

MICROBIOTA DO CACAU: FUNGOS E MICOTOXINAS

DANIEL P. LEMES¹; MARINA V. COPETTI²; FELIPE NAKANO¹; MARTA H. TANIWAKI³.

Nº0801026

RESUMO

O presente estudo foi conduzido a fim de investigar as espécies toxigênicas, verificar a presença de ocratoxina A e quantificar esta toxina nas amostras de cacau.

Um total de 178 amostras foram examinadas. As amostras de cacau foram coletadas na Bahia, em diferentes estádios de processamento: do pé, durante a fermentação, secagem e estocagem das fazendas. Os fungos mais comuns isolados foram: *Absidia corymbifera*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Eurotium chevalieri*, *Penicillium roqueforti*, *Rhizopus* sp, *Mucor* sp, *Monascus* sp e leveduras.

ABSTRACT

The present study was conducted to investigate the toxigenic species, verify the presence of ocratoxin A and quantify this toxin in cocoa samples. 178 samples were analyzed. The cocoa samples were collected in Bahia at different process stages: harvesting, during fermentation, drying and storage at the farms. The most common isolated fungi were: *Absidia corymbifera*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Eurotium chevalieri*, *Penicillium roqueforti*, *Rhizopus* sp, *Mucor* sp, *Monascus* sp and yeasts.

1. INTRODUÇÃO

O cultivo, comercialização e industrialização do cacau tem apresentado no decorrer dos anos importante papel econômico-social no cenário brasileiro. A qualidade do chocolate obtido no final do processo de industrialização depende de uma grande variedade de fatores ambientais, de processamento, de armazenamento e tecnológicos.

1. BOLSISTA CNPq: Graduação Eng. de Alimentos, FEA/UNICAMP, Campinas-SP, lemesdan@fea.unicamp.br

2. COLABORADORA: Pós-Graduação Ciência de Alimentos, FEA/UNICAMP, Campinas-SP.

3. ORIENTADORA: Pesquisadora, CCQA/ITAL, Campinas-SP.

Dentre estes fatores, sabe-se que os microrganismos presentes na fermentação desempenham função essencial no desenvolvimento das características sensoriais do chocolate. A intensidade de sua proliferação e a seleção de um ou outro grupo nas etapas de secagem, em condições naturais ou artificiais, são determinantes para a qualidade do produto final.

Pesquisas, conduzidas no Brasil e no exterior têm comprovado a participação constante e marcante de fungos, antes e no decorrer do processo fermentativo e durante os vários estádios da secagem. Ao lado de seu potencial deteriorador e conseqüente influência na qualidade do cacau e do chocolate, a presença dos fungos vem sendo relacionada, nos últimos anos, com o aspecto de saúde pública, devido a possibilidade de formação de micotoxinas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Amostragem

Um total de 178 amostras de cacau foram coletadas na região produtora de Ilhéus no Estado da Bahia em diferentes estádios de processamento (recém-colhidos, fermentação, secagem e estocagem).

3.2 Avaliação da micobiota do cacau

As amostras de cacau foram desinfetadas pela imersão em solução de hipoclorito de sódio 0,4% durante 2 minutos. Em seguida 33 amêndoas foram colocadas em 3 placas de Petri contendo ágar Dicloran Glicerol 18% (DG18) com cloranfenicol. As placas foram incubadas à 25°C por 7 dias. Os resultados foram expressos em porcentagem de amostras infectadas por cada espécie (Tabelas 1), conforme a metodologia de Pitt & Hocking (1997).

3.3 Identificação dos fungos

Os fungos foram isolados em ágar Czapek Extrato de Levedura (CYA) e identificados conforme a chave de identificação de Pitt (1988) para espécies de *Penicillium*; identificação de espécies de *Aspergillus*, de acordo com Klich & Pitt (1988), Samson *et al.* (2004) e Frisvad *et al.* (2004) e outros fungos de acordo com Pitt & Hocking (1997), Samson *et al.* (1996) e outras chaves de identificação.

Decorrido o período de cultivo, os diâmetros das colônias foram medidos e as características macro e microscópicas utilizadas para identificação das espécies.

3.4 Teste de produção de ocratoxina A pelos fungos

As espécies potencialmente toxigênicas de: *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus westerdijkiae*, *Aspergillus carbonarius* e *Aspergillus niger* foram testadas quanto à produção de ocratoxina em meio extrato de levedura sacarose (YESA) e extraídas pela técnica do ágar plug (Filtenborg *et al.*, 1983).

3.5 Metodologia para determinação de ocratoxina A em cacau.

3.5.1. Metodologia

10g cacau moído

200mL solução de Bicarbonato de Sódio 1%

Filtrar papel Whatman n.4 e em filtro de fibra de vidro Whatman

Retirar 20mL do filtrado e completar para 40mL com PBS+ Tween 0,01%

Passar pela coluna de imunoafinidade

Lavar com 20 mL de água destilada

Eluir com 4mL de solução Metanol: Ácido acético (98: 02) [v/ v]

Secar em fluxo de Nitrogênio

Ressuspender em 0,3mL de Fase móvel

Injetar 0,1mL no HPLC

Fase Móvel= Acetonitrila: Água: Àc. Acético (51: 47: 02) (v/v/v)

3.5.2. Condições do HPLC

Forno 40°C

Coluna 25 cm ODS2

Fluxo 1mL/min

Detector de Fluorescência EX=333nm EM=443nm

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Micobiota do cacau em vários estádios de processamento

As porcentagens de infecção fúngica interna nas amostras de cacau, nos estádios de fermentação, secagem e estocagem, são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Frequência de ocorrência das espécies fúngicas em amêndoas de cacau nos estádios de fermentação, secagem e estocagem.

Espécie Fúngica	Frequência ocorrência (%)		
	Fermentação	Secagem	Estocagem
<i>Absidia corymbifera</i>	21,6	78,5	73,2
Ascomicetos	2	1,5	0
<i>Aspergillus candidus</i>	2	21,5	35,7
<i>A. carbonarius</i>	2	3,1	8,9
<i>A. flavus</i>	5,9	38,5	30,4
<i>A. fumigatus</i>	3,9	12,3	1,8
<i>A. niger</i>	5,9	15,4	25
<i>A. parasiticus</i>	2	18,5	5,4
<i>A. sp. nov.</i>	7,8	47,7	33,9
<i>A. sydowii</i>	2	3,1	10,7
<i>Eurotium amstelodami</i>	3,9	6,2	32,1
<i>Eurotium chevalieri</i>	2	16,9	21,4
<i>Geotrichum candidum</i>	17,6	7,7	1,8
Leveduras	47,1	50,8	5,4
<i>Monascus sp</i>	19,6	7,7	7,1
<i>Mucor sp</i>	3,9	0	3,6
<i>Penicillium roqueforti</i>	23,5	60	12,5
<i>Syncephalastrum racemosum</i>	2	0	10,7
<i>A. westerdijkiae</i>	0	6,2	5,4
<i>Eurotium rubrum</i>	0	10,8	28,6
<i>P. variotii</i>	0	1,5	5,4
<i>Penicillium citrinum</i>	0	3,1	3,6
<i>Rhizopus sp.</i>	0	3,1	8,9
Fungos dematiáceos	0	1,5	3,6
<i>A. penicillioides</i>	0	0	16,1
<i>A. versicolor</i>	0	0	7,1
<i>A. terreus</i>	0	0	1,8
<i>A. ustus</i>	0	0	1,8
<i>Eupenicillium alutaceum</i>	0	0	1,8
<i>Nigrospora oryzae</i>	0	0	1,8
<i>Penicillium sp.</i>	0	0	1,8
<i>P. corylophilum</i>	0	0	1,8
<i>P. fellutanum</i>	0	0	1,8
<i>Wallemia sepii</i>	0	0	1,8
<i>Emericella nidulans</i>	0	0	3,6

As amostras recém colhidas, não estavam infectadas internamente com fungos. De acordo com Schwan & Wheals (2004) a polpa de cacau é microbiologicamente estéril. Quando o fruto é aberto, utiliza-se um facão que pode contaminar a polpa com microrganismos. Estes microrganismos irão contribuir na microbiota da fermentação. Outras fontes de microrganismos são: as mãos dos trabalhadores, os cestos usados para transporte da

polpa, a mucilagem seca grudada nas caixas ou tanques provenientes de fermentações anteriores.

No estágio de fermentação os fungos isolados mais comuns foram: leveduras, *Geotrichum candidum*, *Absidia corymbifera* e *Monascus* sp (Tabela 1). Durante a fermentação a atividade de água dos frutos de cacau é alta, o que favorece o desenvolvimento das leveduras e dos fungos hidrofílicos como os zigomicetos (*A. corymbifera*). As espécies de *G. candidum* são leveduriformes e crescem bem em condições de microaerofilia e alta aw. As espécies de *Monascus* são comuns em alimentos fermentativos e crescem bem nestas condições sem muito oxigênio (Pitt & Hocking, 1997).

Os fungos mais comumente isolados durante a secagem nas barcaças foram: *A. corymbifera*, leveduras, *G. candidum*, *Penicillium roqueforti*, *Aspergillus sojae*, *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. candidus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *Eurotium chevalieri*, e *E. rubru*. A atividade de água nesta fase é a que sofre maior variação. No início da secagem as amêndoas estão com aw mais elevada e assim existe um predomínio de fungos hidrofílicos. Com o tempo de secagem, a amêndoas vão secando e os fungos xerofílicos como as espécies de *Aspergillus*, *Eurotium* e *Penicillium* passam a ser predominantes.

Durante a estocagem a umidade das amostras deve permanecer baixa para evitar uma deterioração microbiana. Observou-se um aumento nas espécies xerofílicas de *Eurotium* como *E. amstelodami*, *E. chevalieri*, *E. rubrum*. A espécie *Aspergillus penicillioides* que é um fungo xerofílico também apareceu chegando a 100% de infecção em algumas amostras. Ocorreu um leve aumento na diversidade de espécies de *Aspergillus* e *Penicillium*.

4.2 Fungos toxigênicos

A. niger foi o fungo potencialmente produtor de ocratoxina A mais freqüente, com um total de 149 isolados. Entretanto apenas 10 (6,7%) foram capazes de produzir ocratoxina A. Esta espécie foi isolada na fermentação, secagem e estocagem com freqüência de 0, 05, 1,9 e 4, 3, respectivamente.

A. carbonarius foi isolado de algumas amostras na fermentação (0,05%), secagem (0,52%) e estocagem (2,5%). Foi um total de 59 isolados e todos foram capazes de produzir ocratoxina A.

Apenas 9 isolados de *A. westerdijkiae* foram isolados e todos foram produtores de ocratoxina A. Esta espécie foi encontrada nas amostras da secagem (0,37%) e estocagem (0,2%).

Em geral a fermentação leva de 6 a 7 dias, enquanto que a secagem de 7 a 15 dias e em alguns casos até mais, dependendo das condições climáticas. A secagem e a estocagem podem ser consideradas os pontos críticos de contaminação. Nestas etapas a atividade de água das amêndoas diminui e estas espécies toxigênicas, sendo xerofílicas e sem outros competidores, encontram condições de desenvolvimento e produção de toxinas. Este estudo tem mostrado que a infecção por fungos toxigênicos ocorre após a colheita e em consequência de contaminação por equipamentos, locais de fermentação, secagem e estocagem.

4.3 Quantificação de Ocratoxina A nas amostras de cacau

A média, variação e porcentagem de infecção de ocratoxina A em amêndoas de cacau nos estádios de pré-fermentação, fermentação, secagem e estocagem são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2: Média, Variação, e Porcentagem de infecção de ocratoxina A nos estádios de pré- fermentação, fermentação, secagem e estocagem.	
Estádio (Número de amostras avaliadas)	OTA
Pré-fermentação (6)	
Média(ug/kg)	<LD
Variação (ug/kg)	<LD
Positivos	0%
Fermentação (51)	
Média(ug/kg)	0,05
Variação (ug/kg)	<LD - 1,71
Positivos	27,45%
Secagem (65)	
Média(ug/kg)	0,13
Variação (ug/kg)	<LD - 5,54
Positivos	49,23%
Estocagem (56)	
Média(ug/kg)	0,3
Variação (ug/kg)	<LD -10,08
Positivos	58,93%
Limite de Detecção(LD) (ug/kg)	0,01

Não foi detectado contaminação por ocratoxina nas amostras coletadas no período anterior a fermentação.

No estágio de fermentação encontrou-se 28% das amostras contaminadas, no entanto em geral os níveis de contaminação estavam baixos, próximos ao limite de detecção. A microbiota encontrada neste estágio possuía um baixo número de espécies toxigênicas, as quais precisam se desenvolver para então produzir a toxina.

Cerca de metade das amostras do período de secagem avaliadas estava contaminadas com ocratoxina A. A média de contaminação nesta fase foi de 0,13 ng/g de amostra, porém uma amostra que apresentou intensa contaminação por *A. carbonarius* atingiu nível de 5,51 ng de ocratoxina por grama de amostra. Nas amostras de secagem tanto a média de contaminação quanto o número de amostras contaminadas por ocratoxina A foram superiores aos valores encontrados durante a secagem.

Os fungos toxigênicos, como os *Aspergillus*, foram em sua grande maioria isolados nos estádios de secagem nas barças e estocagem, demonstrando uma correlação com os resultados de quantificação de ocratoxina A. A média de infecção por fungos toxigênicos em ambos os estádios foram superiores a média de infecção no estágio de fermentação, assim como os índices de contaminação por ocratoxina A, que atingiram cerca de 50% das amostras de cacau analisadas.

4. CONCLUSÃO

Neste período de trabalho isolou-se um grande número de espécies fúngicas potencialmente toxigênicas, tendo sido possível observar uma inter-relação entre a presença de fungos ocratoxigênicos e contaminação por ocratoxina A nas amostras de cacau. Considera-se o período de secagem ao sol a etapa mais crítica para contaminação por ocratoxina A, uma vez que durante este período há condições de umidade suficientes para permitir o desenvolvimento dos fungos ocratoxigênicos, no entanto isto também pode ocorrer se houver uma estocagem em condições deficientes. Os dados encontrados neste trabalho relatam este importante problema para os setores produtores e exportadores da cultura cacauífera e um perigo em potencial para a saúde do consumidor.

7. REFERÊNCIAS CITADAS

- Filtborg, O; Frisvald, J.C.; & Svendensen, J.A. 1983. Simple screening method for molds producing intracellular mycotoxins in pure cultures. **Appl. Environm. Microbiol.**, **45**: 581-585.
- Klich, M.A. & Pitt, J.I. 1988. **A Laboratory Guide to Common *Aspergillus* species and their Teleomorphs**. SYDNEY: Commonwealth scientific and Industrial research Organization, 115p.
- Pitt, J.I. & Hocking, A.D. 1997. **Fungi and Food Spoilage**. Blackie Academic & Professional: London, 593p.
- Samson, R.A.; Hoekstra ,E.S. ; Frisvald, J.C; Filtborg, O. 1996. **Introduction to Food-Borne Fungi**. Centraalbureau Voor Schimmelcultures: Wageningen, 322p.
- Samson, R.A.; Houbaken, J.A.M.P.; Kuijpers, A.F.A.; Frank, J.M. & Frisvad, J.C. 2004. New ochratoxin A or sclerotium producing species of *Aspergillus* section *Nigri*. **Stud. Mycol.** **50**: 45-61.
- Schwan, R.F. & Wheals, A. E. 2004. The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. **Crit. Rev. Food Sci. Nut.** **44**: 1-17.