

UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LUIS GUSTAVO MORELLO

**PCR em tempo real para detecção e quantificação
de *Aspergillus westerdijkiae* em grãos de café**

LONDRINA – PR
2007

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

LUIS GUSTAVO MORELLO

**PCR em tempo real para detecção e quantificação
de *Aspergillus westerdijkiae* em grãos de café**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina como requisito final para obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientadora: Dr.^a Maria Helena Pelegrinelli
Fungaro

LONDRINA – PR
2007

“Nos campos da observação,
o acaso favorece apenas as
mentes preparadas”.

Louis Pasteur

Dedico este trabalho

Aos meus pais, **Walter & Elizabete**,
pelo incentivo, confiança, amor e apoio
em todos os momentos da minha vida.

À minha orientadora, **Maria Helena**,
pelos ensinamentos, amizade, paciência,
incentivo, confiança e total apoio
durante todos os momentos de
convivência.

AGRADECIMENTOS

“A vida está cheia de desafios que, se aproveitados de forma criativa, transformam-se em oportunidades”. **Maxwell Maltz**

Quero, por meio deste, expressar meus sinceros agradecimentos a todos que contribuíram para o desenvolvimento do presente trabalho, pois por mais forte, duro e independente que possas ser, sempre haverá um momento em que precisarás de ajuda.

À Universidade Estadual de Londrina, pela oportunidade e apoio à minha formação.

Às Instituições Financiadoras: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia desta Universidade, pelos auxílios concedidos para a realização deste trabalho.

À professora Dr.^a Maria Helena Pelegrinelli Fungaro por ter aberto as portas do laboratório, pela orientação, amizade, confiança, seriedade e incentivo durante todas as minhas atividades, contribuindo de forma excepcional para minha formação.

Aos professores: Dr. André Luiz Martinez de Oliveira, Dr.^a Márcia Cristina Furlaneto e Dr.^a Maria Angélica Ehara Watanabe, pela amizade, apoio, disponibilidade de equipamentos e discussões fundamentais para conclusão desse trabalho.

À Dr.^a Marta Hiromi Taniwaki, e amigas, Beatriz e Marina, do Instituto de Yecnologia de Alimentos de Campinas, pelo auxílio prestado com a estrutura do laboratório.

Aos participantes externos da banca examinadora, Dr. Luis Eduardo Aranha Camargo e Dr.^a Cláudia Barros Monteiro Vitorello, pela disponibilidade em aceitar o convite e notáveis sugestões.

Em especial, às amigas de laboratório, Daniele Sartori e Lara Munique Ferracin, pelo apoio no desenvolvimento dos trabalhos, amizade, companheirismo e ótimos momentos de convivência.

Aos amigos e amigas do laboratório: Renan, Rosana, Luiz, Ivan, Ligia, Carla, Yuldi, Fram, Mila, Maria Elena e Márcia, pela amizade, apoio e bons momentos de convivência.

Aos amigos e amigas dos laboratórios vizinhos: Marcelo, Ariane, Daniel, Ana Flávia, Leandro, Karen, Juliana, Patrícia, Thiago, Jaqueline, Mateus, Kadu, que sempre estiveram por perto em todos os momentos.

Ao professores do curso de Pós-Graduação em Microbiologia da UEL, pelos ensinamentos e apoio oferecido durante todo o curso.

Aos amigos da turma do curso de Pós-Graduação, por todos os momentos que passamos.

A todos da minha família, principalmente meus pais Walter e Elizabete e meu irmão Lucas, que com amor e compreensão, confiaram e torceram por mim, ajudando-me a vencer mais esta etapa da minha vida.

E a todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para a concretização desta conquista, muito obrigado.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1 Ocratoxina A: Aspectos Gerais	4
3.2 Ocratoxina A no café.....	9
3.3 Secção <i>Circumdati</i>: <i>Aspergillus ochraceus</i> e <i>Aspergillus westerdijkiae</i>	14
3.4 Diagnóstico molecular de fungos produtores de ocratoxina A.....	19
4. REFERÊNCIAS	27
5. ARTIGO CIENTÍFICO PROPOSTO PARA O PERIÓDICO “International Journal of Food Microbiology”.....	40

LISTA DE TABELAS

Table 1. (PAPER): Fungal isolates collected from Brazilian coffee beans used in the present study.	58
---	-----------

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Estrutura química das ocratoxinas (PETZINGER & ZIEGLER, 2000). **6**

FIGURE 1. (PAPER): Nucleotide sequence alignment of a portion from the β -tubulin gene of *Aspergillus westerdijkiae* (ITAL 234, UEL 21, UEL 101 and NRRL 35197) and *Aspergillus ochraceus* (UEL 259, UEL 14A and UEL 14B) isolates. **59**

FIGURE 2. (PAPER): Discrimination between *A. westerdijkiae* and *A. ochraceus* by (a) conventional PCR and (b) real-time PCR. **60**

FIGURE 3. (PAPER): Comparison between the cfu data and the copy number of haploid genome of the *A. westerdijkiae* in inoculated coffee beans. **61**

FIGURE 4. (PAPER): The standard curve showing the correlation between the logarithmic of the target DNA copy number and the threshold cycle (*Ct*). **62**

RESUMO

Ocratoxina A (OA) é uma micotoxina encontrada tanto em grãos de café como na bebida preparada a partir de grãos contaminados. O perfil toxicológico desta micotoxina inclui carcinogenicidade, nefrotoxicidade e imunotoxicidade. O café é uma bebida extensivamente consumida no mundo e o Brasil se configura como o maior produtor de grãos de café do mundo. Apesar do café não ser a principal fonte de OA no consumo humano, ações para evitar a presença deste metabólito em grãos de café são necessárias para diminuir a exposição humana a esta micotoxina. OA foi descoberta em 1965, como um metabólito secundário de *A. ochraceus*, mas após isso, várias outras espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* foram descritas como produtoras de OA. Atualmente, *Aspergillus westerdijkiae* é reconhecido como a mais importante espécie produtora de OA em grãos de café. *Aspergillus westerdijkiae* é uma nova espécie de fungo que foi recentemente desmembrada a partir do taxon *Aspergillus ochraceus*. Essa espécie é muito similar a *A. ochraceus* e vários isolados previamente identificados como *A. ochraceus*, agora são identificados como *A. westerdijkiae*. De acordo com a literatura, isolados de *A. westerdijkiae* são muito frequentes e a maioria deles é capaz de produzir grandes quantidades de OA. Neste trabalho, vários isolados obtidos de amostras de grãos de café brasileiro, previamente identificados como *A. ochraceus* foram comparados com aquelas de *A. westerdijkiae* através das seqüências de nucleotídeos que codifica para a β -tubulina. De fato, a maioria (84%) foi reconhecida como pertencente à espécie *A. westerdijkiae*. Devido ao fato que isolados de *A. westerdijkiae* frequentemente produzem grandes quantidade de OA, desenvolveu-se um par de primers específico para detectar e quantificar esta espécie em grãos de café utilizando-se da técnica de PCR em tempo real. O par de primers desenhado (Bt2Aw-F 5'TGATACCTTGGCGCTTGTGACG / Bt2Aw-R 5'CGGAAGCCTAAAAATGAAGAG) permitiu a obtenção de um amplicon de 347 pb em todos os isolados de *A. westerdijkiae* e nenhuma reação cruzada foi observada usando DNA de *A. ochraceus*. A especificidade deste par de primers para amplificar *A. westerdijkiae* motivou a investigação da possibilidade de seu uso para quantificar *A. westerdijkiae* em grãos de café. Após inoculação e incubação de grãos de café, extrações de DNA e ensaios de cfu foram realizadas em intervalos de 48 h. Embora uma

correspondência entre o número de genomas haplóides e cfu tenha sido observada, a estimativa dos números de cópia de genoma foi sempre maior do que os números de cfu. Utilizando diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-9}) do DNA extraído de grãos de café infectados, e incubados por 48 h, detectou-se um sinal positivo até a diluição de 10^{-5} , o que significa mais de 1 e menos de 10 cópias de genoma haplóide de *A. westerdijkiae*. Este valor também significa menos de 10 genomas haplóides por 0,1 grama de grãos de café. O nível de sensibilidade do PCR em tempo real foi 100 vezes maior do que a técnica de cfu.

Palavras-chaves: *Aspergillus westerdijkiae*, *Aspergillus ochraceus*, ocratoxina A, PCR em tempo real.

ABSTRACT

Ochratoxin A (OA) is a mycotoxin that has been found in coffee beans and coffee beverages. Its toxicological profile includes carcinogenicity, nephrotoxicity and immunotoxicity. Coffee beverage is extensively consumed in the world, and Brazil is the major producer of coffee beans in the world. Even though coffee beverage is not the main source of OA in human consumption, actions to prevent its production in coffee beans would decrease the human exposure to this toxin. OA was discovered, in 1965, as a secondary metabolite in *A. ochraceus*, but after this, several other *Aspergillus* and *Penicillium* species were described as OA producers. Nowadays, *Aspergillus westerdijkiae* is recognized as the most important OA producing species in coffee beans. *Aspergillus westerdijkiae* is a new species of fungus that was recently dismembered from *Aspergillus ochraceus*. This species is very similar to *A. ochraceus*, and several isolates previously identified as *A. ochraceus* are now identified as *A. westerdijkiae*. According to the literature *A. westerdijkiae* is very common and most isolates are able to produce large amounts of OA. By using β -tubulin sequences, we analyzed several isolates obtained from Brazilian coffee bean samples, previously identified as *A. ochraceus*, to compare with those of *A. westerdijkiae*. In fact, most (84%) were recognized as *A. westerdijkiae*. Since this species consistently produces large amounts of OA, we developed a specific primer-pair for detecting and quantifying it in coffee beans by using real-time PCR. The primer-pair designed (Bt2Aw-F 5'TGATACCTTGGCGCTTGTGACG / Bt2Aw-R 5'CGGAAGCCTAAAAATGAAGAG) provided an amplicon of 347 pb in all *A. westerdijkiae* and no cross-reaction was observed using DNA from *A. ochraceus*. The specificity of this primer-pair to amplify *A. westerdijkiae* motivated us to use it for quantifying *A. westerdijkiae* in coffee bean. After inoculation of coffee bean samples and incubation, DNA extraction and cfu-assay were performed at 48 h intervals. Although a correspondence between copy number of haploid genomes and cfu was observed, the estimative of genome copy numbers was always higher than cfu numbers. By using serial dilutions (10^{-1} to 10^{-9}) of DNA extracted from infected coffee beans after 48 h of incubation, we detected a positive signal up to 10^{-5} dilution, which means less than 10 and more than one single copy number of *A. westerdijkiae* haploid genome. This value also

means less than 10 haploid genomes per 0.1 gram of coffee beans. Real-time PCR sensitivity level was more than 100 times higher than the cfu technique.

Keywords: *Aspergillus westerdijkiae*, *Aspergillus ochraceus*, ochratoxin A, real-time PCR.

1. INTRODUÇÃO

O interesse pelos fungos produtores de micotoxinas é admirável, não apenas no contexto científico, mas também no que se refere à economia e saúde pública do país. Desde a década de 60, quando mais de 100.000 perus morreram no Reino Unido em decorrência da contaminação da ração por micotoxina, esses microrganismos vêm recebendo atenção especial. Contaminações causadas por fungos micotoxigênicos em rações, cereais, grãos, e em outros produtos destinados à alimentação humana, têm sido tratadas como assunto de extrema importância em âmbito mundial.

A exposição humana às micotoxinas ocorre principalmente por ingestão de alimentos contaminados. As micotoxinas são produzidas naturalmente, a partir do metabolismo secundário de alguns fungos, principalmente aqueles classificados como filamentosos. *Aspergillus* spp. certamente estão entre os mais importantes fungos produtores de micotoxinas. Entre as micotoxinas que eles produzem, a ocratoxina A (OA) está recebendo grande atenção devido suas propriedades nefrotóxicas, imunossupressivas, carcinogênicas e teratogênicas.

Dentre os produtos destinados à alimentação humana, o café tem sido alvo de inúmeros estudos direcionados à detecção de contaminação, tanto por fungos produtores de ocratoxina A, como também da própria toxina. No Brasil, a produção de café é uma atividade de grande impacto econômico, haja vista que o país é considerado o maior produtor mundial de café, assumindo 31 % da produção. O Brasil também é o maior exportador mundial do produto, contribuindo com 25 % das exportações totais.

A ocratoxina A foi descrita inicialmente como um metabólito secundário de *A. ochraceus* e mais tarde foi detectada em várias outras espécies relacionadas de *Aspergillus* e também em *Penicillium*. Em climas frios, a origem de OA está associada ao gênero *Penicillium*, enquanto que em climas tropicais e subtropicais, associa-se ao gênero *Aspergillus*. No entanto, recentemente, a espécie *Aspergillus ochraceus* foi desmembrada em *A. ochraceus* e *A. westerdijkiae*. Segundo os autores do estudo, *A. westerdijkiae* é considerado um forte produtor de ocratoxina A, com alta frequência de isolados produtores da toxina. Por outro lado, *A. ochraceus* foi classificado como produtor inconsistente de ocratoxina A.

As técnicas tradicionais para detecção e identificação de fungos produtores de micotoxinas, geralmente são demoradas (5-7 dias) e frequentemente os caracteres morfológicos passíveis de serem utilizados são insuficientes para distinguir espécies próximas.

Frente ao exposto, com os avanços da biologia molecular, a utilização de marcadores moleculares tem sido considerada uma alternativa atrativa para viabilizar uma rápida, específica e sensível detecção de fungos toxigênicos em alimentos. Dentre as estratégias fundamentadas em marcadores moleculares, destaca-se a reação da polimerase em cadeia em tempo real (PCR em tempo real). Esta é vantajosa sobre a PCR tradicional porque permite não só detectar, mas também quantificar o fungo presente em uma amostra de alimento em função do número de cópias de um dado segmento de DNA.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo desenvolver um marcador molecular espécie-específico para *Aspergillus westerdijkiae* e estabelecer um sistema para detecção e quantificação desse fungo ocratoxigênico em grãos de café por PCR em tempo real.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Ocratoxina A: Aspectos Gerais

Micotoxina é a denominação genérica atribuída a uma ampla gama de moléculas tóxicas naturais de baixo peso molecular provenientes do metabolismo secundário de fungos. As micotoxinas podem estar contidas no micélio, no interior dos esporos ou serem liberadas no substrato contaminado por fungos produtores. Estes metabólitos constituem um conjunto altamente heterogêneo tanto no aspecto tóxico quanto no aspecto químico, e a única propriedade em comum que os agrupa de fato é que esses compostos causam uma resposta denominada micotoxicose, quando ingeridos por seres humanos e outros vertebrados (BENNETT, 1987; SWEENEY & DOBSON, 1999).

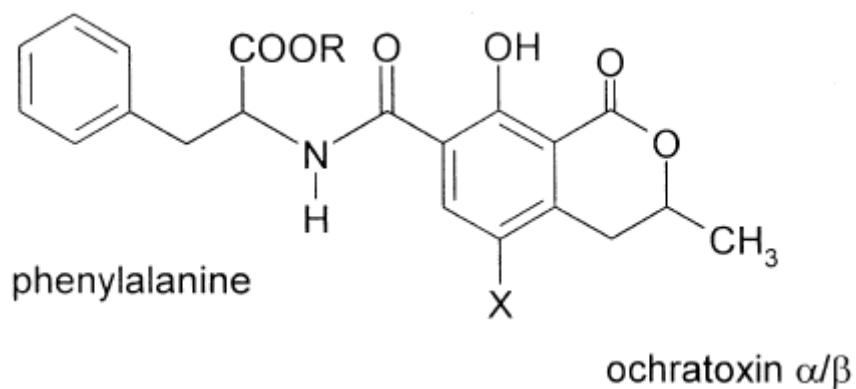
O termo micotoxina foi proposto pela primeira vez em 1962 quando mais de 100.000 perus morreram no Reino Unido em decorrência de hemorragia e necrose hepática. Este surto ficou conhecido como “Turkey “X” disease” (BLOUT, 1961; FORGACS & CARLL, 1962). Mais tarde, extensivas investigações revelaram que esta doença fôra causada por uma toxina presente no amendoim utilizado para produção da ração destinada à alimentação dos perus (GOLDBLATT, 1969). Esta toxina seria proveniente da contaminação dos amendoins por um fungo chamado *Aspergillus flavus*, nome a partir do qual o metabólito foi denominado aflatoxina, do termo em inglês “*A. flavus* toxin”. Esse acontecimento sensibilizou os cientistas de que este metabólito secundário, como também outros produzidos por diferentes espécies de fungos poderiam ser letais para a espécie humana.

Posteriormente, o termo micotoxina foi estendido para outros compostos previamente isolados a partir de fungos e também para novos metabólitos secundários revelados em estudos direcionados ao descobrimento de micotoxinas (BENNETT & KLICH, 2003). Turner (1978) catalogaram 1.200 metabólitos secundários fúngicos produzidos por aproximadamente 500 espécies de fungos. Posteriormente, Turner & Alderidge (1983), catalogaram mais 2.000 metabólitos secundários fúngicos produzidos por aproximadamente 1.100 espécies de fungos. Porém, até o momento, o que a literatura aponta com clareza, é que cerca de 300 compostos são reconhecidos como pertencentes à classe das micotoxinas (COLE & COX, 1981), classe esta, dividida em grupos relacionados quimicamente. Alguns grupos recebem atenção especial devido à potencialidade em contaminar produtos destinados à alimentação de animais e seres humanos. Como exemplo tem-se o grupo das aflatoxinas, tricotecenos, fumonisinas, zearalenona, alcalóides e ocratoxinas (CAST, 2003).

As ocratoxinas formam o primeiro grupo de micotoxinas caracterizadas depois da aflatoxina (ABARCA et al., 2000). As toxinas deste grupo são compostos que apresentam uma β -fenilalanina ligada a uma isocumarina através de uma ligação amida. As ocratoxinas dividem-se em ocratoxina A, ocratoxina B e ocratoxina C, segundo Scussel (1998). A ocratoxina A (Figura 1) recebe atenção especial, uma vez que é considerada a mais abundante e mais tóxica molécula dentre as ocratoxinas encontradas na natureza (CHU et al., 1976; KROGH, 1977). Esta micotoxina caracteriza-se por apresentar fluorescência esverdeada quando exposta à luz ultravioleta e um átomo de cloro ligado ao carbono 5 da porção isocumárica. A ocratoxina B (OB) (Figura 1) é um análogo da OA desprovido do átomo de cloro e apresenta-se com no mínimo uma ordem de magnitude menos tóxica que a OA (DIRHEIMER & CREPPY, 1991). Isso sugere que a ausência do átomo de cloro

influencia nas propriedades de dissociação do grupo fenólico e nas propriedades quelantes da molécula, o que pode ser responsável pela diferença entre a toxicidade da OB e da OA (CHU, 1974). Por sua vez, a ocratoxina C (OC) (Figura 1) constitui um etil éster da ocratoxina A, apresentando toxicidade inferior à ocratoxina B (SCUSSEL, 1998).

O nome ocratoxina é derivado da espécie fúngica *Aspergillus ochraceus*, fungo a partir do qual esta micotoxina foi isolada e caracterizada pela primeira vez (VAN DER MERWE et al., 1965). Quimicamente, a ocratoxina A {N-[(5-chloro-3,4-dihydro-8-hydroxy-3-methyl-1-oxo-1H-2-benzopyran-7-yl)-carbonyl]-3-phenyl-L-alanine} é formada por uma porção clordiidro-isocumarina ligada a um grupo L-β fenilalanina através de uma ligação amida (Figura 1).



	X	R
Ochratoxin A	-Cl	-H
Ochratoxin B	-H	-H
Ochratoxin C	-Cl	-CH ₂ -CH ₃

Figura 1: Estrutura química das ocratoxinas (PETZINGER & ZIEGLER, 2000).

A ocratoxina A despertou maior interesse por parte da comunidade científica após ter sido relacionada à Nefropatia Endêmica dos Bálcãs (BEN), uma disfunção renal crônica degenerativa ocorrida em meados da década de 50, que acometeu grande parte de uma população adulta na região dos Bálcãs (KROGH et al., 1977). Extensivas investigações epidemiológicas apontaram a ocratoxina A como agente causal da BEN, quando as análises dos tumores desenvolvidos no trato urinário foram correlacionadas com a alta concentração desta micotoxina no sangue dos pacientes da região (PETKOVA-BOCHAROVA et al., 1988). Além disso, estudos anteriores já haviam mostrado a presença de ocratoxina A em alimentos cultivados na região dos Bálcãs, revelando que a ocorrência desta micotoxina era mais freqüente na região onde a BEN era prevalente (BALZER et al., 1977; KROGH et al., 1977; PAVLOVIC et al., 1979; PETKOVA-BOCHAROVA et al., 1985).

Relatos da literatura apontam que a potencialidade em produzir ocratoxina A está associada a dois gêneros fúngicos: *Aspergillus* e *Penicillium*. Dentre os representantes do gênero *Aspergillus* secção *Circumdati* destacam-se: *A. flocculosus*, *Neopetromyces muricatus*, *A. ochraceus*, *A. roseoglobulosus*, *A. sclerotiorum*, *A. westerdijkiae*, *A. sulphureus*, *A. steynii*, *A. cretensis*, *A. elegans* e *A. pseudoelegans* (FRISVAD et al., 2004); *A. melleus*, *A. ostianus*, *A. persii* e *A. petrakii* (HESSELTINE et al., 1972). Outras duas secções também apresentam espécies produtoras de OA. *A. glaucus* (VARGA et al., 1996) como representante da secção *Aspergillus* e como representantes da secção *Nigri*: *A. niger* var. *niger* (ABARCA et al., 1994), *A. carbonarius* (TÉREN et al., 1996), *A. lacticoffeatus* e *A. sclerotioniger* (SAMSON et al., 2004). Em *Penicillium*, a ocratoxina A foi primeiramente detectada em *P. viridicatum* (CIEGLER et al., 1973). Entretanto, Pitt (1987) associou a produção de OA apenas a isolados de *P. verrucosum*. Posteriormente, *P.*

chrysogenum e *P. nordicum* também foram relatados como produtores de ocratoxina A (LAND & HULT, 1987; MILLS & ABRAMSON, 1982).

Embora haja grande discrepância entre o número de espécies produtoras de ocratoxina A entre representantes pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, a origem desta micotoxina em climas frios e temperados está geralmente associada com a presença da espécie *Penicillium verrucosum*, enquanto que em temperaturas quentes como em regiões de clima tropical e subtropical é normalmente associada com *Aspergillus ochraceus* (PITT, 2000a; ABARCA et al., 2001).

A ocratoxina A já foi encontrada em vários alimentos prevalentes na dieta humana em decorrência da contaminação por espécies ocratoxigênicas. A presença da ocratoxina A em milho, data da década de 60, quando esta micotoxina foi relatada pela primeira vez como contaminante de produtos destinados à alimentação humana (SHOTWELL et al., 1969).

Posteriormente, esforços direcionados neste âmbito revelaram a presença de ocratoxina A em uma ampla variedade de produtos alimentícios e bebidas, incluindo cereais (TRUCKSESS et al., 1999); café verde, torrado, moído e solúvel (FURLANI et al., 1998; JORGENSEN et al., 1998; PARDO et al., 2004); coco e derivados (MATISSEK & RATERS, 2000), pimenta do reino (THIRUMALA et al., 2000); uvas (BATTILANI & PIETRI, 2002; BELLÍ et al., 2004), frutas secas (MACDONALD et al., 1999; MAFF, 2002; ABARCA et al., 2003; IAMANAKA et al., 2005), e bebidas como café, leite, cerveja (JORGENSEN, 1998; SCOTT & KANHERE, 1995; NAKAJIMA et al., 1999; TRUCKSESS et al., 1999; VISCONTI et al., 2001), sucos de uvas e também, em vinhos (ZIMMERLI & DICK, 1996; BURDASPAL & LEGARDA, 1999; OTTENEDER & MAJERUS, 2000).

A ocratoxina A pode ter efeito cumulativo na cadeia alimentar porque sua meia-vida no organismo é longa (GALTIER, 1991). Primeiramente, ela é absorvida pelo trato gastrintestinal e sua distribuição dentro do organismo se dá via corrente sanguínea, sendo acumulada principalmente no rim. Também é encontrada no fígado, porém em baixa quantidade. A transferência desta micotoxina para o leite foi demonstrada em ratos e coelhos, bem como em humanos, porém mínimas quantidades foram detectadas em leite bovino, sugerindo que a ocratoxina A é metabolizada pela microbiota do rumem (CREPPY, 2002).

Muitos são os efeitos nocivos atribuídos a esta micotoxina, dentre eles os principais são: nefrotoxicidade, imuno-supressão, e genotoxicidade (KROGH et al., 1974; HAUBECK et al., 1981; ARORA et al., 1983; CREPPY et al., 1985). Além disso, investigações em modelos experimentais forneceram evidências suficientes para que a ocratoxina A fosse classificada, pela Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer, como potencial carcinogênico para humanos (grupo 2B) (IARC, 1993).

3.2 Ocratoxina A no café

O café é um dos principais produtos agrícolas mundiais, produzido em mais de 60 países e movimentado de 10 a 12 bilhões de dólares por ano em todo o mundo. A produção comercial de café conta com duas espécies, *Coffea arabica* (arabica) e *C. canephora* (robusta), que representa cerca de 70% e 30% respectivamente do total do café comercializado (VIEIRA et al., 2006).

No Brasil, a produção de café é uma atividade de grande impacto econômico, seja pela formação de capital no setor agrícola, principalmente em pequenas propriedades, ou pela contribuição na geração de empregos no campo, indústria e comércio. O Brasil é o maior produtor mundial de café assumindo 31 % da produção. O Brasil também é o maior exportador mundial do produto, contribuindo com 25 % das exportações. Em 2005, o Brasil produziu e exportou, respectivamente, 32,9 e 25,8 (ABIC, 2006) milhões de sacas de 60 Kg. Possui um total de 2.217.666 ha de área plantada com 5.324.482.000 cafeeiros, além de 175.625 ha em formação (CONAB, 2006). A estimativa para a safra 2006/2007 é de 41,573 milhões de sacas de café beneficiados, sendo 32,061 milhões de sacas (77,1%) de *C. arabica* e 9,512 milhões (22,9%) de *C. canephora*. (CONAB, 2006). Com relação à demanda do café, os principais consumidores e importadores do café brasileiro são os Estados Unidos e a União Européia, onde os valores assumem cerca de 24 % e 46 % do consumo mundial, respectivamente (http://www.economiaemdia.com.br/br/pdf/producao/AGRO_ANALISE_05_01_06.pdf).

Alguns fatores podem prejudicar de maneira sensível a qualidade do produto e conseqüentemente sua comercialização. Dentre estes fatores destaca-se a presença de ocratoxina A em grãos de café verde. Desde 2002, países como Espanha, Itália e Holanda estão avaliando a segurança microbiológica dos lotes de grãos de café importados mediante a quantificação da ocratoxina A. A título de informação, em 2002, dois alertas máximas foram expedidos pela União Européia ao Itamarati – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, sobre a devolução de lotes de café brasileiro exportado com níveis indesejáveis de ocratoxina A (> 10 ng/g).

A presença de ocratoxina A em grãos de café verde foi relatada pela primeira vez por Levi et al. (1974). Na época, pouca atenção foi dada a esta descoberta, provavelmente

por acreditar-se que a toxina seria destruída durante o processo de torrefação e preparo da bebida. Somente na década de 80, surgiram os primeiros trabalhos relacionados à estabilidade da ocratoxina A. Embora os diferentes trabalhos que fizeram análise da persistência da OA no café bebida discordem com relação ao percentual de destruição durante o processamento, há concordância na literatura que a ocratoxina A não é totalmente destruída durante o processo de torrefação dos grãos de café e, por isso, é consumida através da ingestão do preparo final da bebida (TSUBOUCHI et al., 1988; STUDER-ROHR et al., 1995; TRUCKSESS et al., 1999; LOMBAERT et al., 2002).

Atualmente, existe um extensivo acervo de trabalhos que relatam a presença de ocratoxina A em grãos de café em diversos estágios de maturação, bem como em café processado, e também o isolamento de fungos produtores de OA a partir de grãos de café (LEVI et al., 1974; LEVI, 1975; LEVI, 1980; JESENSKA et al., 1983; TSUBOUCHI et al., 1985; STUDER-ROHR et al., 1995; VD STEGEN et al., 1997; PATEL et al., 1997; JORGENSEN, 1998; BLANC et al., 1998; TRUCKSESS et al., 1999; ROMANI et al., 2000; URBANO et al., 2001; BATISTA et al., 2003; TANIWAKI et al., 2003; MAGNANI et al., 2005; VARGAS et al., 2005; VENTURA et al., 2005; JORGENSEN, 2005; VARGAS et al., 2006; SUGITA-KONISHI et al., 2006; VEGA et al., 2006; FUJII et al., 2006).

A presença de ocratoxina A em grãos de café está normalmente associada com a falta de controle no procedimento da colheita, secagem insuficiente e condições inadequadas de armazenamento e transporte dos grãos, permitindo, desta maneira, a proliferação de fungos toxigênicos (BUCHELI et al., 1998; BUCHELI et al., 2000; URBANO et al., 2001; BUCHELI & TANIWAKI, 2002; TANIWAKI et al., 2003; SUÁREZ-QUIROZ et al., 2005; MAGAN & ALDRED, 2005; KOUADIO et al., 2006).

Para grãos de café verde, a ocratoxina A já foi encontrada em níveis que variam de 0,1 – 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (TSUBOUCHI et al., 1987; MICCO et al., 1989; BLANC et al., 1998; TRUCKSESS et al., 1999; ROMANI et al., 2000; TANIWAKI et al., 2003), enquanto os níveis de OA encontrados em café torrado variam de 0,05 – 23,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (TSUBOUCHI et al., 1988; STUDER-ROHR et al., 1995; PATEL et al., 1997; TRUCKSESS et al., 1999; LEONI et al., 2000; LOMBAERT et al., 2002).

Frente ao exposto, o consumo de café pode aumentar a exposição humana à ocratoxina A. Estima-se que 12 % da ingestão total de ocratoxina A sejam provenientes do consumo do café (FAO, 1999). De acordo com Petzinger & Weidenbach (2002), na Alemanha, 14,2 – 14,5 % da ingestão total diária de ocratoxina A são atribuídos ao consumo desta bebida.

O consumo de bebidas de café contaminadas por ocratoxina A já fora relatado anteriormente por alguns autores. Studer-Rohr et al. (1995) mostraram a presença de ocratoxina A em bebidas de café comercializados na Suíça. vd Stegen et al. (1997) relataram a presença de ocratoxina A em diversos produtos derivados do café comercializados em mercados de diferentes países da União Européia. Em estudo semelhante, Patel et al. (1997) e Lombaert et al. (2002) também detectaram a presença de ocratoxina A em produtos derivados do café comercializados no Reino Unido e no Canadá, respectivamente.

Os limites de tolerância à ocratoxina A em café podem variar de acordo com a legislação em vigor estabelecida pelos países que comercializam os grãos do café, ou produtos derivados. Atualmente, o nível máximo de tolerância da ocratoxina A para o café imposto pelo Mercado Comum Europeu, principal importador do café brasileiro, é de 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ conforme Bayman & Baker (2006).

Em um trabalho extensivo de Taniwaki et al., (2003) foram coletadas 408 amostras de café provenientes de diferentes regiões do Brasil e em diferentes estágios de maturação. Das 408 amostras coletadas, 135 foram selecionadas para dosar a quantidade de ocratoxina A. Neste trabalho, os autores encontraram que 7 % das amostras continham níveis de OA acima de 5 µg/kg, 22 % das amostras continham níveis de OA na faixa de 0,2 – 5,0 µg/kg e os 71 % restantes com níveis de OA abaixo do limite de detecção (< 0,2 µg/kg). Embora a quantidade de ocratoxina A não tenha revelado resultados de maior preocupação, 46,6 % das amostras analisadas apresentaram contaminação por fungos potencialmente produtores da toxina. Ainda neste trabalho os autores concluíram que a maior taxa de infecção de grãos de café ocorre após a colheita, propondo o solo, os equipamentos e os pátios de secagem como sendo a fonte da contaminação fúngica do café brasileiro.

A espécie fúngica *Aspergillus ochraceus* já foi isolada de grãos de café por vários autores (URBANO et al., 2001; TANIWAKI et al., 2003; MARTINS et al., 2003; BATISTA et al., 2003; SUÁREZ-QUIROZ et al., 2004; MAGNANI et al., 2005) e proposta como a principal fonte de contaminação do produto por ocratoxina A (FRANK, 1999). Ainda, *A. carbonarius*, *A. niger*, *A. lacticoffeatus* e *A. sclerotioniger* também já foram isolados a partir de grãos de café (TÉREN, 1996; NAKAJIMA et al., 1997; JOOSTEN et al., 2001; URBANO et al., 2001; TANIWAKI et al., 2003; SAMSON et al., 2004; PARDO et al., 2004; SUÁREZ-QUIROZ et al., 2004), indicando que estas quatro espécies são fontes potenciais de OA em café.

No café, a produção de ocratoxina A por linhagens de *A. ochraceus* é predominante (FRANK, 1999; URBANO et al., 2001; TANIWAKI et al., 2003). Porém, *Aspergillus carbonarius*, *A. niger*, *A. lacticoffeatus* e *A. sclerotioniger* isolados a partir de amostras de café também se mostraram capazes de produzir ocratoxina A em regiões tropicais

(JOOSTEN et al., 2001; URBANO et al., 2001; TANIWAKI et al., 2003; SAMSON et al., 2004).

Em 2003, Taniwaki et al. constataram que a espécie *A. ochraceus* era o principal fungo responsável por produzir a ocratoxina A no café brasileiro, com 75 % dos isolados capazes de produzir a toxina. Embora *A. niger* tenha sido encontrado com maior frequência, apenas 3 % dos isolados foram capazes de produzir ocratoxina A, sugerindo que esta espécie fúngica não é uma fonte importante de contaminação do café por OA. Trabalhos prévios também já haviam mostrado que o fungo *A. ochraceus* era a principal fonte de ocratoxina A em grãos de café (FRANK, 1999; URBANO et al. 2001).

Ainda no que diz respeito à contaminação do café brasileiro com fungos produtores de ocratoxina A, em 2006, Chalfoun & Batista confirmaram os resultados anteriores, mostrando mais uma vez que o principal fungo presente nas amostras de café pertencia à espécie *Aspergillus ochraceus*, porém com uma porcentagem de isolados potencialmente produtores da toxina de 95 %, resultado superior ao descrito por Taniwaki et al. (2003).

3.3 Secção *Circumdati*: *Aspergillus ochraceus* e *Aspergillus westerdijkiae*

A secção *Circumdati*, denominada grupo dos *Aspergillus ochraceus* de acordo com Raper & Fennell (1965), compreende modelos biológicos amplamente empregados nas mais diversas áreas da pesquisa científica, principalmente devido à potencialidade em produzir micotoxinas, incluindo a ocratoxina A (VAN DER MERVE et al., 1965); ácido penicílico (CIEGLER, 1972) e xantomegninas (xantomegnina, viomeleína e vioxantina)

(STACK & MISLIVEC, 1978; ROBBERS et al., 1978). Além disso, esses fungos são empregados em indústrias, especificamente em processos que envolvem transformação bioquímica de compostos (SINGH et al., 1968; MISKI & DAVIS, 1988; CHEN et al., 1994). Algumas espécies, como *A. sclerotiorum* e *A. melleus* são fontes de enzimas proteolíticas (KUNDU et al. 1974; LUISETTI et al. 1991) enquanto que os esclerócios de várias outras espécies contêm metabólitos com atividade inseticida (DE GUZMAN et al., 1994; WICKLOW et al., 1996; WHYTE et al., 1996).

A taxonomia clássica dos *Aspergillus* pertencentes à secção *Circumdati*, segue as seguintes características: conídios pequenos e bisseriados, com coloração variando em um gradiente de amarelo à ocre, esclerócios não negros e produção de no mínimo uma das micotoxinas citadas anteriormente (RAPER & FENNELL, 1965; FRISVAD et al., 2004). Esta secção inclui a fase anamórfica associada à espécie teleomórfica *Neopetromyces muricatus* (FRISVAD & SAMSON, 2000). Uma exceção é a espécie *Aspergillus auricomus* que não produz nenhuma das micotoxinas características desta secção e ainda apresenta esclerócios negros. Porém, o seqüenciamento do gene que codifica para a β -tubulina revelou que *A. auricomus* é fortemente relacionada com as demais espécies da secção (FRISVAD et al., 2004).

Nos últimos anos, com os avanços no campo da biologia molecular, a análise de ácidos nucléicos vem contribuindo significativamente para a organização e compreensão da variabilidade existente entre os vários representantes da secção *Circumdati*. A taxonomia molecular, fundamentada em marcadores moleculares de RAPD, PCR-RFLP de DNA mitocondrial e seqüenciamento de genes que codificam para β -tubulina e RNA ribossomal, além de regiões intergênicas como ITS1 e ITS2, tem sido de grande utilidade para a reorganização taxonômica da secção *Circumdati* (VARGA et al., 2000a; VARGA et al.,

2000b; VARGA et al., 2000c; FUNGARO et al., 2004a; FUNGARO et al., 2004b; FRISVAD et al., 2004).

É importante classificar e identificar essas espécies corretamente, uma vez que podem contaminar produtos destinados à alimentação humana com micotoxinas. Essa contaminação pode refletir em impactos na saúde humana como também pode atingir a economia do país, quando detectada em produtos destinados à exportação, como é o caso do café. Ainda, esses microrganismos são utilizados como biotransformadores em indústrias, exigindo o emprego de agentes não toxigênicos.

Utilizando seqüências de nucleotídeos da região ITS1-5,8S-ITS2, Varga et al. (2000a) verificaram que a espécie *Petromyces muricatus*, atual *Neopetromyces muricatus*, era um membro da secção *Circumdati*, pois se apresentou fortemente relacionado ao *A. ochraceus*. A filogenia baseada na seqüência das regiões ITS (Internal Transcribed Spacer) e do gene que codifica para RNAr 5,8s apontaram duas espécies (*P. alliaceus* e *P. albertensis*) antes incluídas na secção *Circumdati*, como pertencentes à secção *Flavi*.

No mesmo ano, esses autores avaliaram a variabilidade entre as seqüências obtidas a partir da região ITS1-5,8S-ITS2 de algumas espécies de *Aspergillus* previamente identificadas como pertencentes à secção *Circumdati*. Neste trabalho, os autores propuseram a divisão da secção em dois clados principais: o clado I, formado por *A. ochraceus*, *A. petrakii*, *A. melleus*, e *A. ostianus*; e o clado II compreendendo as espécies *A. sclerotiorum*, *A. sulphureus*, *A. bridgeri* e *A. insulicola*. Ainda no clado II, foram agrupadas uma linhagem de *A. melleus* (IMI 257368) e uma linhagem de *A. ochraceus* (ICMP 939) (VARGA et al., 2000c).

Ainda em 2000, Varga et al. (2000b), mostraram que os isolados de *A. ochraceus* formavam dois principais grupos filogenéticos distintos, e simplesmente não discutiram a

posição da cepa *A. ochraceus* NRRL 3174, a qual é usada frequentemente como modelo para estudos de fisiologia e biossíntese da produção de ocratoxina A, e que não foi incluída em nenhum dos grupos.

Em estudo semelhante, Fungaro et al. (2004b) também analisaram a filogenia molecular entre representantes de *A. ochraceus* isolados a partir de amostras de café brasileiro. Os autores verificaram que os isolados formavam dois grupos principais, porém com a maioria dos isolados fúngicos formando o mesmo grupo em que se encontrava a cepa *A. ochraceus* NRRL 3174. Os autores sugeriram então uma nova classificação filogenética para isolados de *A. ochraceus*, dividida em 2 grupos principais: Grupos A e B. O grupo A subdividido em subgrupos A1 e A2, correspondentes aos dois grupos sugeridos por Varga et al. (2000b); e um novo grupo denominado B, o qual acomodaria a maioria dos isolados brasileiros e a cepa *A. ochraceus* NRRL 3174.

Então, ainda no ano de 2004, a secção *Circumdati* foi revista por Frisvad et al. (2004). Neste trabalho, os autores reclassificaram os integrantes da secção *Circumdati*, sugerindo uma secção constituída por 20 espécies distintas fortemente relacionadas, tanto fenotípica quanto filogeneticamente. Sete novas espécies foram descritas neste trabalho. Segundo os autores, a secção *Circumdati* passa a ser representada pelas seguintes espécies: *A. steynii*, *A. elegans*, *A. flocculosus*, *A. ochraceopetaliformis*, *A. isulicola*, *A. pseudoelegans*, *A. melleus*, *A. petrakii*, *A. ostianus*, *A. ochraceus*, *A. westerdijkiae*, *A. cretensis*, *A. auricomus*, *A. roseoglobulosus*, *A. neobrigeri*, *A. sclerotiorum*, *A. persii*, *A. sulphureus*, *A. bridgeri* e *Neopetromyces muricatus*. É interessante ressaltar que neste estudo, a espécie *Aspergillus ochraceus* foi desmembrada em *A. ochraceus* e *A. westerdijkiae*. Desta forma, baseando-se em resultados previamente publicados, foi possível verificar que os isolados de *A. ochraceus* que formavam o grupo B sugerido por Fungaro et

al. (2004b) foi designado como uma nova espécie, a qual passa agora a ser chamada de *Aspergillus westerdijkiae*. Conseqüentemente, a cepa *A. ochraceus* NRRL 3174, a partir da qual a ocratoxina A foi isolada e caracterizada pela primeira vez (VAN DER MERWE, 1965) e que até hoje é utilizada como padrão para estudos de fisiologia e biossíntese da OA, passa agora a ser chamada de *A. westerdijkiae*.

Este grupo de organismos é especialmente bem conhecido por sua capacidade em produzir ocratoxina A e pela contaminação de produtos alimentícios com esta toxina, principalmente no que se refere ao café (LEVI et al., 1974; TSUBOUCHI et al., 1984; STUDER-ROHR et al., 1995; BATISTA et al., 2003; MARTINS et al., 2003; TANIWAKI et al., 2003; CHALFOUN et al., 2006). Segundo Frisvad et al. (2004), *A. westerdijkiae* é um fungo que produz grande quantidade de ocratoxina A e que ainda, apresenta a maioria dos isolados com capacidade para produzir tal toxina. Por outro lado, *A. ochraceus* passa agora a ser classificado como um produtor inconsistente de OA, e com poucos isolados potencialmente produtores da mesma.

Após toda esta reorganização da secção *Circumdati*, dentre as espécies que a constitui, *A. ochraceus*, *A. westerdijkiae* e *A. steynii* são as principais espécies responsáveis pela contaminação de alimentos por ocratoxina A (FRISVAD et al., 2004). Especificamente no que se refere ao café originário do Brasil, pode-se concluir que a principal fonte de ocratoxina A é a espécie *A. westerdijkiae*. Sendo assim, é fácil compreender a necessidade de se desenvolver métodos específicos para detecção e quantificação da espécie em questão, de modo que este seja utilizado como controle de qualidade, haja vista que este fungo é considerado um contaminante comum de produtos armazenados ou em processo de secagem (SWEENEY et al., 1999).

3.4 Diagnóstico molecular de fungos produtores de ocratoxina A

A contaminação de produtos envolvidos na alimentação de animais e seres humanos por micotoxinas oferece riscos à saúde humana e dos animais, além de causar prejuízos econômicos em casos onde esses metabólitos aparecem em quantidades superiores aos limites impostos para comercialização. Cereais, produtos derivados de carne, café e uva e derivados, são os principais produtos identificados como fontes de entrada de ocratoxina A na cadeia alimentar (NIESSEN et al., 2005).

A detecção e identificação de fungos produtores de ocratoxina A através da taxonomia clássica é baseada em características microscópicas e macroscópicas como também em cultivos apropriados que permitam a produção da micotoxina. Este tipo de identificação é relativamente demorado, e o número de marcadores morfológicos e bioquímicos passíveis de serem utilizados é freqüentemente pequeno, o que dificulta a identificação e/ou classificação de espécies próximas. Além disso, na maioria das vezes é exigida uma análise peculiar por parte de um taxonomista clássico com profundo conhecimento do gênero em questão.

Duas secções pertencentes ao gênero *Aspergillus* (*Circumdati* e *Nigri*) apresentam integrantes potencialmente produtores de ocratoxina A em café. Entre as espécies da secção *Nigri*, *A. carbonarius* possui alto percentual de isolados capazes de produzir a toxina em grande quantidade (HEENAN et al., 1998). Segundo relatos na literatura, *A. carbonarius* foi descrito como o principal produtor de ocratoxina A em uvas e derivados (PITT et al., 2000b; CABAÑES et al., 2002), enquanto *A. ochraceus* (recentemente desmembrado em *A.*

ochraceus e *A. westerdijkiae*) ocuparia o título de principal produtor de OA em grãos de café (LOGRIECO et al., 2003; TANIWAKI et al., 2003).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2002), *Aspergillus carbonarius* e *Aspergillus ochraceus* são as principais fontes de contaminação de produtos destinados à alimentação humana por ocratoxina A.

Esta situação demonstra a importância de se usar métodos apropriados para detectar e quantificar a carga micológica de interesse nos produtos destinados à alimentação humana e animal. Diante disso, recentemente, várias pesquisas vêm sendo realizadas no sentido de viabilizar a detecção de fungos ocratoxigênicos em alimentos através de técnicas moleculares.

Dentre as estratégias moleculares, destaca-se aquela que faz uso da Reação da Polimerase em Cadeia (PCR). A PCR é uma técnica que se aplica muito bem para este objetivo porque é simples, rápida, não exige grandes quantidades de DNA e é altamente sensível, principalmente, quando associada à hibridização com sonda complementar ao produto de amplificação, ao NESTED-PCR que permite detectar a presença de um microrganismo de interesse mesmo em baixa frequência, ou até mesmo a fluoróforos que intensificam a presença de um alvo quando associado à molécula de DNA proveniente do produto amplificado.

Para que a PCR possa ser empregada em diagnósticos de fungos toxigênicos é necessário o conhecimento de seqüências de nucleotídeos que sejam específicas para estes fungos. As possíveis seqüências a serem utilizadas como alvos podem ser divididas em dois grupos: as empíricas e as genes específicas. As seqüências alvo ditas empíricas são aquelas provenientes de qualquer parte do genoma que não se associa a nenhuma região

codificante, enquanto que o alvo gene específico é obtido a partir de uma seqüência de nucleotídeos de um determinado gene (FUNGARO & VIEIRA, 2001).

As principais estratégias que vêm sendo aplicadas para se desenvolver marcadores moleculares fundamentados em seqüências empíricas são baseadas em análise comparativa de perfis de RAPD (Polimorfismos de DNA Amplificados ao Acaso) e de AFLP (Polimorfismo de Tamanho de Fragmentos Amplificados) entre materiais distintos. Com relação aos fungos ocratoxigênicos, grande parte dos relatos da literatura visa à obtenção de marcadores moleculares empíricos para distinguir espécies potencialmente toxigênicas de espécies não-toxigênicas relacionadas. Idealmente, deve-se obter bandas distintivas entre uma dada espécie toxigênica e espécies relacionadas não-toxigênicas, as quais devem ser clonadas e sequenciadas para que posteriormente “primers” específicos sejam sintetizados. Estes “primers” poderão ser utilizados em reações de PCR específica para detectar a espécie produtora de ocratoxina A em diferentes tipos de alimentos.

Além de detecção molecular de microrganismos, atualmente há intensiva busca por métodos moleculares adequados para realizar também a quantificação desses microrganismos em amostras de produtos destinados à alimentação. Algumas estratégias que têm permitido a quantificação de determinados organismos alvos em alimentos baseiam-se na quantificação de ácidos nucléicos. Neste caso, destaca-se a técnica de PCR em tempo real, uma variante da PCR convencional, onde um sistema baseado em fluorescência permite a quantificação de ácidos nucléicos de um dado alvo presente em uma dada amostra.

Com a PCR em tempo real, além de detectar um alvo molecularmente, é possível determinar o número de ciclos de amplificação necessários para que uma amostra ultrapasse o limiar de fluorescência, chamado de *Ct*, do termo em inglês “Cycle

Threshold”. Este valor pode então ser utilizado para aferir o número de cópias iniciais de um determinado alvo presente em uma dada amostra. Basicamente, dois tipos principais de sistemas fluorescentes são empregados em análises de PCR em tempo real. Um primeiro que utiliza sondas seqüência-específica marcadas com fluorescência (TaqMan, Molecular Beacons e Amplifluor) (CLEGG, 1992; SELVIN, 1995); e um segundo que utiliza fluoróforos intercalantes na molécula de DNA (SYBR Green I). O SYBR Green I se liga na menor curvatura da molécula de DNA dupla fita, e neste caso, sua fluorescência aumenta em aproximadamente 100 vezes (DEPREZ et al., 2002).

Com objetivo de encontrar marcadores moleculares apropriados para a detecção molecular de *A. ochraceus*, Schmidt et al. (2003) examinaram a relação genética entre vários isolados da espécie *A. ochraceus* e vários isolados de outras espécies da mesma secção. A análise dos marcadores de AFLP revelou bandas comuns a todos os isolados de *A. ochraceus* e ausentes em isolados das demais espécies. Entretanto, os autores não encontraram marcadores moleculares capazes de discriminar isolados positivos para a produção de OA de isolados negativos para a produção desta toxina. Tanto isolados produtores como isolados não-produtores de OA foram agrupados aleatoriamente nos dendrogramas gerados a partir dos perfis de AFLP.

Embora Schmidt et al. (2003) não tenham obtido sucesso no desenvolvimento de marcadores moleculares para discriminar isolados produtores e não-produtores de ocratoxina A, eles desenvolveram o par de “primer” OCA-V/OCA-R para ser empregado em PCR convencional para detecção de *A. ochraceus*. No ano seguinte, este mesmo grupo (SCHMIDT et al., 2004a) aplicou os “primers” OCA-V e OCA-R na técnica de PCR em tempo real para detectar e quantificar a carga de *A. ochraceus* em amostras de grãos de café. Os resultados foram comparados com as quantidades de ocratoxina A existentes nas

amostras e uma correlação positiva entre a concentração de OA e a quantidade de DNA fúngico fora encontrada.

Os primeiros marcadores empíricos específicos para detecção de *A. carbonarius* foram desenvolvidos por Fungaro et al. (2004a), utilizando-se de marcadores de RAPD. Os “primers” denominados OPX7F₈₀₉ e OPX7R₈₀₉ foram utilizados com sucesso para detecção de *A. carbonarius* em amostras de grãos de café. Igualmente ao já então observado para *A. ochraceus*, nenhuma correlação fora encontrada entre os perfis de RAPD obtidos para os diferentes isolados de *A. carbonarius* e suas respectivas habilidades em produzir ocratoxina A. Há de se destacar que neste trabalho foram utilizados 425 “primers” de RAPD e uma estratégia de análise em “bulk” na tentativa de encontrar marcadores capazes de discriminar isolados produtores dos não produtores de OA. No mesmo ano, Schmidt et al. (2004b) também desenvolveram pares de primers (A1B_fw/A1B_rv e C1B_fw/C1B_rv) específicos para detecção de *A. carbonarius* através de PCR convencional.

A partir de vários estudos realizados anteriormente com o intuito de desenvolver “primers” espécie-específicos a serem aplicados em diagnóstico molecular através da técnica de PCR convencional, em 2006, Sartori et al. reuniram três pares de “primers” para realizar o que é chamado de PCR multiplex. Neste estudo, os autores desenvolveram um método para detectar simultaneamente representantes de *A. ochraceus*, *A. carbonarius* e *A. niger* em amostras de grãos de café. O método descrito torna o diagnóstico dessas espécies mais econômico e rápido, sendo toda a análise realizada dentro de apenas 48 horas.

Os alvos gene específicos são aquelas seqüências pertencentes a genes, que em certos casos geram marcadores moleculares que codificam para as enzimas que participam de uma via biossintética, por exemplo de micotoxinas. Dessa forma, além de marcador

molecular para um dado atributo, este alvo pode ser utilizado em análises de expressão gênica fornecendo dados relacionados à produção da toxina.

Mayer et al. (2003) utilizou um marcador molecular gene específico, tendo como alvo o gene *nor-1*, específico para fungos que produzem aflatoxina. Neste estudo, os autores compararam a quantificação de *A. flavus* cultivado em determinados substratos, através do ensaio convencional de UFC (Unidades Formadoras de Colônias) com análises feitas por PCR em tempo real. Os resultados mostraram que o marcador molecular foi aplicado com sucesso, mostrando-se altamente específico para fungos que apresentam o gene *nor-1*. Com relação à quantificação, os autores encontraram uma alta correlação entre os resultados verificados nos dois ensaios, porém com os valores obtidos por PCR em tempo real sempre superiores aos valores obtidos para UFC. Isso porque a própria natureza de crescimento de fungos filamentosos em forma de micélio pode fornecer um resultado subestimado em análises de UFC, além de se detectar apenas células viáveis neste tipo de ensaio.

A identificação e caracterização molecular de genes envolvidos na via biossintética das micotoxinas é essencial para compreender a organização, regulação e expressão desses genes. Primeiramente, isso forneceria informações de como as enzimas envolvidas na via biossintética funcionam em número e ordem das reações e também de fatores fisiológicos que controlam todo o processo. Consequentemente, este conhecimento ajudaria no desenvolvimento de marcadores moleculares especificamente para detecção da produção de micotoxinas e fungos micotoxigênicos em alimentos presentes na dieta humana. Finalmente, a elucidação de vias biossintéticas de micotoxinas poderia auxiliar no desenvolvimento de estratégias relacionadas ao controle biológico de fungos

micotoxigênicos como também para o desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas, resistentes à contaminação por micotoxinas.

De acordo com a estrutura química da ocratoxina A, e reconhecendo a falta de pesquisas sobre a via biossintética desta toxina, Huff & Hamilton, 1979 propuseram um esquema para a biossíntese da OA. No entanto, até o momento, somente um único gene confirmado ser fundamental para a biossíntese de ocratoxina A foi caracterizado molecularmente. O'Callaghan et al. (2003) através de transformação insercional sítio dirigida ("knock-out" gênico) mostrou que o gene que codifica para uma PKS (Polyketide Synthase) com domínio acil-transferase é essencial para a biossíntese de ocratoxina A em *Aspergillus ochraceus*. Em estudo complementar, os autores avaliaram a expressão do gene *pks* em diferentes condições de cultivos através da técnica de RT-PCR em tempo real. Neste trabalho, os autores mostraram que a expressão do gene *pks* está fortemente correlacionada com a produção de ocratoxina A pelo fungo. Além disso, os autores também apresentaram dois genes, que codificam para putativas monoxigenases tipo p450 (p450-H11 e p450-B03), que neste estudo, mostraram-se com perfil de expressão gênica semelhante ao perfil apresentado pelo *pks*, em todas as condições (O'CALLAGHAN et al., 2006).

Como base em conhecimentos químicos da ocratoxina A, sabe-se que este metabólito é um integrante da classe dos policetídeos. Com isso, em 2004, Geisen et al. utilizaram a genética reversa como ferramenta para desenvolver um par de "primers" para amplificar uma região de um gene codificante para uma PKS (Polyketide Synthase) (*otapksPN*) supostamente envolvida na biossíntese de ocratoxina A em *Penicillium nordicum*. Os autores então realizaram uma análise de RT-PCR em tempo real para avaliar a cinética de crescimento do fungo juntamente com a produção de ocratoxina A nas

respectivas amostras. De acordo com os resultados, a indução na expressão gênica (*otapksPN*) coincide muito bem com a produção da micotoxina, sugerindo que este marcador da propriedade “produção de ocratoxina A” pode ser utilizado para monitorar e quantificar a concentração desta micotoxina a partir da quantificação de RNAm do gene nas amostras.

Embora marcadores moleculares para detecção e/ou quantificação da espécie *Aspergillus ochraceus* já tenham sido publicados, atualmente, após essa espécie ser desmembrada em *A. ochraceus* e *A. westerdijkiae* (FRISVAD et al., 2004), nós constatamos que esses primers, que eram específicos, não o são mais, uma vez que os “primers” descritos por Schmidt et al. (2003) apresentam homologia para as duas espécies (*A. ochraceus* e *A. westerdijkiae*), (dados não publicados).

Frente aos relatos até aqui apresentados, existe hoje a necessidade de se desenvolver um marcador molecular espécie-específico para *Aspergillus westerdijkiae*, uma vez que este fungo é a principal fonte de ocratoxina A no café brasileiro. Além disso, este fungo é considerado um produtor consistente de ocratoxina A, além de apresentar grande parte dos isolados com capacidade de produzir esta micotoxina.

4. REFERÊNCIAS

ABARCA, M. L.; BRAGULAT, M. R.; CASTELLA, G.; CABAÑES, F. J. Ochratoxin A production by strains of *Aspegillus niger* var. *niger*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, p. 2650-2652, 1994.

ABARCA, M. L.; BRAGULAT, M. R.; CASTELLÁ, G.; ACCENSI, F.; CABAÑES, F. J. Hongos productores de micotoxinas emergentes. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 17, p. 63-68, 2000.

ABARCA, M. L.; ACCENSI, F.; BRAGULAT, M. R.; CABAÑES, F. J. Current importance of ochratoxin A-producing *Aspergillus* ssp. **Journal of Food Protection**, v. 64, p. 903-906, 2001.

ABARCA, M. L.; ACCENSI, F.; BRAGULAT, M. R.; CASTELLÁ, G.; CABAÑES, F. J. *Aspergillus carbonarius* as the main source of ochratoxin A contamination in dried vine fruits from the Spanish market. **Journal of Food Protection**, v. 66, p. 504-506, 2003.

ABICA (Associação Brasileira da Indústria de Café). 2006. Disponível em: <http://www.abic.com.br/estat_exporta_cafe.html>. Acesso em: 22 jan. 2007.

ARORA, R. G.; FROLEN, H.; FELLNER-FELDEGG, H. Inhibition of ochratoxin A teratogenesis by zearalenone and diethylstilboestrol. **Food and Chemical Toxicology**, v. 21, p. 779-783, 1983.

BALZER, I.; BOGDANIC, C.; MUZIC, S. Natural contamination of corn (*Zea mais*) with mycotoxins in Yugoslavia. **Annales de la Nutrition et de l'Alimentation**, v. 31, p. 425-430, 1977.

BATISTA, L. R.; CHALFOUN, S. M.; PRADO, G.; SCHWAN, R. F.; WHEALS, A. E. Toxigenic fungi associated with processed (green) coffee beans (*Coffea Arabica* L.). **International Journal of Food Microbiology**, v. 85, p. 293-300, 2003.

BATTILANI, P.; PIETRI, A. Ochratoxin A in grapes and wine. **European Journal of Plant Pathology**, v. 108, p. 639-643, 2002.

BAYMAN, P.; BAKER, J. L. Ochratoxins: a global perspective. **Mycopathologia**, v. 162, p. 215-223, 2006.

BELLÍ, N.; MARÍNS, S.; SANCHIS, V.; RAMOS, A. J. Influence of water activity and temperature on growth of isolates of *Aspergillus* section *Nigri* obtained from grapes. **International Journal of Food Microbiology**, v. 96, p. 19-27, 2004.

BENNETT, J. W. Mycotoxins, mycotoxicoses, mycotoxicology and mycopathology. **Mycopathologia**, v. 100, p. 3-5, 1987.

BENNETT, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, p. 497-516, 2003.

BLANC, M.; PITTET, A.; MUÑOZ-BOX, R.; VIANI, R. Behavior of ochratoxin A during green coffee roasting and soluble coffee manufacture. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 673-675, 1998.

BLOUT, W. P. Turkey "X" disease. **Turkeys**, v. 9, p. 52-77, 1961.

BRADESCO – Economia em dia. 2006. Disponível em: <http://www.economiaemdia.com.br/br/pdf/producao/AGRO_ANALISE_05_01_06.pdf>. Acesso em: 27 dez. 2006.

BUCHELI, P.; MEYER, I.; VUATAZ, A.; VIANI, R. Industrial storage of green Robusta coffee under tropical conditions and its impact on raw material quality and ochratoxin A content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 4507-4511, 1998.

BUCHELI, P.; KANCHANOMAL, C.; MEYER, I.; PITTET, A. Development of ochratoxin A during Robusta (*Coffea canephora*) coffee cherry drying. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 48: 1358-1362, 2000.

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

BURDASPAL, P. A.; LEGARDA, T. M. Ochratoxin A in wines and grape products originating from Spain and other European countries. **Alimentaria**, v. 36, p. 107-114, 1999.

CABAÑES, F. J.; ACCENSI, F.; BRAGULAT, M. R.; ABARCA, M. L.; CASTELLÁ, G.; MINGUEZ, S.; PONS, A. What is the source of ochratoxin A in wine? **International Journal of Food Microbiology**, v. 79, p. 213-215, 2002.

CAST (Council for Agricultural Science and Technology) – **Mycotoxins**: risks in plant, animal and human systems. Ames, Iowa, nº 139, p. 15, 2003.

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

CHEN, K. C.; YIN, W. S.; TIU, C.; HOUNG, J. Y.; 11 alpha- hydroxylation of progesterone using modified alginate-immobilized cells. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 16, p. 551-555, 1994.

CHU, F. S. Studies on ochratoxins. **CRC-Critical Reviews in Toxicology**, v. 2, p. 499-524, 1974.

CHU, F. S.; CHANG, F. C.; HINS DILL, R. D. Production of antibody against ochratoxin A. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 31, p. 831-835, 1976.

CIEGLER, A. Bioproduction of ochratoxin A and penicillic acid y members of the *Aspergillus ochraceus* group. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 18. p. 63-636, 1972.

CIEGLER, A.; FENNELL, D. I.; SANSING, G. A.; DETROY, R. W.; BENNETT, G. A. Mycotoxin-producing strains of *Penicillium viridicatum*: classification into subgroups. **Applied Microbiology**, v. 26, p. 271-278, 1973.

CLEGG, R. M. Fluorescence resonance energy transfer and nucleic acids. **Methods in Enzymology**, v. 211, p. 353-388, 1992.

COLE, R. J.; COX, R. H. **Handbook of toxic fungal metabolites**. Academic Press, New York, N.Y. 1981.

CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento). Terceira revisão da safra de café 2006/2007. Disponível em <<http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/3BoletimCafe.pdf>>. Acesso em: 01 nov. 2006.

CREPPY, E. E.; KANE, A.; DIRHEIMER, G.; LAFARGE-FRAYSSINET, C.; MOUSSET, S.; FRAYSSINET, C. Genotoxicity of ochratoxin A in mice: DNA single-strand break evaluation in spleen, liver and kidney. **Toxicology Letters**, v. 28, p. 29-35, 1985.

CREPPY, E. E. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. **Toxicology letters**, v. 127, p. 19-28, 2002.

DE GUZMAN, F. S.; BRUSS, D. R.; RIPPENTROP, J. M.; GLOEB, K. B.; GLOEB, J. B. Ochrindoles A-D: new bis-indolyl benzenoids from sclerotia of *Aspergillus ochraceus* NRRL 3519. **Journal of Natural Products**, v. 57, p. 634-639, 1994.

DEPREZ, R. H. L.; FIJNVANDRAAT, A. C.; RUIJTER, J. M.; MOORMAN, A. F. M. Sensitivity and accuracy of quantitative real-time polymerase chain reaction using SYBR green I depends on cDNA synthesis conditions. **Analytical Biochemistry**, v. 307, p. 63-69, 2002.

DIRHEIMER, G.; CREPPY, E. E. Mechanism of action of ochratoxin A. **IARC Scientific Publications**, v. 115, p. 171-186, 1991.

FAO/WHO/UNEP, 1999. **Conference Report, 3rd International Joint FAO/WHO/UNEP Conference on Mycotoxins**, Tunis, 1999.

FORGACS, J.; CARLL, W. T. Mycotoxicoses. **Advances in Veterinary Science**, v. 7, p. 273-382, 1962.

FRANK, J. M. HACCP and its mycotoxin control potential: ochratoxin A (OTA) in coffee production. **Proc. 7th Int. Committee Food Microbiol. Hyg.** The Netherlands, Veldhoven, p. 1222-1225, 1999.

FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. *Neopetromyces* gen. nov. and an overview of teleomorphs of *Aspergillus* subg. *Circumdati*. **Studies in Mycology**, v. 45, p. 201-207, 2000.

FRISVAD, C. J.; FRANK, J. M.; HOUBRAKEN, J. A. M. P.; KUIJPERS, A. F. A.; SAMSON, R. A. New ochratoxin A producing species of *Aspergillus* section *Circumdati*. **Studies in Mycology**, v. 50, p. 23-43, 2004.

FUJII, S.; RIBEIRO, R. M.; SCHOLZ, M. B.; ONO, E. Y.; PRETE, C. E.; ITANO, E. N.; UENO, Y.; KAWAMURA, O.; HIROOKA, E. Y. Reliable indirect competitive ELISA used for a survey of ochratoxin A in green coffee from the North of Paraná State, Brazil. **Food Additives and Contaminants**, v. 23, p. 902-909, 2006.

FUNGARO, M. H. P.; VIEIRA, M. L. C. Marcadores moleculares. In: SERAFINI, I.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. **Biotecnologia na agricultura e na agroindústria**. Agropecuária, 2001.

FUNGARO, M. H. P.; VISSOTTO, P. C.; SARTORI, D.; VILAS-BOAS, L. A.; FURLANETO, M. C.; TANIWAKI, M. H. A molecular method for detection of *Aspergillus carbonarius* in coffee beans. **Current Microbiology**, v. 49, p. 123-127, 2004a.

FUNGARO, M. H. P.; MAGNANI, M.; VILAS-BOAS, L. A.; VISSOTTO, P. C.; FURLANETO, M. C.; VIEIRA, M. L. C.; TANIWAKI, M. H. Genetic relationships among Brazilian strains of *Aspergillus ochraceus* based on RAPD and ITS sequences. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 50, p. 985-988, 2004b.

FURLANI, R. P. Z. **Ocratoxina A em café brasileiro**. Dissertação em Ciência dos Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas, SP, 1998.

GALTIER, P. Pharmacokinetics of ochratoxin A in animals. **IARC scientific publications**, v. 115, p. 187-200, 1991.

GEISEN, R.; MAYER, Z.; KAROLEWIEZ, A.; FÄRBER, P. Developmente of a real time PCR system for detection of *Penicillium nordicum* and for monitoring ochratoxin A production in foods by targeting the ochratoxin polyketide synthase gene. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 27, p. 501-507, 2004.

GOLDBLATT, L. **Aflatoxin: scientific background, control, and implications**. Academic Press, New York, N.Y. 1969.

HAUBECK, H. D.; LORKOWSKI, G.; KOLSCH, E.; ROSCHENTHALER, R. Immunosuppression by ochratoxin A and its prevention by phenylalanine. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 41, p. 1040-1042, 1981.

HEENAN, C. N.; SHAW, K. J.; PITT, J. I. Ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus niger* isolates and detection using coconut cream agar. **Journal of Food Mycology**, v. 1, p. 67-72, 1998.

HESELTIME, C. W.; VANDEGRAFT, E. E.; FENNELL, D. I.; SMITH, M. L.; SHOTWELL, O. L. Aspergilli as ochratoxin producers. **Mycologia**, v. 64, p. 539-550, 1972.

HUFF, W. E.; HAMILTON, P. B. Mycotoxins – their biosynthesis in fungi: ochratoxins – metabolites of combined pathways. **Journal of Food Protection**, v. 42, p. 815-820, 1979.

IAMANAKA, B. T.; TANIWAKI, M. H.; MENEZES, H. C.; VICENTE, E.; FUNGARO, M. H. P. Incidence of toxigenic fungi and ochratoxin A in dried fruits sold in Brazil. **Food Additives Contaminants**, v. 22, p. 258-1263, 2005.

IARC (International Agency for Research on Cancer). Ochratoxin A. In IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 56. **Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins**. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. p. 489-521, 1993.

JESENSKA, Z.; VESELY, D.; VESELA, D.; Ochratoxin A producing aspergilles in foodstuffs in the CSSR. **Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene. 1. Abt. Originale B, Hygiene**, v. 177, p. 108-112, 1983.

JOOSTEN, H. M. L. J.; GOETZ, J.; PITTET, A.; SCHELLENBERG, M.; BUCHELI, P. Production of ochratoxin A by *Aspergillus carbonarius* on coffee cherries. **International Journal of Food Microbiology**, v. 65, p. 39-44, 2001.

JORGENSEN, K.; Survey of pork, poultry, coffee, beer and pulses for ochratoxin A. **Food Additives Contaminants**, v. 15, p. 550-555, 1998.

JORGENSEN, K. Occurrence of ochratoxin A in commodities and processed food - a review of EU occurrence data. **Food Additives and Contaminants**, v. 22, p. 26-30, 2005.

KOUADIO, A. I.; AGBO, N. G.; LEBRIHI, A.; MATHIEU, F.; DOSSO, M. Effect of the frequency of the mixing of coffee cherries put out for drying on the kinetics of drying and the relationship to ochratoxin A production. **Food Additives and Contaminants**, v. 23, p. 295-304, 2006.

KROGH, P.; AXELSEN, N. H.; ELLING, F.; GYRD-HANSEN, N.; HALD, B.; HYLDGAARD-JENSEN, J.; LARSEN, A. E.; MADSEN, A.; MORTENSEN, H. P.; MOLLER, T.; PETERSEN, O. K.; RAVNSKOV, U.; ROSTGAARD, M.; AALUND, O.

Experimental porcine nephropathy. Changes of renal function and structure induced by ochratoxin A - contaminated feed. **Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica. Section A, Pathology**, v. 0, Sup. 246, 1-21, 1974.

KROGH, P. Mycotoxin tolerances in foodstuffs. **Annales de la Nutrition et de l'Alimentation**, v. 31, p. 411-414, 1977.

KROGH, P.; HALD, B.; PLESTINA, R.; CEOVIC, S. Balkan (endemic) nephropathy and foodborn ochratoxin A: preliminary results of a survey of foodstuffs. **Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica. Section B, Microbiology**, v. 85, p. 238-240, 1977.

KUNDU, A. K.; MANNA, S.; PAL, N. Purification and properties of a new extracellular collagenase from *Aspergillus sclerotiorum*. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 12, p. 441-443, 1974.

LAND, C. J.; HULT, K. Mycotoxin production by some wood-associated *Penicillium* spp. **Letters in Applied Microbiology**, v. 4, p. 41-44, 1987.

LEONI, L. A.; SOARES, L. M.; OLIVEIRA, P. L. Ochratoxin A in Brazilian roasted and instant coffees. **Food Additives and Contaminants**, v. 17, p. 867-870, 2000.

LEVI, C. P.; TRENK, H. L.; MOHR, H. K. Study of the occurrence of ochratoxin A in green coffee beans. **Journal - Association of Official Analytical Chemists**, v. 57, p. 866-870, 1974.

LEVI, C. P. Collaborative study of a method for the determination of ochratoxin A in green coffee. **Journal - Association of Official Analytical Chemists**, 58: 258-262, 1975.

LEVI, C. P. Mycotoxins in coffee. **Journal - Association of Official Analytical Chemists**, v. 63, p. 1282-1285, 1980.

LOGRIECO, A.; BOTTALICO, A.; MULÉ, G.; MORETTI, A.; PERRONE, G.; Epidemiology of toxigenic fungi and their associated mycotoxins for some Mediterranean crops. **European Journal of Plant Pathology**, v. 109, p. 645-667, 2003.

LOMBAERT, G. A.; PELLAERS, P.; CHETTIAR, M.; LAVALEE, D.; SCOTT, P. M.; LAU, B. P.-Y. Survey of Canadian retail coffees for ochratoxin A. **Food Additives and Contaminants**, v. 19, p. 869-877, 2002.

LUISETTI, M.; PICCIONI, P. D.; DYNE, K.; DONNINI, M.; BULGHERONI, A.; PASTURENZI, L.; DONNETTA, A. M.; PEONA, V. Some properties of the alkaline proteinase from *Aspergillus melleus*. **International Journal of Tissue Reactions**, v. 13, p. 187-192, 1991.

MACDONALD, S.; WILSON, P.; BARNES, K.; DAMANT, A.; MASSEY, R.; MORTBY, E.; SHEPHERD, M. J. Ochratoxin A in dried vine fruit: method development and survey. **Food Additives and Contaminants**, v. 16, p. 253-260, 1999.

MAGAN, N.; ALDRED, D. Conditions of formation of ochratoxin A in drying, transport and in different commodities. **Food Additives and Contaminants**, v. 22, p. 10-16, 2005.

MAGNANI, M.; FERNANDES, T.; PRETE, C. E. C.; HOMECHIM, M.; ONO, E. Y. S.; VILAS-BOAS, L. A.; SARTORI, D.; FURLANETO, M. C.; FUNGARO, M. H. P. Molecular identification of *Aspergillus* ssp. isolated from coffee beans. **Scientia Agricola**, v. 62, p. 45-49, 2005.

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

MATISSEK, R.; RATERS, M. Ochratoxin A in cocoa and human health aspects. **13th International Cocoa Research Conference**, Kota Kinabalu, Malaysia, 2000.

MAYER, Z.; BAGNARA, A.; FÄRBER, P.; GEISEN, R. Quantification of the copy number of *nor-1*, a gene of the aflatoxin biosynthetic pathway by real-time PCR, and its correlation to the cfu of *Aspergillus flavus* in foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 82, p. 143-151, 2003.

MICCO, C.; GROSSI, M.; MIRAGLIA, M.; BRERA, C. A study of the contamination by ochratoxin A of green roasted coffee beans. **Food Additives and Contaminants**, v. 6, p. 333-339, 1989.

MILLS, J. T.; ABRAMSON, D. Ochratoxigenic potential of *Penicillium* spp. isolated from stored rapessed and cereals in western Canada. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 4, p. 37-41, 1982

MAFF (Ministry of Agriculture, Fisheries and Food). Survey of nuts, nuts products and dried tree fruits for mycotoxins. **Food Safety Information Bulletin**, n° 21, United Kingdom, 2002.

MISKI, M.; DAVIS, P. J. Microbiologically catalized enantio and diastereoselective oxidation of chrysanthemol stereoisomers to chrysanthemic acid. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, p. 2267-2272, 1988.

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

NAKAJIMA, M.; TSUBOUCHI, H.; MIYABE, M. A.; UENO, Y. Survey of aflatoxin B₁ and ochratoxin A in commercial green coffee beans by high-performance liquid chromatography linked with immunoaffinity chromatography. **Food and Agriculture Immunology**, v. 9, p. 77-83, 1997.

NAKAJIMA, M.; TSUBOUCHI, H.; MIYABE, M. A survey of ochratoxin A and aflatoxins in domestic and imported beers in Japan by immunoaffinity and liquid chromatography. **Journal of AOAC International**, v. 82, p. 897-902, 1999.

NIESSEN, L.; SCHMIDT, H.; MÜHLENCOERT, E.; FÄRBER, P.; KAROLEWIEZ, A.; GEINSEN, R. Advances in the molecular diagnosis of ochratoxin-A producing fungi. **Food Additives and Contaminants**, v. 22, p. 324-334, 2005.

O'CALLAGHAN, J.; CADDICK, M. X.; DOBSON, A. D. W. A polyketide synthase gene required for ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus ochraceus*. **Microbiology**, v. 149, p. 3485-3491, 2003.

O'CALLAGHAN, J.; STAPLETON, P. C.; DOBSON, A. D. W. Ochratoxin A biosynthetic genes in *Aspergillus ochraceus* are differentially regulated by pH and nutritional stimuli. **Fungal Genetics and Biology**, v. 43, p. 213-221, 2006.

OTTENEDER, H.; MAJERUS, P. Occurrence of ochratoxin A (OTA) in wines: influence of the type of wine and its geographical origin. **Food Additives and Contaminants**, v. 17, p. 793-798, 2000.

PARDO, E.; MARÍN, S.; RAMOS, A. J.; SANCHIS, V. Occurrence of ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in green coffee from different origins. **Food Science Technology International**, v. 10, p. 45-49, 2004.

PATEL, S.; HAZEL, C. M.; WINTERTON, A. G.; GLEADLE, A. E. Survey of ochratoxin A in UK retail coffees. **Food Additives and Contaminants**, v. 14, p. 217-222, 1997.

PAVLOVIC, M.; PLESTINA, R.; KROGH, P. Ochratoxin A contamination of foodstuffs in an area with Balkan (endemic) nephropathy. **Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica. Section B, Microbiology**, v. 87, p. 243-246, 1979.

PETKOVA-BOCHAROVA, T.; CASTEGNARO, M. Ochratoxin A contamination of cereals in an area of high incidence of Balkan endemic nephropathy in Bulgaria. **Food Additives and Contaminants**, v. 5, p. 267-270, 1985.

PETKOVA-BOCHAROVA, T.; CHERNOZEMSKY, I. N.; CASTEGNARO, M. Ochratoxin A in human blood in relation to Balkan endemic nephropathy and urinary system tumours in Bulgaria. **Food Additives and Contaminants**, v. 5, p. 299-301, 1988.

PETZINGER, E.; ZIEGLER, K. Ochratoxin A from a toxicological perspective. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 23, p. 91-98, 2000.

PETZINGER, E.; WEIDENBACH, A. Mycotoxins in the food chain: the role of ochratoxins. **Livestock Production Science**, v. 76, p. 245-250, 2002.

PITT, J. I. *Penicillium viridicatum*, *Penicillium verrucosum*, and production of ochratoxin A. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, p. 266-269, 1987.

PITT, J. I. Toxigenic fungi: which are important? **Medical Mycology**, v. 38, p. 17-22, 2000a.

PITT, J. I. Toxigenic fungi and mycotoxins. **British Medical Bulletin**, v. 56, p. 184-192, 2000b.

RAPER, K. B.; FENNELL, D. I. **The genus *Aspergillus***. Willians and Wilkins, Baltimore, 1965.

ROBBERS, J. E.; HONG, S.; TUIITE, J.; CARLTON, W. W.; Production of xanthomegnin and viomellein by species of *Aspergillus* correlated with mycotoxicosis produced in mice. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 36, p. 819-823, 1978.

ROMANI, S.; SACCHETTI, G.; CHAVES-LOPEZ, C.; PINNAVAIA, G. G.; DALLA-ROSA, M. Screening on the occurrence of ochratoxin A in green coffee beans of different origins and types. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 3616-3619, 2000.

SAMSON, R. A.; HOUBRAKEN, J. A. M. P.; KUIJPERS, A. F. A.; FRANK, J. M.; FRISVAD, J. C. New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*. **Studies in Microbiology**, v. 50, p. 45-61, 2004.

SARTORI, D.; FURLANETO, M. C.; MARTINS, M. K.; PAULA, M. R. F.; PIZZIRANI-KLEINER, A.; TANIWAKI, M. H.; FUNGARO, M. H. P. PCR method for the detection of potencial ochratoxin-producing *Aspergillus* species in coffee beans. **Research in Microbiology**, v. 157, p. 350-354, 2006.

SCHMIDT, H.; EHRMANN, M.; VOGEL, R. F.; TANIWAKI, M. H.; NIESSEN, L. Molecular Typing of *Aspergillus ochraceus* and construction of species specific SCAR-primers based on AFLP. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 26, p. 138-146, 2003.

SCHMIDT, H.; BANNIER, M.; VOGEL, R.F.; NIESSEN, L. Detection and quantification of *Aspergillus ochraceus* in green coffee by PCR. **Letters in Applied Microbiology**, v. 38, p. 464-469, 2004a.

SCHMIDT, H.; TANIWAKI, M. H.; VOGEL, R. F.; NIESSEN, L. Utilization of AFLP markers for PCR-based identification of *Aspergillus carbonarius* and indication of its presence in green coffee samples. **Journal Applied Microbiology**, v. 97, p. 899-909, 2004b.

SCOTT, P. M.; KANHERE, S. R. Determination of ochratoxin A in beer. **Food Additives and Contaminants**, v. 12, p. 591-598, 1995.

SCUSSEL, V. M. **Micotoxinas em alimentos**. Insular, Florianópolis, p. 144, 1998.

SELVIN, P. R. Fluorescence resonance energy transfer. **Methods in Enzimology**, v. 246, p. 300-334, 1995.

SHOTWELL, O. L.; HESSELTINE, C. W.; GOULDEN, M. L. Ochratoxin A: occurrence as natural contaminant of a corn sample. **Applied Microbiology**, v. 17, p. 765-766, 1969.

SINGH, K.; SEHGAL, S. N.; VEZINE, C. Large-scale transformation of steroids by fungal spores. **Applied Microbiology**, v. 16, p. 393-400, 1968.

STACK, M. E.; MISLIVEC, P. B. Production of xanthomegnin and viomellein by isolates of *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium cyclopium* and *Penicillium viridicatum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 36, p. 552-554, 1978.

STUDER-ROHR, I.; DIETRICH, D. R.; SCHLATTER, J.; SCHLATTER, C. The occurrence of ochratoxin A in coffee. **Food and Chemical Toxicology**, v. 33, p. 341-355, 1995.

SUÁREZ-QUIROZ, M.; GONZÁLEZ-RIOS, O.; BAREL, M.; GUYOT, B.; SCHORR-GALINDO, S.; GUIRAUD, J. P. Study of ochratoxin A producing strains in coffee processing. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 39, p. 501-507, 2004.

SUÁREZ-QUIROZ, M.; GONZÁLEZ-RIOS, O.; BAREL, M.; GUYOT, B.; SCHORR-GALINDO, S.; GUIRAUD, J. P. Effect of the post-harvest processing procedure on OTA occurrence in artificially contaminated coffee. **International Journal of Food Microbiology**, v. 103, p. 339-345, 2005.

SUGITA-KONISHI, Y.; NAKAJIMA, M.; TABATA, S.; ISHIKURO, E.; TANAKA, T.; NORIZUKI, H.; ITOH, Y.; AOYAMA, K.; FUJITA, K.; KAI, S.; KUMAGAI, S. Occurrence of aflatoxins, ochratoxin A, and fumonisins in retail foods in Japan. **Journal of Food Protection**, v. 69, p. 1365-1370, 2006.

SWEENEY, M. J.; DOBSON, A. D. W. Molecular biology of mycotoxin biosynthesis. **FEMS Microbiology Letters**, v. 175, p. 149-163, 1999.

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.

TÉREN, J.; VARGA, J.; HAMARI, Z.; RINYU, E.; KEVEI, F. Immunochemical detection of ochratoxin A in black *Aspergillus* strains. **Mycopathologia**, v. 134, p. 171-176, 1996.

THIRUMALA, D. K.; MAYO, M. A.; GOPAL, R.; REDDY S. V.; DELFOSSE, P.; REDDY, D. V. R. Production of polyclonal antibodies against ochratoxin A and its detection in chilies by ELISA. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 5079 – 5082, 2000.

TRUCKSESS, M. W.; GILER, J.; YOUNG, K.; WHITE, K. D.; PAGE, S. W. Determination and survey of ochratoxin A in wheat, barley, and coffee-1997. **Journal of AOAC International**, v. 82, p. 85-89, 1999.

TSUBOUCHI, H.; YAMAMOTO, K.; HISADA, K.; SAKABE, Y. A survey of occurrence of mycotoxins and toxigenic fungi in imported green coffee beans. **Proceedings of the Japanese Association of Mycotoxicologists**, v. 19, p. 14-21, 1984.

TSUBOUCHI, H.; TERADA, H.; YAMAMOTO, K.; HISADA, K.; SAKABE, Y. Caffeine degradation and increased ochratoxin A production by toxigenic strains of *Aspergillus ochraceus* isolated from green coffee beans. **Mycopathologia**, v. 90, p. 181-186, 1985.

TSUBOUCHI, H.; YAMAMOTO, K.; HISADA, K.; SAKABE, Y.; UDAGAWA, S. Effect of roasting on ochratoxin A level in green coffee beans inoculated with *Aspergillus ochraceus*. **Mycopathologia**, v. 97, p. 111-115, 1987.

TSUBOUCHI, H.; TERADA, H.; YAMAMOTO, K.; HISADA, H.; SAKABE, Y. Ochratoxin A found in commercial roast coffee. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 36, p. 540-542, 1988.

TURNER, W. B. **Fungal metabolites**. Academic Press, London, U.K. 1978.

TURNER, W. B.; ALDERIDGE, D. C. **Fungal metabolites II**. Academic Press, London, U.K. 1983.

URBANO, G. R.; TANIWAKI, M. H.; LEITAO, M. F.; VICENTINI, M. C. Occurrence of ochratoxin A-producing fungi in raw Brazilian coffee. **Journal of Food Protection**, v. 64, p. 1226-1230, 2001.

VAN DER MERVE, K. J.; STEYN, P. S.; FOURIE, L.; SCOTT, D. B.; THERON, J. J. Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus*. **Nature**, v. 205, p. 1112-1113, 1965.

VARGA, J.; KEVEI, E.; RINYU, E.; TEREN, J.; KOZAKIEWICZ, Z. Ochratoxin production by *Aspergillus* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 4461-4464, 1996.

VARGA, J.; TÓTH, B.; KEVEI, E.; PALÁGYI, A.; KOZAKIEWICZ, Z. Analysis of genetic variability within the genus *Petromyces*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 77, p. 83-89, 2000a.

VARGA, J.; KEVEI, E.; TÓTH, B.; KOZAKIEWICZ, Z.; HOEKSTRA, R. F. Molecular analysis of variability within the toxigenic *Aspergillus ochraceus* species. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 46, p. 593-598, 2000b.

VARGA, J.; TÓTH, B.; RIGÓ, K.; TÉREN, J.; HOEKSTRA, R. F.; KOZAKIEWICZ, Z. Phylogenetic analysis of *Aspergillus* section *Circumdati* based on sequences of the internal

transcribed spacer regions of the 5.8S rRNA gene. **Fungal Genetic and Biology**, v. 30, p. 71-80, 2000c.

VARGAS, E. A.; DOS SANTOS, E. A.; PITTET, A.; CORREA, T. B.; DA ROCHA, A. P.; DIAZ, G. J.; GORNI, R.; KOCH, P.; LOMBAERT, G. A.; MACDONALD, S.; MALLMANN, C. A.; MEIER, P.; NAKAJIMA, M.; NEIL, R. J.; PATEL, S.; PETRACCO, M.; PRADO, G.; SABINO, M.; STEINER, W.; STROKA, J.; TANIWAKI, M. H.; WEE, S. M. Determination of ochratoxin A in green coffee by immunoaffinity column cleanup and liquid chromatography: collaborative study. **Journal of AOAC International**, v. 88, p. 773-779, 2005.

VARGAS, E. A.; WHITAKER, T. B.; DOS SANTOS, E. A.; SLATE, A. B.; LIMA, F. B.; FRANCA, R. C. Design of a sampling plan to detect ochratoxin A in green coffee. **Food Additives and Contaminants**, v. 23, p. 62-72, 2006.

VD STEGEN, G.; JORISSEN, U.; PITTET, A.; SACCON, M.; STEINER, W.; VINCENZI, M.; WINKLER, M.; ZAPP, J.; SCHLATTER, C. Screening of European coffee final products for occurrence of ochratoxin A (OTA). **Food Additives and Contaminants**, v. 14, p. 211-216, 1997.

VEGA, F. E.; POSADA, F.; PETERSON, S. W.; GIANFAGNA, T. J.; CHAVES, F. *Penicillium* species endophytic in coffee plants and ochratoxin A production. **Mycologia**, v. 98, p. 31-42, 2006.

VENTURA, M.; VALLEJOS, C.; ANAYA, I. A.; BROTO-PUIG, F.; AGUT, M.; COMELLAS, L. Analysis of Ochratoxin A in coffee by solid-phase cleanup and narrow-bore liquid chromatography-fluorescence detector-mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 7564-7567, 2003.

VENTURA, M.; ANAYA, I.; BROTO-PUIG, F.; AGUT, M.; COMELLAS, L.; Two-dimensional thin-layer chromatographic method for the analysis of ochratoxin A in green coffee. **Journal of Food Protection**, v. 68, p. 1920-1922, 2005.

VIEIRA, L. G. E.; ANDRADE, A. C.; COLOMBO, C. A.; MORAES, A. H. A.; METHA, A.; OLIVEIRA, A. C.; LABATE, C. A.; MARINO, C. L.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; MONTE, D. C.; GIGLIOTI, E.; KIMURA, E. T.; ROMANO, E.; KURAMAE, E. E.; LEMOS, E. G. M.; ALMEIDA, E. R. P.; JORGE, E. C.; ALBUQUERQUE, E. V. S.; SILVA, F. R.; VINECKY, F.; SAWAZAKI, H. E.; DORRY, H. F. A.; CARRER, H.; ABREUXV, I. N.; BATISTA, J. A. N.; TEIXEIRA, J. B.; KITAJIMA, J. P.; XAVIER, K. G.; LIMA, L. M.; CAMARGO, L. E. A.; PEREIRA, L. F. P.; COUTINHO, L. L.; LEMOS, M. V. F.; ROMANO, M. R.; MACHADO, M. A.; COSTA, M. M. C.; SÁ, M. F. G.; GOLDMAN, M. H. S.; FERRO, M. I. T.; TINOCO, M. L. P.; OLIVEIRA, M. C.; SLUYS, M. A. V.; SHIMIZU, M. M.; MALUF, M. P.; EIRA, M. T. S.; FILHO, O. G.; ARRUDA, P.; MAZZAFERA, P.; MARIANI, P. D. S. C.; OLIVEIRA, R. L. B. C.; HARAKAVA, R.; BALBAO, S. F.; TSAI, S. M.; MAURO, S. M. Z.; SANTOS, S. N.; SIQUEIRA, W. J.; COSTA, G. G. L.; FORMIGHIERI, E. F.; CARAZZOLLE, M. F.; PEREIRA, G. A. G.

Brazilian coffee genome project: an EST-based genomic resource. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 18, p. 95-108, 2006.

VISCONTI, A.; PASCALE, M.; CEWNTONZE, G. Determination of ochratoxin A in wine and beer by immunoaffinity column cleanup and liquid chromatographic analysis with fluorometric detection: collaborative study. **Journal of AOAC International**, v. 8, p. 1818-1827, 2001.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). **Report of the 56th Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives**, Geneva, Switzerland, 2002.

WHYTE, A. C.; GLOER, J. B.; WICKLOW, D. T.; DOWDW, P. F. Sclerotiamide: a new member of the paraherquamide class with potent antiinsectan activity from the sclerotia of *Aspergillus sclerotiorum*. **Journal of Natural Products**, v. 59, p. 1093-1095, 1996.

WICKLOW, D.; DOWD, P. F.; ALFATAFTA, A. A.; GLOER, J. B. Ochratoxin A: an antiinsectan metabolite from the sclerotia of *Aspergillus carbonarius* NRRL 369. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 1100-1103, 1996.

ZIMMERLI, B.; DICK, R. Ochratoxin A in table wine and grape-juice: occurrence and risk assessment. **Food Additives and Contaminants**, v. 13, p. 655-688, 1996.

5. ARTIGO CIENTÍFICO PROPOSTO PARA O PERIÓDICO “International Journal of Food Microbiology”.

Detection and quantification of *Aspergillus westerdijkiae* in coffee beans based on selective amplification of β -tubulin gene by using real-time PCR

Luis Gustavo Morello ^a, Daniele Sartori ^a, André Luiz de Oliveira Martinez ^a, Maria Lúcia Carneiro Vieira ^b, Marta Hiromi Taniwaki ^c, Maria Helena Pelegrinelli Fungaro ^{a*}

^a Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, P.O. Box 6001, Londrina, Brazil, Zip Code 86051-990.

^b Departamento de Genética, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, P.O. Box 83, Piracicaba, Brazil, Zip Code 13400-970.

^c Instituto de Tecnologia de Alimentos, P.O. Box 139, Campinas, Brazil, Zip Code 13070-178.

*Corresponding author. Fax: 55-43-3371-5728

E-mail address: fungaro@uel.br (M.H.P. Fungaro)

Abstract

Aspergillus westerdijkiae is a new species of fungus that was recently dismembered from *Aspergillus ochraceus* taxon. Most isolates of *A. westerdijkiae* are able to produce large amounts of a mycotoxin called ochratoxin A (OA). OA has been found in food and beverages, such as coffee. *A. westerdijkiae* is very similar to *A. ochraceus*, and several isolates previously identified as *A. ochraceus* are now identified as *A. westerdijkiae*. By using sequences of the β -tubulin genes, we analyzed several isolates from Brazilian coffee bean samples, previously identified as *A. ochraceus*, to compare with those of *A. westerdijkiae*. In fact, most (84%) were identified as *A. westerdijkiae*. Since this species consistently produces large amounts of OA, we developed a specific primer-pair for detecting and quantifying it in coffee beans by using real-time PCR. The primers Bt2Aw-F 5'TGATACCTTGGCGCTTGTGACG and Bt2Aw-R 5'CGGAAGCCTAAAAAATGAAGAG provided an amplicon of 347 bp in all *A. westerdijkiae* isolates, and no cross-reaction was observed using DNA from *A. ochraceus*. The sensitivity of real-time PCR was more than 100 times higher than the cfu technique.

Keywords: ochratoxin A; *Aspergillus ochraceus*; *Aspergillus westerdijkiae*; real-time PCR

1. Introduction

Ochratoxin A is a toxic secondary metabolite naturally produced by some *Aspergillus* and *Penicillium* species. There is sufficient experimental evidence in animals demonstrating the toxicity and carcinogenicity of ochratoxin A (IARC, 1993). The toxin as well as ochratoxin-producing fungi were reported to occur in some food and commodities, such as coffee (Levi et al., 1974; Studer-Rohr et al., 1995; Bucheli et al., 1998; Joosten et al., 2001; Taniwaki et al., 2003). Coffee is extensively consumed in the world, and Brazil is the major producer of coffee beans in the world. According to the literature, this beverage contributes significantly to the total daily ingestion of this toxin (Petzinger and Weidenback, 2002).

Aspergillus ochraceus, *A. carbonarius* and *A. niger* were reported as the main fungal species with the potential for infecting coffee beans and producing OA in Brazilian coffee beans (Taniwaki et al., 2003; Magnani et al., 2005). Analyses on the genetic relationships among *A. ochraceus* isolates, collected from Brazilian coffee bean samples showed that they were resolved into two distinct groups, A and B. The majority of the isolates were included in group B, but only four formed group A (Fungaro et al., 2004). This study also showed that the level of intraspecific nucleotide variation in ITS regions (ITS1-5.8S-ITS2) was higher than that observed for several other *Aspergillus* species. Afterwards, based on molecular and morphological data, Frisvad et al. (2004) proposed *Aspergillus westerdijkiae* as a new species, which was dismembered from *Aspergillus ochraceus* taxon. *A. westerdijkiae* is similar to *A. ochraceus*, and several isolates previously identified as *A. ochraceus*, including the original OA-producing isolate (NRRL 3174) are now identified as *A. westerdijkiae*.

The use of DNA markers for rapid detection of OA-producing species in coffee beans has been useful to replace conventional methods, which require fungal cultivation. Based on molecular data, specific primers for PCR-based detection of *A. carbonarius* (Fungaro et al., 2004; Schmidt et al., 2004), *A. niger* (Sartori et al., 2006) and *A. ochraceus* (Schmidt et al., 2003; Patiño et al., 2005) were published. Because *A. ochraceus* and *A. westerdijkiae* were only recently dismembered into two species, the primer-pairs designed until now are not specific neither to *A. ochraceus* nor to *A. westerdijkiae*, i.e. they recognize both species.

More recently, real-time PCR technologies make possible a precise quantification of target fungal DNA in host tissues, thus opening new avenues for food safety. Unlike classical PCR, real-time PCR is more sensitive and does not require gel electrophoresis. This attribute of real-time PCR significantly reduces time and manual labor, making it appropriate for large-scale analyses. By using real-time PCR, Schmidt and colleagues published an interesting paper showing the correlation between the ochratoxin A content in coffee bean samples and *A. ochraceus* DNA quantity (Schmidt et al., 2004).

In this study, we exploited the nucleotide sequence variability in a region of the β -tubulin gene from several isolates obtained from Brazilian coffee bean samples, previously identified as *A. ochraceus*, to compare with those of *A. westerdijkiae*. Because most isolates were actually recognized as *A. westerdijkiae*, a specific method for detecting and quantifying this species in coffee beans by using real-time PCR is presented in the current study.

2. Materials and methods

2.1. Strains

A total of 15 fungal isolates collected from Brazilian coffee bean samples from different States (São Paulo, Minas Gerais and Paraná) were used to design a species-specific primer-pair to amplify a region of the β -tubulin gene from *A. westerdijkiae*. Eleven *A. westerdijkiae* isolates were used to assess the inclusiveness, and four *A. ochraceus* were used to assess the exclusiveness. For optimizing real-time PCR assays, we utilized the isolate ITAL 142. The origin and ability to produce OA of each strain is shown in Table 1.

2.2. DNA extraction from pure culture

The isolates were grown in Pontecorvo's liquid medium for 40 h at 28 °C with continuous shaking (150 rpm). (Pontecorvo et al., 1953). Total nucleic acid was extracted as described by Azevedo et al. (2000). Briefly, mycelium recovered from the culture fluid by filtration was pulverized to a fine powder under liquid nitrogen in a mortar. Ca. 400 mg of the ground mycelium was suspended in 800 μ L of lysis buffer (200 mM Tris-HCl; 250 mM NaCl; 25 mM EDTA; 1% wv^{-1} SDS) and maintained at 65°C for 20 min. The DNA was purified in phenol: chloroform (25:24) and chloroform: isoamyl alcohol (24:1), precipitated in a 3M NaCl solution in the presence of 98% ethanol, then washed with 70% ethanol, and resuspended in ultrapure water.

2.3. DNA amplification and sequencing

Primers used to amplify a region of the β -tubulin gene (*Btub*) were Bt2a and Bt2b, which were obtained from Glass and Donaldson (1995). The 50 μ L PCR reaction mixture contained 20 ng of genomic DNA, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 2.0 mM MgCl₂, 0.2 mM of dNTP, 0.4 μ M of each primer and 2.0 U of Taq DNA polymerase (Invitrogen). The mixture was subjected to the following amplification program: initial denaturation at 94 °C for 5 min, followed by 35 cycles of denaturation (94 °C, 1 min), primer annealing (64 °C, 30 s) and elongation (72 °C, 1 min), and a final elongation for 5 min at 72 °C. DNA fragments were purified with the CONCERT™ Rapid PCR Purification System (GIBCOBRL, UK). PCR-products were directly sequenced, and sequences of double strands were determined using Bt2a and Bt2b as primers. The sequencing reaction was performed by using DYEnamic™ ET dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Inc.) on MegaBACE 1000 (Amersham Biosciences).

2.4. Development of specific primers

Sequences obtained from the *Aspergillus ochraceus* and *A. westerdijkiae* *Btub* gene were compared and aligned using BLAST tools (Astchul et al., 1990) and BioEdit software (Hall, 1999), respectively. A species-specific primer-pair (Bt2Aw-F and Bt2Aw-R) to amplify target DNA from *Aspergillus westerdijkiae* was designed. The specificity of this

primer-pair was assessed using all fungi isolates listed in Table 1. PCR protocol reaction were carried out as described before, except that the annealing temperature was 62 °C.

2.5. Fungal inoculation in coffee beans and DNA extraction

Filter paper disks (Whatman No. 1) were placed on Petri dishes and sterilized green coffee beans were placed onto the disk surfaces. Coffee beans were inoculated with conidia suspension (10^6 conidia) in sterile tween 80 solution (0.1%) and incubated for 8 days at 28 °C. One milliliter of sterile distilled water was added per day to maintain the moisture of the system. At 48 h intervals, coffee bean samples were collected, their surfaces disinfected by immersion in a 0.4% NaOCl solution for 2 min under vortexing, and extensively washed with sterile distilled water. Inoculations were performed with 4 biological replicates. Two of them were used for colony-forming unit (cfu counting) determination. The other two were used for DNA extraction according to Sartori et al. (2006). The resulting pellet was resuspended in 100 µL of TE buffer (Tris-HCl 10 mM / EDTA 1 mM), and DNA quality was determined spectrophotometrically (Sambrook et al., 1989) prior to use.

2.6. Determination of cfu

Fungal concentrations in coffee beans were determined at each 48 h interval by plate count technique. After the washing step, coffee beans were crudely ground using a hammer, macerated with a mortar and pestle, and finally resuspended in a sterile 0.85% NaCl solution (1.0 mL). Appropriate dilutions were plated in complete solid medium

(Pontecorvo et al., 1953). Plates were incubated at 28 °C for 4 days prior to cfu counting. All samples were analyzed in duplicate.

2.7. Real-time PCR

Quantitative real-time PCR was carried out in a PTC-200 DNA Engine Cycler with a Chromo4 fluorescence detector system (MJ Research). The 50 µL reaction was performed by using the Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR Supermix-UDG (Invitrogen Life Technologies), Bt2Aw-F (0.4 µM) and Bt2Aw-R (0.4 µM) primers, and 2.0 µL of DNA. The mixture was subjected to the following amplification program: 2 min at 50 °C; 5 min at 95 °C; 45 cycles at 95 °C for 30 s, 62 °C for 30 s and 72 °C for 30 s. All reactions were performed in duplicate. Quantification of the unknown samples was carried out by interpolating the samples cycle threshold (*C_t*) in a standard curve.

2.8. Standard curve

To construct the standard curve we first amplified and purified a fragment of the *Btub* gene (600 bp), by using Bt2a and Bt2b primers (Glass and Donaldson, 1995). After purification, the amount of PCR product was determined in a fluorometer (DyNa Quant 200; Pharmacia, Uppsala, Sweden). DNA amounts were converted in gene copy number by using the formula mentioned below. The formula proposed in the present paper converts double strand DNA (dsDNA) amount in gene copy number by the relation between the dsDNA concentration and respective DNA size, multiplied by a factor originated from the

dsDNA molecular mass (approximately 300 g/mol for the single nucleotide incorporated into dsDNA) and the Avogadro constant.

$$\text{Cn (copy number/}\mu\text{L)} = \frac{\text{Fragment concentration (}\mu\text{g/}\mu\text{L)} \times 1.004 \times 10^{15}}{\text{Fragment size (bp)}}$$

The quantified amplicon was 10-fold serially diluted (10^9 to 10^1 copy number) and then used as template DNA in a real-time reaction using Bt2Aw-F and Bt2Aw-R as primers. The standard curve showing the correlation between the logarithmic of the target DNA copy number and the number of cycles necessary to elevate signals above the crossing line threshold (C_t) was constructed.

*2.9. Quantification of *A. westerdijkiae* in coffee bean samples*

After inoculation of coffee bean samples and their incubation for up to 192 h, DNA extractions were performed every 48 h and used as a template to quantify the *A. westerdijkiae* genome copy number. For this, 2.0 μL of each extract diluted 100-fold were added to the reaction mixture (as above described) to record the C_t value. All reactions were performed in two technical replicates. The specificity was persistently checked through melting curve analysis.

2.10. The sensitivity of the real time PCR method

To determine the detection limit of the real-time system here described, total DNA from coffee beans inoculated with *A. westerdijkiae* (incubated for 48 h) were serially

diluted by a factor of 10 (10^{-1} to 10^{-9}). From all these diluted extracts, 1.0 μL was added to 24 μL of the reaction mix as described.

3. Results and discussion

By using β -tubulin sequences, we analyzed several isolates obtained from Brazilian coffee bean samples, previously identified as *A. ochraceus*, to compare with those of *A. westerdijkiae*. In fact, most isolates (84%) were recognized as *A. westerdijkiae*. Approximately 71% of these isolates were found to be capable of producing OA in culture. Thus, we do believe that *A. westerdijkiae* is the main causal agent of OA in Brazilian coffee beans.

From *A. westerdijkiae* and *A. ochraceus*, the Bt2 primer-pair amplified a fragment of 600 bp that spanned three introns (3 to 5). The alignment of 531 nucleotide positions from *A. westerdijkiae* strains with those from *A. ochraceus* revealed 39 species-specific single nucleotide polymorphisms, most of them (97.4%) in intronic regions (Fig. 1). Eleven nucleotide substitutions and one heptanucleotide-insertions/deletions were found in intron 3 (107 bp). Intron 4 (103 bp) was found to have 6 substitutions, one pentanucleotide-insertions/deletions and one dinucleotide-insertions/deletions. Seven substitutions were found in intron 5 (87 bp). This level of variation is high enough to accept the subdivision of *Aspergillus ochraceus* taxon proposed by Frisvad et al. (2004). Several β -tubulin and ITS1-5.8S-ITS2 sequences deposited on NCBI, as from *A. ochraceus*, are actually from *A. westerdijkiae* and the new denomination should be adopted to avoid confusion. DNA sequences of the ITS1-5.8S-ITS2 region from 21 Brazilian isolates (Fungaro et al., 2004) deposited on NCBI previously as *A. ochraceus* (accession numbers are AY609223, AY609224 , AY609221, AY609202, AY609219, AY609203, AY609209, AY609200, AY609212, AY609208, AY609216, AY609214, AY609218, AY609211, AY609215,

AY609213, AY609217, AY609207, AY609222, AY609220, AY609210), are now denoted as *A. westerdijkiae*.

The genetic variation found between the β -tubulin gene sequences obtained from *A. ochraceus* and *A. westerdijkiae* allowed us to design a primer-pair specific to *A. westerdijkiae*. These primers (Bt2Aw-F 5'TGATACCTTGGCGCTTGTGACG and Bt2Aw-R 5'CGGAAGCCTAAAAAATGAAGAG) produced a 347 bp-amplicon from all *A. westerdijkiae* isolates tested and no PCR product from *A. ochraceus* isolates (Fig. 2). The specificity of the primers was also evaluated based on an accurate analysis of the sequences deposited at NCBI. No complete similarity were found between Bt2Aw primer-pair and reported β -tubulin sequences from other species. This accurate analysis was necessary because several β -tubulin sequences deposited on NCBI as from *A. ochraceus* are actually from *A. westerdijkiae*.

Until now, those sequences have not been revised. It is important to note that some authors have already reported primers to detect *Aspergillus ochraceus* (Schmidt et al., 2003 and Patiño et al., 2005), but none of them were specific for *A. ochraceus* or *A. westerdijkiae*. They were able to amplify both species, *A. ochraceus* and *A. westerdijkiae*.

The Bt2Aw primers were successfully applied for detecting an amplicon of 347 bp when using DNA from coffee beans inoculated with *A. westerdijkiae*. The specificity of this primer-pair to amplify *A. westerdijkiae* motivated us to use it for quantifying *A. westerdijkiae* in coffee bean samples.

After inoculation of coffee bean samples and incubation, DNA extraction and cfu-assay were performed at 48 h intervals. As shown in Fig. 3, after 2 days of incubation it was possible to detect an increase in the cfu value, which reached a maximum after 4 days

and stayed invariable until the end of the examination period (8 days). A similar result was reported by Mayer et al. (2003), when following the growth kinetics of *Aspergillus flavus* in wheat.

Samples of DNA extracted every 48 h were used to quantify the copy number of the *A. westerdijkiae* haploid genome by real-time PCR. Because the β -tubulin is a single-copy gene, the linear correlation between the logarithmic concentration of target DNA and the number of cycles necessary to elevate signals above the crossing line threshold (C_t) was used to estimate the number of haploid genomes of the DNA samples by interpolating their C_t on the standard curve (Fig. 4). We detected no real-time PCR signal just after inoculation, but after 48 h the maximum of gene copies was already reached. Correspondence between copy number of haploid genomes and cfu was observed ($r=0.859$). However, except the time zero, the estimative of genome copy numbers was higher than cfu numbers (Fig. 3). This has been reported before for filamentous fungi. By using real-time PCR, Mayer et al. (2003) found that the copy number of the *nor-1* gene, which is involved in the aflatoxin biosynthetic pathway, was generally higher than the *Aspergillus flavus* cfu data recovered from maize, pepper and paprika samples. The authors stated that this is related to the nature of the filamentous fungus development. Mycelial fragments give rise to only one colony, even if they consist of many cells; in addition, mycelial cells are multinucleated.

The sensitivity of the PCR method to foodborne microorganism detection is crucial. Unfortunately, there is no standard for reporting sensitivity. Some authors refer to sensitivity as the minimum of picograms of DNA that can be detected (Bluhm et al., 2002; Schmidt et al., 2004; Patiño et al., 2005); others refer to it as the minimum percentage of

infected grains in a sample (Schmidt et al., 2004), and more recently the number of haploid genomes has also been used (Mule et al., 2006). To eliminate confusion and uncertainties regarding sensitivity, a single method for sensitivity calculation should be adopted. In our point of view, the number of haploid genomes per gram of a certain sample is the most convenient manner to indicate the PCR sensitivity. By using serial dilutions (10^{-1} to 10^{-9}) of DNA extracted from infected coffee beans after 48 h of incubation, we detected a positive signal up to 10^{-5} dilution, which means less than 10 and more than one single copy number of *A. westerdijkiae* haploid genome (data not showed). This value also means less than 10 haploid genomes per 0.1 gram of coffee beans. Real-time PCR sensitivity level was more than 100 times higher than the cfu technique.

The method developed in the present study has the potential to be quickly adapted for further quantification of *A. westerdijkiae* in other foods and commodities where this species is able to produce ochratoxin A.

Acknowledgements

This investigation was supported by the Brazilian Institutions CNPq, FINEP and Fundação Araucária. L.G.M. received a Master of Science scholarship from CAPES.

References

Astchul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215, 403-410.

Azevedo, A.C.S., Furlaneto, M.C., Souza-Gomes, D.R., Fungaro, M.H.P., 2000. Molecular characterization of *Paecilomyces fumoroseus* (*Deuteromycotina Hyphomycetes*) isolates. *Scientia Agrícola* 57, 729-732.

Bluhm, B.H., Flaherty, J.E., Cousin, M.A., Woloshuk, C.P., 2002. Multiplex polymerase chain reaction assay for the differential detection of trichothecene and fumonisin-producing species of *Fusarium* in cornmeal. *Journal of Food Protection* 65, 1955-1961.

Buchelli, P., Meyer, I., Pittet, A., Vuataz, G., Viani, R., 1998. Industrial storage of green robusta coffee under tropical conditions and its impact on raw material quality and ochratoxin A content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46, 4507-4511

Frisvad, C.J., Frank, J.M., Houbraken, J.A.M.P., Kuijpers, A.F.A., Samson, R.A., 2004. New ochratoxin A producing species of *Aspergillus* section *Circumdati*. *Studies in Mycology* 50, 23-43.

Fungaro, M.H.P., Magnani, M., Vilas-Boas, L.A., Vissotto, P.C., Furlaneto, M.C., Vieira, M.L.C., Taniwaki, M.H., 2004. Genetic relationships among Brazilian strains of

Aspergillus ochraceus based on RAPD and ITS sequences. Canadian Journal of Microbiology 50, 985-988.

Glass, N.L., Donaldson, G.C., 1995. Development of primers sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. Applied and Environmental Microbiology 61, 1323-1330.

Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series 41, 95-98.

IARC (International Agency for Research on Cancer). 1993. Ochratoxin A. *In* IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 56. Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. pp. 489-521.

Joosten, H.M.L.J., Goetz, J., Pittet, A., Schellenberg, M., Bucheli, P., 2001. Production of ochratoxin A by *Aspergillus carbonarius* on coffee cherries. International Journal of Food Microbiology 65, 39-44.

Levi, C.P., Trenk, H.L., Mohr, H.K., 1974. Study of the occurrence of ochratoxin A in green coffee beans. Journal - Association of Official Analytical Chemists 57, 866-870.

Magnani, M., Fernandes, T., Prete, C.E.C., Homechim, M., Ono, E.Y.S., Vilas-Boas, L.A., Sartori, D., Furlaneto, M.C., Fungaro, M.H.P., 2005. Molecular identification of *Aspergillus* ssp. isolated from coffee beans. *Scientia Agricola* 62, 45-49.

Mayer, Z., Bagnara, A., Färber, P., Geisen, R., 2003. Quantification of the copy number of *nor-1*, a gene of aflatoxin biosynthetic pathway by real-time PCR, and its correlation to the cfu of *Aspergillus flavus* in foods. *International Journal of Food Microbiology* 82, 143-151.

Mulè, G., Susca, A., Logrieco, A., Stea, G., Visconti, A., 2006. Development of a quantitative real-time PCR assay for the detection of *Aspergillus carbonarius* in grapes. *International Journal of Food Microbiology* 111, 28-34.

Patiño, B., González-Salgado, A., González-Jaén, M.T., Vázquez, C., 2005. PCR detection assays for the ochratoxin-producing *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus ochraceus* species. *International Journal of Food Microbiology* 104, 207-214.

Petzinger, E., Weidenbach, A., 2002. Mycotoxins in the food chain: the role of ochratoxins. *Livestock Production Science* 76, 245-250.

Pontecorvo, G., Roper, J.A., Hemmons, L.M., MacDonald, K.D., Bufton, A.W.J., 1953. The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Advances in Genetics* 5, 142-148.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.

Sartori, D., Furlaneto, M.C., Martins, M.K., Paula, M.R.F., Pizzirani-Kleiner, A., Taniwaki, M.H., Fungaro, M.H.P., 2006. PCR method for the detection of potencial ochratoxin-producing *Aspergillus* species in coffee beans. *Research in Microbiology* 157, 350-354.

Schmidt, H., Ehrmann, M., Vogel, R.F., Taniwaki, M.H., Niessen, L., 2003. Molecular typing of *Aspergillus ochraceus* and construction of species specific SCAR-primers based on AFLP. *Systematic and Applied Microbiology* 26, 138-146.

Schmidt, H., Bannier, M., Vogel, R.F., Niessen, L., 2004. Detection and quantification of *Aspergillus ochraceus* in green coffee by PCR. *Letters in Applied Microbiology* 38, 464-469.

Studer-Rohr, I., Dietrich, D.R., Schlatter, J., Schlatter, C., 1995. The occurrence of ochratoxin A in coffee. *Food and chemical toxicology* 33, 341-355.

Taniwaki, M.H., Pitt, J.I., Teixeira, A.A., Iamanaka, B.T., 2003. The source of ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to processing methods. *International Journal of Food Microbiology* 82, 173-179.

Table 1. Fungal isolates collected from Brazilian coffee beans used in the present study

Species	Isolates	State of Brazil	Maturation stage or processing	OA	ITS-5,8-ITS2 sequences Genbank Accession No.	β -tubulin sequences Genbank Accession No.
<i>A. westerdijkiae</i>	UEL 21	PR	Drying yard	+	AY609217	EF150879
<i>A. westerdijkiae</i>	UEL 65	PR	Drying yard	+	AY609208	
<i>A. westerdijkiae</i>	UEL 91	PR	Barn	+	AY609218	
<i>A. westerdijkiae</i>	UEL 101	PR	Drying yard	+	AY609210	EF150880
<i>A. westerdijkiae</i>	ITAL 128	MG	Coffee raising	-	AY609219	
<i>A. westerdijkiae</i>	UEL 141	PR	Drying yard	+	AY609214	
<i>A. westerdijkiae</i>	ITAL 142	MG	Overripe from soil	+	AY609220	
<i>A. westerdijkiae</i>	UEL 151	PR	Overripe from tree	+	AY609215	
<i>A. westerdijkiae</i>	ITAL 163	SP	Barn	-	AY609222	
<i>A. westerdijkiae</i>	ITAL 234	SP	Barn	-	AY609224	EF150881
<i>A. westerdijkiae</i>	ITAL 249	SP	Coffee raising	+	AY609200	
<i>A. ochraceus</i>	UEL 12	PR	Barn	+	AY609204	
<i>A. ochraceus</i>	UEL 14A	PR	Barn	+	AY609205	EF150877
<i>A. ochraceus</i>	UEL 14B	PR	Barn	+	AY609206	EF150878
<i>A. ochraceus</i>	ITAL 259	SP	Barn	-	AY609201	EF150881

(+) OA producer, (-) OA non-producer

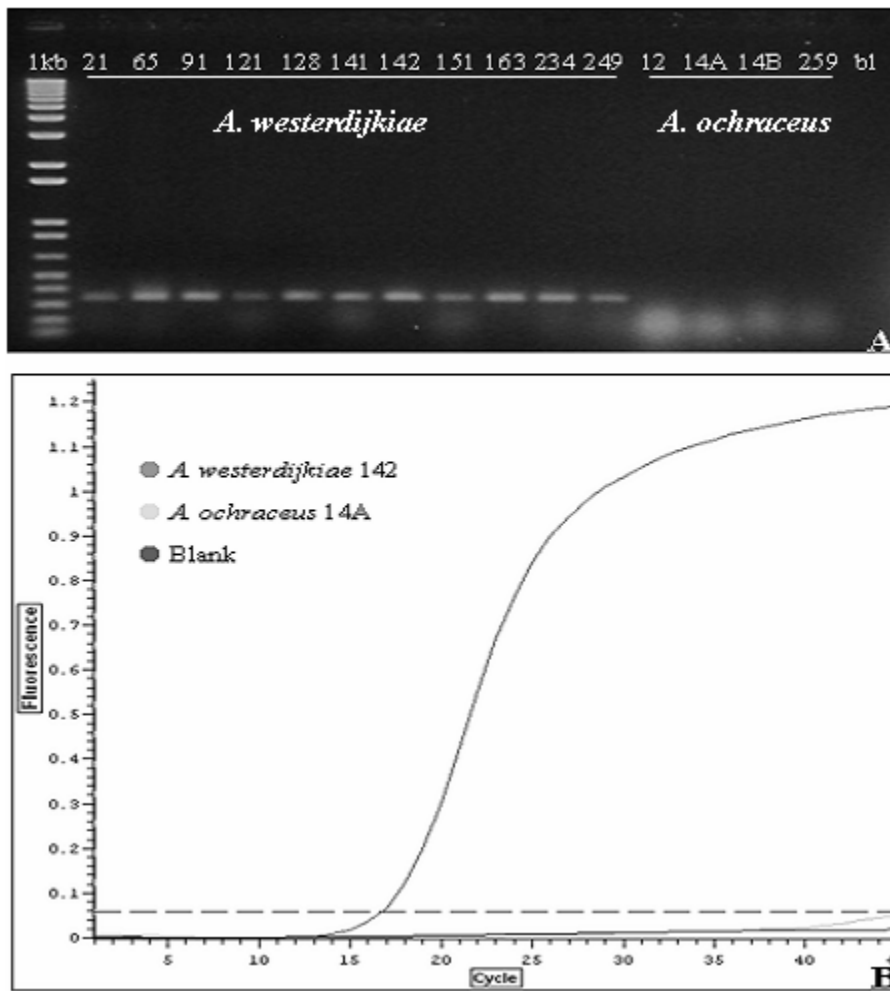


Fig. 2. Discrimination between *A. westerdijkiae* and *A. ochraceus* by (a) conventional PCR and (b) real-time PCR.

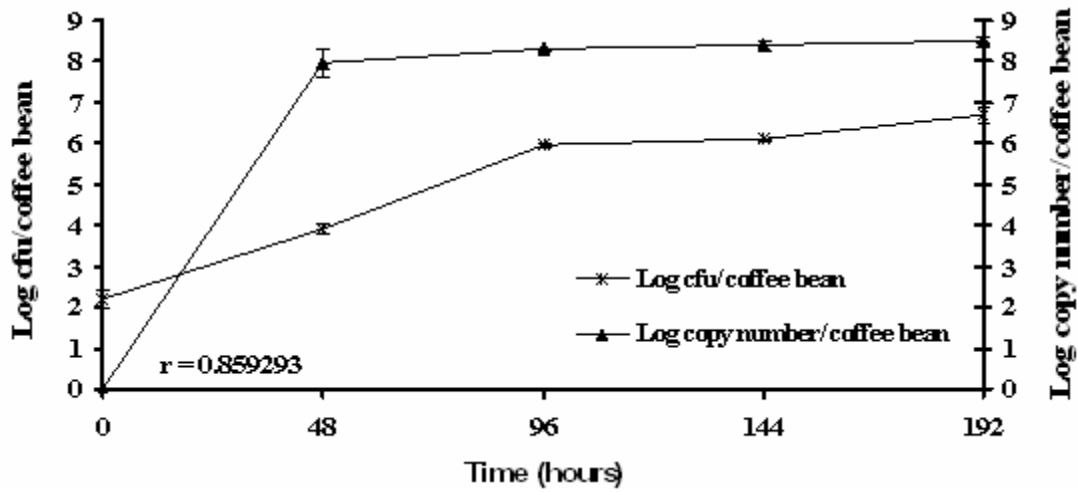


Fig. 3. Comparison between the cfu data and the copy number of haploid genome of the *A. westerdijkiae* in inoculated coffee beans.

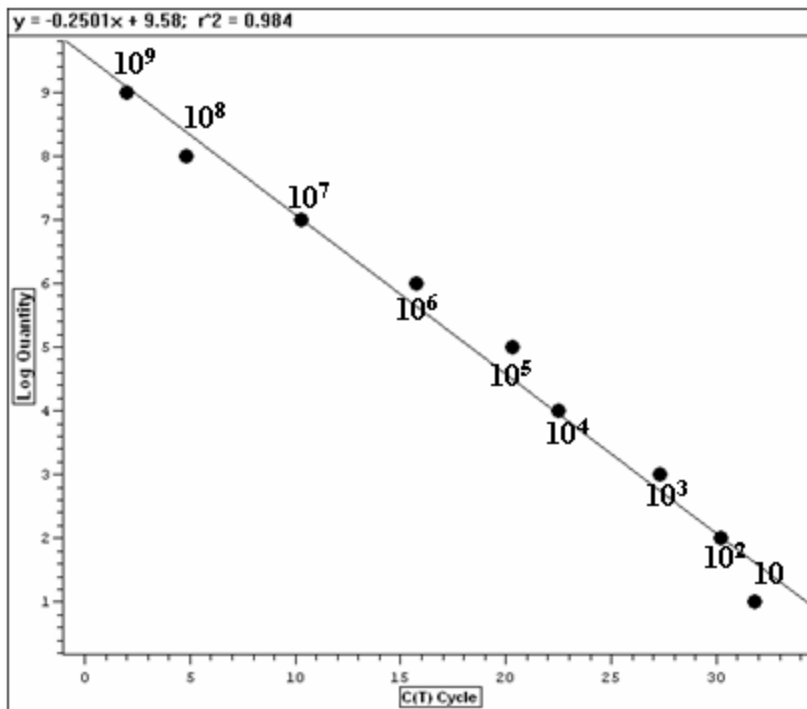


Fig. 4. The standard curve showing the correlation between the logarithmic of the target DNA copy number and the threshold cycle (C_t).