1.40	1.30	1.45	1.00
					.80	1.20	1.05	.95	.80
					2.80	2.30	2.80	3.00	2.95
					3.60	4.05	3.90	4.10	4.00
					.70	.50	.80	.20	.70
					.70	.70	.70	.30	.40
					.90	1.30	1.10	1.20	1.30
					.90	.70	1.10	1.00	1.00
					3.30	3.30	3.30	3.30	3.30
					3.60	3.30	3.70	3.45	3.50
					8.30	8.30	8.30	8.30	8.30
					8.30	8.30	8.30	8.30	8.30
					1.15	1.00	.85	.80	.80
					1.00	.30	.50	.50	.60
					.40	.70	.50	.70	.50
					1.30	1.45	1.30	1.30	1.30
					.80	.60	1.05	1.20	1.10
					.35	0.00	.35	0.00	0.00
					0.00	.60	.40	.40	0.00
					0.00	1.10	0.00	1.30	0.00
					.60	0.00	.70	.70	0.00
					5.80	4.10	3.90	3.80	4.10
					4.70	5.70	4.60	4.70	4.70
					8.30	8.30	8.30	8.30	8.30
					8.30	8.30	8.30	8.30	8.30
					2.95	2.85	2.85	2.40	3.20
					3.75	2.80	2.80	3.10	3.10
					8.30	8.30	8.30	8.30	8.30
					8.30	8.30	8.30	8.30	8.30
					1.90	2.60	2.50	2.50	2.50
					3.60	3.40	3.50	3.60	3.40
					0.00	.30	.20	.20	0.00

1.10	1.50	2.15	1.50	1.85	1.30	1.20	1.30	2.40	1.55
1.10	1.35	1.35	1.40	1.25	.90	.70	1.55	1.00	1.20
.35	.10	.30	.30	.30	.40	.60	.90	.80	1.30
.20	.40	.25	.25	.30	5.80	6.30	5.80	5.80	7.30
.80	.75	.85	.75	.95	3.80	4.30	4.30	3.80	3.80
.70	.85	.75	.35	.70	.60	.30	.20	.50	.30
.40	0.00	.45	.40	.30	p.393	0.00	0.00	0.00	0.00
.30	.20	.30	.20	.20	0.00				
.95	.80	.90	.90	.80	.75	.60	.70	.70	.65
.70	.70	.80	.80	.80	.70	.75	.80	.70	.70
.50	.60	.75	.50	2.80	-----				
1.95	2.05	2.30	2.00	2.55					
8.30	8.30	4.00	8.30	4.30					

OBSERVAÇÃO

O Assistat não é responsável por resultados inconsistentes de análise de dados que não atendem às exigências da ANOVA. Antes da análise o usuário deve verificar se ela se aplica.

**APÊNDICE 2 - ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS TESTES DE INIBIÇÃO DOS
FUNGOS DO GÊNERO *Aspergillus* sp. POR LEVEDURAS**

ASSISTAT Versão 7.7 beta (2015) – Homepage <http://www.assistat.com>

Por Francisco de A. S. e Silva DEAG-CTRN-UFCG – Atualiz.01/06/2014

Arquivo ANOVA_LEVEDURAS.txt Data 11/02/2015 Hora 19:47:40

EXPERIMENTO FATORIAL
QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Fator1(F1)	14	546.69598	39.04971	364.2482 **
Fator2(F2)	3	755.62303	251.87434	2349.4353 **
Int. F1Xf2	42	340.30018	8.10239	75.5775 **
Tratamentos	59	1642.61919	27.84100	259.6955 **
Resíduo	240	25.72952	0.10721	
Total	299	1668.34871		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$)

ns não significativo ($p \geq .05$)

GL	GLR	F-crit	F	p
14	240	2.1462	364.2482	<0.001
3	240	3.8539	2349.435	<0.001
42	240	1.6496	75.5775	<0.001
59	240	1.5558	259.6955	<0.001

Fator 1 = Leveduras

Fator 2 = Fungos

MÉDIAS E MEDIDAS

Médias do fator 1

1	1.61000	g
2	2.82000	e
3	3.70250	bc
4	2.19400	f
5	3.31000	d
6	0.86500	hi
7	1.10950	h
8	4.69500	a
9	0.72350	i
10	3.51250	cd
11	3.53750	cd
12	3.89500	b

13	3.50500	cd
14	0.65000	i
15	0.70750	i

dms = 0.35459

Médias do fator 2

1	0.81547	c
2	0.93613	c
3	4.23840	a
4	3.83320	b

dms = 0.13822

MÉDIAS DE INTERAÇÃO

DADOS					8.30	8.30	8.30	8.30	8.30
.50	.40	.60	.40	.20	8.30	8.30	8.30	8.30	8.30
.40	.30	.30	.30	.30	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
3.80	3.50	3.80	3.60	2.60	.50	0.00	0.00	0.00	0.00
2.30	2.30	2.60	1.80	2.20	1.35	1.30	1.60	1.15	1.43
.90	.90	.90	.90	.90	1.43	1.35	1.65	1.46	1.25
.40	.50	.80	.75	.95	1.70	1.70	1.20	1.50	2.00
6.30	5.80	5.80	6.20	3.30	1.00	1.30	1.80	1.60	1.40
4.30	4.00	4.30	4.80	3.70	5.50	5.30	5.45	5.40	5.50
1.30	1.40	1.30	.80	1.30	5.10	5.90	5.30	6.30	5.30
1.60	1.60	1.80	2.10	2.00	2.00	2.00	1.30	1.10	.95
5.80	5.80	5.75	5.10	4.60	1.45	1.55	1.60	1.60	1.40
6.30	6.80	6.30	5.80	6.60	5.35	5.80	5.60	5.10	5.60
.83	1.10	.70	.80	.70	5.50	6.30	5.80	5.40	5.35
1.10	1.20	1.00	1.00	1.10	.90	1.80	1.60	1.00	2.00
4.25	4.20	3.80	4.05	3.80	1.60	1.40	2.30	2.10	1.10
2.95	2.80	2.80	2.80	2.90	5.50	6.00	5.90	6.30	5.80
.90	1.00	.90	.90	.90	8.30	5.60	5.80	6.10	6.80
1.30	1.30	1.20	1.30	1.20	.60	.50	.50	.60	.60
6.70	6.30	6.80	6.30	6.30	.80	.30	1.00	.40	.50
4.80	5.20	4.80	4.50	3.60	7.80	7.30	7.30	7.30	7.30
.75	.60	.60	.60	.60	5.50	5.00	5.60	5.70	5.50
.80	.80	.90	.90	.90	0.00	0.00	0.00	0.00	.20
.95	.90	.90	.90	1.00	0.00	0.00	0.00	.10	0.00
.90	1.00	1.40	1.00	.90	1.85	1.80	1.80	1.80	1.30
.90	.80	.90	.73	1.15	1.05	.80	.80	.90	.60
1.10	1.10	1.00	1.00	.96	.20	.40	.35	.40	.30
1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	.30	.40	.35	.40	.50
1.30	1.30	1.30	1.20	1.20	.80	1.00	.90	.90	1.15
1.10	1.00	1.00	.90	.70	p.393	1.30	1.30	1.00	
1.35	1.30	1.20	1.30	1.05	1.20				

OBSERVAÇÃO

O Assistat não é responsável por resultados inconsistentes de análise de dados que não atendem às exigências da ANOVA. Antes da análise o usuário deve verificar se ela se aplica.

**APÊNDICE 3 – CONCENTRAÇÃO DE OTA EM µg/kg DETECTADA NAS
AMOSTRAS DE CAFÉ EM RELAÇÃO AOS ISOLADOS FUNGICOS**

Amostra	Total de isolados	<i>Aspergillus</i> seção <i>Nigri</i>	<i>Aspergillus</i> seção <i>Circumdati</i>	Concentração de OTA (µg/kg)	continua
					Relação <i>Aspergillus</i> seção <i>Nigri</i> / <i>Circumdati</i>
111	17	15	2	3	15/2
112	19	17	2	2	17/2
113	6	6	0	2	6/0
114	1	1	0	3	1/0
115	13	12	1	3	12/1
116	0	0	0	2	0/0
117	12	11	1	2	11/1
118	6	4	2	3	4/2
119	14	14	0	2	14/0
120	0	0	0	2	0/0
121	14	13	1	2	13/1
122	17	10	7	2	10/7
123	17	12	5	2	12/5
124	5	3	2	2	3/2
125	24	13	11	2	13/11
126	6	5	1	3	5/1
127	20	15	5	3	15/5
128	11	10	1	2	10/1
129	4	4	0	2	4/0
130	12	12	0	3	12/0
131	2	1	1	3	1/1
132	11	11	0	2	11/0
133	4	4	0	3	4/0
134	14	9	5	2	9/5
135	8	5	3	1	5/3
136	12	11	1	4	11/1
137	11	8	3	6	8/3
138	16	12	4	0,42	12/4
139	12	10	2	N.D.	10/2
140	15	11	4	0,17	11/4
141	18	12	6	N.D.	12/6
142	11	9	2	N.D.	9/2
143	13	12	1	0,18	12/1
144	20	17	3	N.D.	17/3
145	14	11	3	N.D.	11/3
146	11	10	1	0,19	10/1
147	15	13	2	0,29	13/2
148	15	13	2	N.D.	13/2
149	7	7	0	N.D.	7/0
150	5	4	1	0,35	4/1
151	11	10	1	N.D.	10/1
152	11	11	0	N.D.	11/0
153	9	7	2	1,15	7/2
154	9	9	0	N.D.	9/0
155	1	1	0	N.D.	1/0
156	15	11	4	N.D.	11/4
157	6	6	0	N.D.	6/0
158	8	8	0	N.D.	8/0
159	8	8	0	0,3	8/0

Amostra	Total de isolados	<i>Aspergillus</i> seção <i>Nigri</i>	<i>Aspergillus</i> seção <i>Circumdati</i>	Concentração de OTA ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	conclusão Relação <i>Aspergillus</i> seção <i>Nigri</i> / <i>Circumdati</i>
160	11	9	2	0,17	9/2
161	7	6	1	N.D.	6/1
162	14	14	0	N.D.	14/0
163	13	12	1	N.D.	12/1
164	12	11	1	N.D.	11/1
165	23	16	7	0,63	16/7
166	13	12	1	1,5	12/1
167	4	4	0	0,58	4/0
168	9	8	1	9,64	8/1
169	13	13	0	N.D.	13/0
170	15	11	4	N.D.	11/4
171	14	13	1	N.D.	13/1
172	13	11	2	N.D.	11/2
173	13	12	1	0,26	12/1
174	13	12	1	0,26	12/1
175	13	12	1	0,4	12/1
176	18	12	6	N.D.	12/6
177	17	15	2	N.D.	15/2
178	7	7	0	0,29	7/0
179	15	12	3	N.D.	12/3
180	18	14	4	2,14	14/4
181	18	15	3	N.D.	15/3
182	11	8	3	N.D.	8/3
183	13	9	4	N.D.	9/4
184	16	12	4	N.D.	12/4
185	18	12	6	0,46	12/6
186	22	14	8	N.D.	14/8
187	15	13	2	N.D.	13/2
188	18	13	5	N.D.	13/5
189	18	11	7	1,68	11/7