

ROSALYNE MARCELE LANG

**Ocorrência de fungos toxigênicos e micotoxinas em
erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil. var. *paraguariensis*)
comercializada em Santa Catarina**

FLORINÓPOLIS

2005

ROSALYNE MARCELE LANG

**Ocorrência de fungos toxigênicos e micotoxinas em
erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil. var. *paraguariensis*)
comercializada em Santa Catarina**

Dissertação apresentada para a obtenção do título de Mestre em Ciência dos Alimentos, junto à Universidade Federal de Santa Catarina

Departamento:

Ciência e Tecnologia de Alimentos

Área de Concentração:

Avaliação e Controle de Qualidade

Orientadora:

Prof.^a Vildes M. Scussel, PhD

FLORIANÓPOLIS

2005

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do autor: Lang, Rosalyne Marcele.

Título: Ocorrência de fungos toxigênicos e micotoxinas em erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil. var. *paraguariensis*) comercializada em Santa Catarina.

Dissertação apresentada para a obtenção do título de Mestre em Ciência dos Alimentos, junto à Universidade Federal de Santa Catarina

Aprovado em: 31 de janeiro de 2005

Banca Examinadora

Presidente: _____
Prof^a. Dr.^a Vildes Maria Scussel

Membro: _____
Prof^a. Dr.^a Elisa Yoko Hirooka

Membro: _____
Prof^a. Dr.^a Edna Regina Amante

Membro: _____
Prof. Dr. Honório Domingos Benedet

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de pós-graduação em Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina - PGCAL, por ter proporcionado a realização deste mestrado.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa de estudos que possibilitou a realização deste trabalho.

A minha família, pelo incentivo, amor e dedicação. Muito obrigada por tudo o que fizeram para que eu chegasse até aqui. Amo muito vocês.

Ao meus amigos de todas as horas, Adriano Wagner Franzoni e Rejane Cirra Scaff.

À professora Dr. Edna Regina Amante pelo incentivo nos momentos difíceis.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

LANG, R. M. Ocorrência de fungos toxigênicos e micotoxinas em erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil. var. *paraguariensis*) comercializada em Santa Catarina.

Foram coletadas 42 amostras de erva-mate adquiridas em estabelecimentos comerciais no período de novembro/2003 a janeiro/2004 nas regiões Oeste, Serrana, Norte e Sul de Santa Catarina nas quais foi analisada a microbiota fúngica, a presença de espécies produtoras de micotoxinas e a presença de aflatoxinas, ocratoxinas e fumonisinas. Quanto à contagem total de fungos e leveduras 28,57 % das marcas de erva-mate analisadas apresentaram valores superiores a 10^3 UFC/g, acima do limite estabelecido pela legislação brasileira. Os seguintes gêneros fúngicos foram isolados em ágar extrato de malte, em ordem decrescente de frequência *Aspergillus* spp., *Mucor* spp., *Rhizopus* spp., *Penicillium* spp., *Paecilomyces* spp., *Helminthosporium* spp., *Botrytis* spp., *Fusarium* spp. e fungos não-esporulados. Das cepas de *Aspergillus* spp. 1,28 % foram produtoras de aflatoxinas do grupo B e 0,11 % de ocratoxina A. A produção de ocratoxina A foi verificada em 50 % das cepas de *Penicillium* spp. isoladas. A cepa de *Fusarium* não apresentou potencial toxigênico para a produção de fumonisinas. Nenhuma das micotoxinas analisadas foi detectada nas amostras de erva-mate.

ABSTRACT

LANG, R. M. The Occurrence of Toxigenic Fungi and Mycotoxins in Yerba-Mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil. var. *Paraguariensis*) sold in Santa Catarina: it was collected 42 samples of yerba-mate acquired in commercial establishments during the period of November 2003 until January 2004 covering the West, Serrana, North and South regions of Santa Catarina State in which a fungi microbiota and the presence of aflatoxins, ocratoxins and fumonisins. It was demonstrated that four of fourteen analyzed samples presented values above the reference limit of 10^3 CFU/g permitted by Brazilian legislation concerning the total fungi count. The following sorts of fungi were isolated in malt extract agar in the decreasing order of frequency, *Aspergillus* spp., *Mucor* spp., *Rhizopus* spp., *Penicillium* spp., *Paecilomyces* spp., non-sporulating fungi, *Helminthosporium* spp., *Botrytis* spp. and *Fusarium* spp.. Concerning the capability of synthesizing aflatoxins and ocratoxins by *Aspergillus* spp. strains, 1,28% synthesized one or more aflatoxins and 0,11% synthesized ocratoxins; 50% of *Penicillium* spp. strains produced ocratoxins A. The *Fusarium* strain did not displayed toxigenic potential concerning fumonisins production. None of the analyzed mycotoxins was detected in the collected and studied yerba-mate samples.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Área de ocorrência natural de erva-mate no continente Sul Americano	11
FIGURA 2 – Estruturas químicas das aflatoxinas	23
FIGURA 3 – Estrutura química da ocratoxina A	25
FIGURA 4 – Estrutura química das fumonisinas B ₁ e B ₂ , esfingosina e esfinganina	27

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Produção de erva-mate cancheada na região Sul do Brasil em 2001	12
TABELA 2 – Composição química da erva-mate	13

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
2.1	Erva mate	10
2.1.1	Produção da erva-mate no Brasil	11
2.1.2	Composição química	13
2.1.3	Beneficiamento e industrialização	16
2.2	Fungos toxigênicos	18
2.3	Micotoxinas	20
2.3.1	Aflatoxinas	22
2.3.2	Ocratoxina A	24
2.3.3	Fumonisinias	26
2.4	Câncer de esôfago	29
2.5	A relação do chimarrão com o câncer de esôfago	30
2.6	Bibliografia	32
3	ARTIGO	
	Ocorrência de fungos toxigênicos e micotoxinas em erva mate (<i>Ilex paraguariensis</i> St. Hil. var <i>paraguariensis</i>) comercializada em Santa Catarina	39
3.1	Resumo	39
3.2	Introdução	40
3.3	Material e métodos	41

3.4	Resultado e Discussão	46
3.5	Conclusões	52
3.6	Bibliografia	53

1 INTRODUÇÃO

Tendo sua origem na América do Sul, a erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil. var. *paraguariensis*) ocorre naturalmente na Argentina, Brasil e Paraguai. Entretanto, cerca de 80 % da área de ocorrência pertence ao Brasil (OLIVEIRA e ROTTA, 1985). A Região Sul do Brasil é a maior produtora e consumidora de erva-mate (na forma de chimarrão), sendo o Estado do Paraná o maior produtor, seguido por Santa Catarina (IBGE, 2001). Possui grande importância econômica para estes estados, tendo em vista sua utilização no preparo do chimarrão, uma bebida estimulante, preparada através da infusão à quente de suas folhas e talos moídos.

A contaminação da erva-mate, ocorre através do contato com os esporos dos fungos, presentes no ambiente, sobretudo no solo, em diferentes fases do processamento, principalmente na colheita e secagem. A utilização de práticas agrícolas incorretas que prolongam o contato dos produtos com o solo, as lesões na superfície das folhas, provocadas por insetos, o armazenamento inadequado, em locais úmidos e sem ventilação, são apontados como as principais causas que favorecem a contaminação e o desenvolvimento de fungos toxigênicos (CHU, 1991). Fatores como conteúdo de umidade, atividade de água, temperatura, período de armazenamento, níveis iniciais de contaminação, potencial toxigênico das cepas toxigênicas e substrato influenciam na produção de micotoxinas. Muitas micotoxinas também têm alta estabilidade química que as habilita a permanecer nos alimentos mesmo após a remoção dos fungos pelos processos de industrialização (BITTENCOURT et al., 2003).

As micotoxinas são um grupo amplo de metabólitos secundários de origem fúngica caracterizadas por apresentar uma elevada toxicidade tanto para seres humanos quanto para animais. A exposição humana pelo consumo de alimentos contaminados é questão de saúde pública no mundo todo. A presença em alimentos tem sido correlacionada a várias patologias compreendendo também o desenvolvimento de atividades carcinogênicas, teratogênicas, mutagênicas e produção de desordens de caráter hormonal e imunossupressor (MOSS, 1991; PITT, 2000; TANIWAKI e SILVA, 2001).

O processo de secagem da erva-mate é o mais crítico para o contaminação, se mal conduzido pode ocasionar pontos de reabsorção de umidade durante o período de armazenamento, o que favorece o desenvolvimento fúngico e leva a problemas de conservação do produto e a possível ocorrência de micotoxinas. A elevada temperatura de consumo do chimarrão pode favorecer a extração de micotoxinas, caso estejam presentes, transferindo-as para a infusão, podendo assim ser ingeridas.

Trabalhos relacionados à erva-mate, sobretudo em microbiologia, ainda permanecem escassos e a abordagem ao estudo de fungos toxigênicos, assim como ao de micotoxinas são ainda mais raros. O presente trabalho teve como objetivos avaliar a ocorrência de fungos toxigênicos e micotoxinas (aflatoxinas, ocratoxinas A e fumonisinas) em erva-mate comercializada em Santa Catarina, considerando entre outros aspectos que a região Sul do Brasil apresenta a maior incidência de câncer de esôfago do País (INCA, 1999), e as fumonisinas podem ser um dos fatores correlacionados, uma vez que o consumo de chimarrão é alto nesta população.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Erva-mate

A origem do uso da erva-mate teve início com os Quichuás, índios que habitavam o Peru, civilização presidida pelos Incas, encontrados pelos Espanhóis na América. A comprovação do uso do mate por estes povos foi constatada quando nos túmulos pré-colombianos foram encontrados, ao lado de objetos de uso, a erva-mate. O mate entre os povos indígenas Quichuás, era denominado "Mati", significando cabeça ou cuia. A bebida preparada no interior dessa cuia é conhecida como mate (DA CROCE e FLOSS, 1996).

A exploração da erva-mate começou em Santa Catarina nos campos e sertões de Lages sob a influência do Rio Grande do Sul. O historiador Costa Pereira acredita que foi em Lages que surgiram os primeiros engenhos catarinenses, pequenos e com reduzida produção. Só em 1853, uma fábrica em maior escala, instalou-se na região. A história do mate em Santa Catarina era sincronizada com a do Paraná, apesar de haver iniciado um pouco mais tarde (DE ANDRADE, 1999).

A erva-mate pertence a família das Aquifoliaceas e ao gênero *Ilex*, que atualmente compreende cerca de 400 espécies, sendo a maior parte, de origem asiática (ALIKARIDIS, 1987). O país com o maior número de espécies é o Brasil, possuindo em torno de 60 (GILBERTI, 1979), sendo a espécie *Ilex paraguariensis* Saint Hilaire var. *paraguariensis* considerada a ideal para a exploração comercial (OLIVEIRA e ROTTA, 1985).

2.1.1 Produção da erva-mate no Brasil

A erva-mate tem sua área de ocorrência natural restrita a 3 países: Brasil, Paraguai e Argentina (Figura 1), pode-se dizer que a superfície de abrangência geográfica, correspondendo a uma superfície com cerca de 540.000 Km². No Brasil sua área está dispersa principalmente nos Estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul e ainda um pouco do Mato Grosso do Sul, São Paulo e Minas Gerais, sendo de 450.000 Km² do total, equivalendo a 5% do território. A espécie pode ocorrer em pontos isolados, fora destes limites, em regiões subtropicais e temperadas da América do Sul (OLIVEIRA e ROTTA, 1985; DE ANDRADE, 1999).

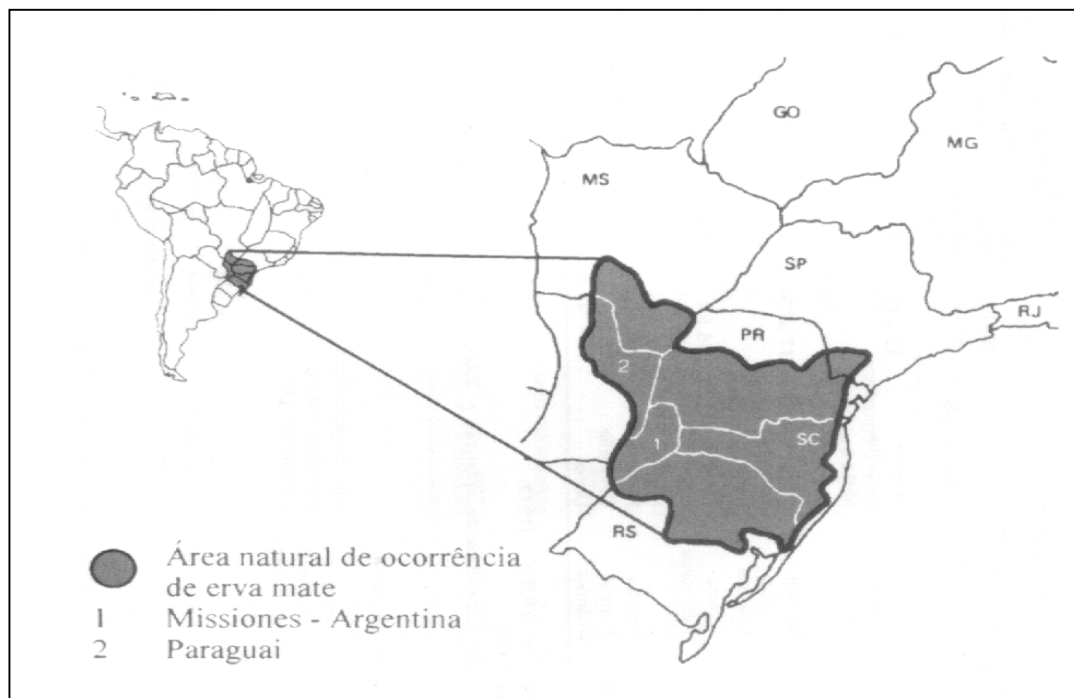


Figura 1 – Área de ocorrência natural de erva-mate no continente Sul Americano

No sul do país a grande parte da matéria-prima provém de ervais nativos, só no Paraná 91,2% são ervais nativos, o que corresponde a aproximadamente 258 mil ha, sendo a maior concentração da região Sul. As propriedades rurais envolvidas com a atividade da erva-mate em Santa Catarina, concentram-se principalmente nas regiões Oeste e Norte do estado, onde cerca de 80% no estado nativo e 20% em áreas plantadas (DA CROCE, 1996). É uma cultura caracterizada como de pequena propriedade, com emprego de mão de obra familiar.

Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE (2001) (Tabela 1), o Paraná ainda figura como o maior produtor nacional, sendo Santa Catarina o segundo produtor e cuja produção está em franco desenvolvimento. O Rio Grande do Sul tem a maior parte da produção representada pelos ervais plantados e ocupa a terceira posição na produção brasileira.

Tabela 1 – Produção de erva-mate cancheada na região Sul do Brasil em 2001

Estado	Erva-mate cancheada (toneladas)
Paraná	122.695
Santa Catarina	33.506
Rio Grande do Sul	24.001
Total	180.202

Fonte: IBGE, 2001

A árvore da erva-mate possui caule de cor acinzentada, geralmente com 20 a 25 cm de diâmetro, podendo atingir 50 cm. Conforme o local e a idade podem chegar aos 15 metros de altura mas quando recebem poda não ultrapassam 7 metros. A parte que realmente interessa são as folhas, que estão distribuídas de forma alternada, são sub-coriáceas até coriáceas, estreitas na base e ligeiramente obtusas no vértice. Suas bordas possuem pequenos dentes, visíveis da metade do limbo para a extremidade. O pecíolo é relativamente curto, medindo mais ou menos 15 milímetros e mostra-se um tanto retorcido. A folha inteira mede geralmente de oito a dez centímetros de comprimento por quatro a cinco de largura. Em áreas de matas nativas, onde há menor intensidade de luz, as folhas podem chegar a uma dimensão bem superior, cerca de 23 cm de comprimento com 8 a 10 cm de largura. A erva-mate floresce entre os meses de setembro e dezembro e sua frutificação ocorre nos meses de janeiro a março. A produtividade média das árvores estabiliza-se aos 10-12 anos, sendo em torno de 14 a 20 kg por árvore. Erveiras nativas, de maior porte, chegam a dar de 80 a 180 kg de matéria verde por árvore em podas a cada 3-5 anos. O Instituto Brasileiro de Recursos Naturais Renováveis – IBAMA, é o órgão responsável por estabelecer a época de colheita da erva-mate (DE ANDRADE, 1999).

2.1.2 Composição química

A composição química da erva-mate possui muitos compostos de interesse e podem servir como matéria-prima para inúmeros subprodutos. Os povos indígenas a utilizavam para aumentar a resistência à fadiga e reduzir a sede ou a fome (BERKAI e

BRAGA, 2000). O uso do mate se deve, principalmente, à sua ação estimulante sobre o sistema nervoso central, devido à presença das bases xânticas: cafeína, teobromina, teofilina (LITTER, 1986 apud RICCO, 1995).

Em 1944 foram identificados como constituintes da erva-mate os seguintes compostos: água, celulose, gomas, dextrina, mucilagem, glicose, pentose, substâncias graxas, resina aromática (formada por uma mistura de oleína, palmitina, lauro-estearina e um óleo cujas características muito se aproximam da cumarina), legumina, albumina, cafeína, teofilina, cafearina, cafamarina, ácido matetânico, ácido fólico, ácido caféico, ácido virídico, clorofila, colessterina e óleo essencial. Nas cinzas encontram-se grandes quantidades de potássio, lítio, ácidos: fosfórico, sulfúrico, carbônico, clorídrico e cítrico, além de magnésio, manganês, ferro, alumínio e traços de arsênico. A cafeína, teofilina e teobromina são três alcalóides, estreitamente relacionados, encontrados na erva-mate e são os compostos mais interessantes sob o ponto de vista terapêutico. O teor de cafeína na erva atinge em média 1,60 %, enquanto que nas infusões o valor médio é de 1,10 % (VALDUGA, 1995 apud DE ANDRADE, 1999). A Tabela 3 apresenta a composição química média da erva-mate para chimarrão.

Tabela 2 – Composição química de erva-mate

Composição química	Valor Médio (g/100g)
Calorias	206,00 Kcal
Glicídios	24,74 g
Proteínas	11,00 g
Lipídios	7,03 g
Cálcio	668,00 mg
Fósforo	120,00 mg
Ferro	2,87 mg
Sódio (g)	3,00 mg
Potássio	1181,00 mg
Ácido ascórbico	5,90 mg
Retinol	210,00 µg
Tiamina	222,00 µg
Riboflavina	404,00 µg
Niacina	6,92 µg

FONTE: FRANCO (1998)

Os teores citados são médias, pois podem ocorrer variações conforme: idade da planta e das folhas, erval nativo ou plantado, luminosidade no erval. Este aspecto ainda é carente de informações, sendo necessário mais estudos a este respeito, de maneira que no futuro possam ser feitos plantios e colheitas específicas a cada interesse de consumo (FRANCO, 1998).

2.1.3 Beneficiamento e industrialização

A primeira colheita de produção é realizada a partir do 4° ou 5° ano de campo, após o plantio definitivo, sendo realizada a cada 2 anos. Retira-se em torno de 70% de galhos e folhas de cada erva, permanecem 30% para manter a estrutura e acelerar a recuperação da árvore. O período ideal de colheita da erva-mate (safra) é de maio a setembro, se concentrando nos meses de junho a agosto, antes de ocorrer a nova brotação, pois nesta época as folhas estão maduras e a erva está em repouso fisiológico (DE ANDRADE, 1999).

Os processos industriais para o beneficiamento da erva-mate pouco mudaram ao longo do tempo. Uma das mudanças foi a adoção de engenhos e barbaquás automáticos com grande capacidade de processamento. De maneira geral, os processos produtivos são os mesmos desde o início do ciclo do mate (TONON e MARUCCI, 1995; SOUZA, 1998).

O processamento da erva-mate para chimarrão consiste basicamente de três etapas: sapeco, secagem e cancheamento. O sapeco é realizado junto ao fogo direto e consiste na passagem rápida dos ramos com folhas sobre as chamas do sapecador. O equipamento consiste de um cilindro metálico, perfurado e inclinado através do qual a erva colhida passa recebendo as chamas. Esta etapa tem por função a retirada da umidade superficial e inativação de enzimas (peroxidase e polifenoloxidase) que causam a oxidação do produto. A temperatura média da erva na entrada do sapecador é de 400°C e na saída é de 65°C. O tempo de residência oscila em torno de 8 minutos (TONON e MARUCCI, 1995; DE ANDRADE, 1999; ESMELINDRO, et al., 2002).

A etapa de secagem pode ser realizada em dois tipos de secadores mecânicos - rotativo e de esteira. A principal diferença entre os dois tipos de secadores está relacionada com o contato da matéria-prima com a fumaça durante o processo de secagem. No secador rotativo, a fumaça entra em contato direto com o produto, e no secador de esteira, o contato é indireto, causando menores danos à matéria-prima. O tempo de residência e a temperatura média da erva nos secadores dependem das características operacionais de cada um (TONON e MARUCCI, 1995; DE ANDRADE, 1999; ESMELINDRO et al., 2002). No secador de esteira, o tempo médio é de 3 horas e a temperatura varia entre 90 e 110°C. No secador rotativo, o produto permanece em contato direto com a fumaça por aproximadamente 30 minutos. No entanto, a temperatura não apresenta a mesma uniformidade da utilizada no secador de esteira, sendo que na entrada do secador a temperatura média é de 350°C e na saída 110°C (ESMELINDRO et al., 2002).

O cancheamento consiste na trituração da erva após o processo de secagem. Em seguida, a erva é peneirada e o material coletado passa a denominar-se erva cancheada. Esta pode ser usada diretamente como matéria-prima para a produção de chás ou, após passar por um processo de soque, como chimarrão (DE ANDRADE, 1999; ESMELINDRO et al., 2002).

O beneficiamento destinado ao consumidor final (Figura 2), que ocorre nas indústrias após a obtenção da erva-mate cancheada, se resume em três operações fundamentais: a moagem, a mistura (formação dos tipos especiais) e o empacotamento. Segundo De Andrade (1999), a erva cancheada pode ser armazenada ou não, conforme a preferência do mercado, sendo:

- Mercado interno: produto de coloração verde (erva não descansada, sem armazenamento);
- Mercado externo: produto de coloração amarela (erva descansada, longo período de armazenamento) .

A erva, separada por peneiras especificadas pelas normas de classificação oficial nos tamanhos exigidos a cada mistura, é enviada a seus respectivos depósitos, deles retiram-se a quantidade necessária para compor, nos misturadores, o tipo comercial desejado. Os misturadores geralmente são transportadores helicoidais que procedem a mistura, formando o tipo de produto exigido pelo consumidor (DE ANDRADE, 1999).

As folhas da erva-mate são submetidas a todas as fases do processo de beneficiamento, sofrem uma redução de peso que varia de 50 a 60% conforme o estado de maturação das folhas e as condições do processo de beneficiamento (SOUZA, 1947; DE ANDRADE, 1999).

2.2 Fungos toxigênicos

Desde a descoberta da aflatoxina em 1960, é reconhecida a capacidade de muitos fungos de origem alimentar em produzir toxinas. As micotoxinas representam um sério risco para a saúde humana e animal, embora a gravidade dos casos de envenenamento seja muito variável, dependendo das espécies envolvidas (KURUTA & UENO, 1984)

Nem todos os fungos produzem toxinas e a presença de uma micotoxina e o risco associado somente podem ser determinados depois da extração e identificação da mesma. A presença do fungo não assegura que exista a micotoxina, esta permanece no alimento ainda que o fungo tenha desaparecido; um fungo pode produzir mais de uma micotoxina; uma determinada toxina pode ser formada por mais de uma espécie de fungo (FONSECA, 1974; SWANSON, 1987).

Nos produtos agrícolas, os fungos toxigênicos têm sido divididos em dois grupos. O primeiro inclui os fungos invasivos, que produzem toxinas antes da colheita. O segundo é formado pelos fungos que desenvolvem-se após a colheita. Em ambos os casos, entretanto, a fonte original dos fungos é o campo. A invasão dos fungos antes da colheita é governada principalmente pela planta hospedeira e por outras interações biológicas (ex. insetos), enquanto que o crescimento fúngico pós-colheita, pelo produto agrícola (nutrientes), fatores físicos (temperatura, umidade) e fatores biológicos (insetos, competição) (TANIWAKI e SILVA, 2001).

Os fungos adquiridos no campo são: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Verticillium*, além de outros fitopatógenos, as espécies diferem segundo o vegetal, o clima e a região geográfica (LACEY, 1989; WIDSTROM, 1992). Requerem geralmente uma umidade relativa entre 90 e 100 % e um conteúdo de água na sementes de 22 a 23 % para crescer, e uma faixa de temperatura entre 0 e 30°C, ainda que alguns possam desenvolver-se a 35°C ou mais (CHRISTENSEN, 1987).

Os fungos presentes nos produtos armazenados são espécies pertencentes ao gênero *Aspergillus*, *Penicillium* e alguns xerófilos (LACEY, 1989). Os fatores que influenciam no desenvolvimento são o conteúdo de umidade do substrato, a temperatura, o tempo, o grau de invasão fúngica antes do armazenamento e a atividade

de insetos e ácaros que facilitam a disseminação. Requerem menor umidade relativa ambiente (70 a 90%) e conteúdo de água nas sementes (15 a 20%), mas a faixa de temperatura é mais ampla (0 a 45°C) e podem crescer em menor concentração de oxigênio (CHRISTENSEN, 1987).

2.3 Micotoxinas

As micotoxinas são produto do metabolismo secundário de fungos e a afecção é chamada de micotoxicose (SWANSON, 1987). Sua presença em alimentos e rações representa um risco à saúde humana e animal. Elas podem ser encontradas em uma ampla variedade de alimentos e rações decorrente da contaminação invisível (pois normalmente não se observa dano aparente), no campo durante o desenvolvimento da planta, colheita, armazenamento e processamento.

Cerca de 300 micotoxinas já foram descritas (COLE e COX, 1981), produzidas por aproximadamente 200 diferentes fungos. Entretanto, apenas cerca de 20 dessas micotoxinas são encontradas em alimentos e rações, em níveis que possam ser considerados de risco para a saúde (ANKLAM et al., 2002). Destas, a aflatoxina é a mais significativa em termos mundiais, tanto no que se refere à toxicidade como também a sua ocorrência. As micotoxinas são compostos que diferem muito em suas propriedades químicas, biológicas e toxicológicas (JONSYN et al., 1995).

As micotoxinas apresentam uma grande variedade de estruturas químicas, inclusive algumas são relativamente simples, quando comparadas com as toxinas bacterianas. Esta grande variação na natureza química, implica na necessidade de um

grande número de métodos de extração a partir de alimentos, dificultando também o controle e a padronização das metodologias. Além disso, ainda são requeridos vários outros procedimentos para a sua identificação e quantificação (PURCHASE, 1974).

O metabolismo primário dos fungos é similar ao da maioria dos organismos eucariotos. Os metabólitos secundários são formados a partir de uns poucos intermediários do metabolismo primário em condições sub-ótimas e o estresse (SWANSON, 1987). Durante a biossíntese destes metabólitos, a quantidade produzida depende não somente dos parâmetros nutricionais e ambientais, como também da história do desenvolvimento do fungo. A formação de micotoxinas indica que o fungo alcançou certo grau de diferenciação bioquímica, fisiológica e morfológica. As condições que afetam a produção de toxina pelo fungo incluem: variação da cepa, susceptibilidade genética da planta hospedeira ou gênero, conteúdo de umidade, composição química da planta, temperatura, aeração, população microbiana e estresse. Quanto mais complexa é a rota biossintética destes metabólitos secundários, mais restrito é o número de espécies de fungos produtores (MOSS, 1991).

Nas condições naturais encontradas nos alimentos, sempre há uma interação entre os fungos, as leveduras e as bactérias presentes. A produção de toxinas pelos fungos pode afetar os demais microrganismos, dificultando o seu crescimento, mas o contrário também é possível, pois certos microrganismos podem inibir a produção de toxinas, removê-las ou degradá-las. Há evidências de que as toxinas são produzidas em menor quantidade quando os fungos toxigênicos crescem em presença de outros microrganismos (TANIWAKI e SILVA, 2001).

As micotoxinas já foram encontradas em quase todos os tipos de cereais, oleaginosas e produtos alimentícios, tanto de origem vegetal como animal. As

informações disponíveis atualmente permitem avaliar quais os alimentos e matérias-primas que apresentam maior risco, pois sabe-se que alguns produtos são muito mais susceptíveis à invasão por fungos potencialmente toxigênicos que outros. A maioria dos alimentos termo-processados, por exemplo, devem ser protegidos através do monitoramento da matéria-prima ou, depois de manufaturados, através de análises químicas (TANIWAKI e SILVA, 2001).

Os efeitos tóxicos das micotoxinas atingem humanos e animais, podendo causar efeitos alérgicos e imunossupressores até câncer. Micotoxinas apresentam quatro tipos de toxicidade: aguda, crônica, mutagênica e teratogênica. O efeito mais comumente descrito da intoxicação aguda por micotoxinas é a degeneração das funções hepáticas e renais que, em casos extremos, pode provocar a morte (PITT, 2000).

2.3.1 Aflatoxinas

As aflatoxinas foram descobertas em 1960, o que explica o fato de serem as micotoxinas mais estudadas e pesquisadas até o momento. A aflatoxina B₁ é a mais tóxica delas, causando uma variedade de efeitos adversos em diferentes espécies e animais (STEYN, 1995; MOSS, 1996).

Estas toxinas contêm um núcleo cumarínico fusionado a um bifurano e uma estrutura pentanona. Estes metabólitos secundários (Figura 1), são produzidos por uma rota biossintética comum com a esterigmatocistina, a partir de um precursor policetônico (KLICH e CLEVELAND, 2000).

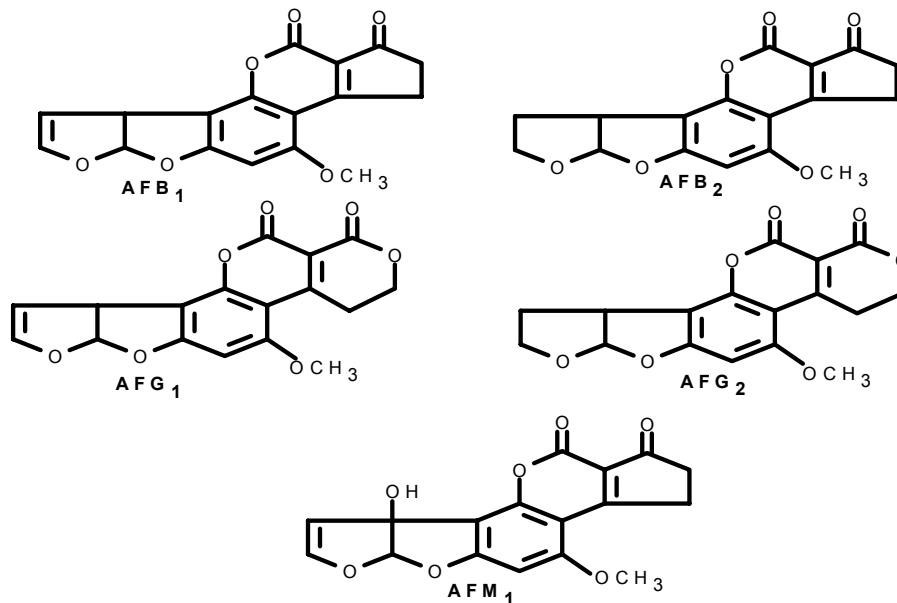


Figura 2 – Estruturas químicas das aflatoxinas (STEYN, 1995)

Aspergillus flavus, *A. pseudotamari* e algumas cepas de *A. caelatus* produzem aflatoxinas B₁ e B₂ enquanto que *A. parasiticus* e *A. nomius* formam as aflatoxinas G₁ e G₂ (ITO et al., 2001). As cepas africanas e argentinas de *A. flavus* var. *parvisclerotigenus* produzem aflatoxina G₁ (COTTY e CARDWELL, 1999; NOVAS e CABRAL, 2002). A porcentagem de cepas produtoras de toxinas é maior em *A. parasiticus* que em *A. flavus* (ITO et al., 1992).

As letras B e G se referem à fluorescência azul e verde, respectivamente, observada sob luz U.V. Em estado puro, são pós cristalinos que se decompõem ao alcançar ponto de fusão (B₁= 268 a 269°C, B₂= 286 a 289°C, G₁= 244 a 246°C, G₂= 237 a 240°C, M₁ = 299°C, M₂= 330°C) (DETROY et al., 1971). Estas toxinas são

encontradas com maior freqüência em oleaginosas e cereais, especialmente em regiões de zonas quentes. As aflatoxinas M₁ e M₂ são produtos metabólicos da aflatoxina B₁ consumida na ração e excretada no leite como M₁ (MOSS, 1991).

As aflatoxinas são compostos com efeitos tóxicos imediatos, além de outros que levam mais tempo para se manifestarem, tais como os efeitos: imunossupressores, mutagênicos, teratogênicos e carcinogênicos (PERAICA et al., 1999). O fígado é o principal órgão afetado pelos efeitos tóxicos e carcinogênicos. As aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ foram classificadas na classe 1 dos carcinógenos humanos pela IARC (1993). Quanto à aflatoxina M₁, o metabólito da aflatoxina B₁ encontrada no leite humano e animal, não há, até o momento, evidências claras de carcinogenicidade (PERAICA et al., 1999). Baseado em estudos estatísticos, a aflatoxina têm sido relacionada com a elevada incidência de câncer primário no fígado em Moçambique, Uganda, Tailândia, Quênia e Swazilândia (TANIWAKI e SILVA, 2001).

2.3.2 Ocratoxina A

A ocratoxina A produziu efeitos nefrotóxicos, imunossupressores, carcinogênicos e teratogênicos, em todos os animais de experimentação estudados. (WHO, 1990). A ocratoxina é suspeita de ser um dos agentes causadores de câncer do trato urinário e de nefropatias no leste europeu (Croácia, Bulgária e Iugoslávia). Nestes países endêmicos, a incidência de tumores uroteliais da pélvis renal e o ureter, em geral pouco freqüentes, é 50, 90 e 100 vezes maior, respectivamente, que em regiões não endêmicas. Praticamente, todos os europeus apresentam alguma concentração de

ocratoxina em seu sangue. A exposição do homem à ocratoxina ocorre primariamente a partir do pão integral. Em algumas partes da Europa, a exposição mais significativa decorre do consumo de produtos animais, especialmente produtos formulados à base de sangue suíno (KUIPER-GOODMAN, 1989).

É um derivado dihidroisocumarínico ligado à fenilalanina (Figura 2). A toxina pura é um pó cristalino branco com ponto de fusão a 169° C. Emite fluorescência verde que muda para azul em presença de um álcali. Em cereais contaminados, é bastante estável ao calor e persiste em 35 % da quantidade inicial, após tratamento durante 3 horas, em autoclave (STEYN, 1995).

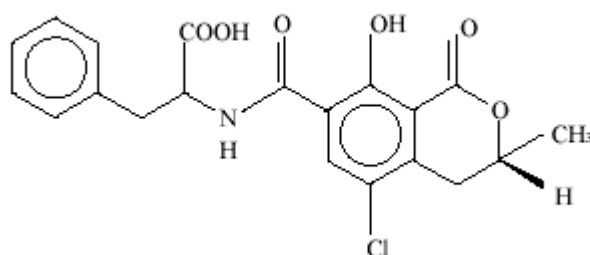


Figura 3 – Estrutura química da ocratoxina A (STEYN, 1995)

Em áreas quentes, as ocratoxinas são formadas por espécies de *Aspergillus* e em climas frios, por cepas de *Penicillium*. As espécies produtoras são: *A. ochraceus*, *A. melleus*, *A. auricomis*, *A. ostianus*, *A. petrakii*, *A. sclerotiorum*, *A. sulfureus*, *A. alliaceus*, *A. albertensis*, *A. niger*, *A. carbonarius* e *Aspergillus (Eurotium herbariorum)* (BAYMAN et al., 2002). O valor mínimo de atividade de água para a produção de toxinas está entre

0,83 e 0,87 com um ótimo de 0,99 a 24 °C, enquanto que a faixa de temperatura em atividade de água ótima está entre 12 e 37 °C (WHO, 1990).

Apesar dos estudos feitos até o momento, não há conclusões definitivas sobre o envolvimento da ocratoxina nos danos aos rins e no câncer do trato urinário de humanos. A avaliação da IARC (1993) estabeleceu que a ocratoxina é um possível carcinógeno humano.

2.3.3 Fumonisinias

As fumonisinias foram descobertas em 1988 e são produzidas pelo gênero *Fusarium*, principalmente pelo *F. verticillioides* e *F. proliferatum*, além de outras espécies (CHELKOWSKI; LEW, 1992; NELSON et al., 1992; THIEL et al., 1991; LESLIE et al., 1992; CHEN et al., 1992; ROSS et al., 1990).

A fumonisina B₁(FB₁) é a mais importante toxina do grupo, seguida de FB₂ e FB₃ que ocorrem naturalmente em milho e alimentos à base de milho (GELDERBLOM et al., 1992; VISCONTI et al., 1994).

Caracterizam-se como um grupo de aminopoliálcoois, tricarboxilados, similares à esfingosina (Figura 4), exercendo, portanto, sua toxicidade baseada nesta estrutura molecular, podendo interagir com enzimas envolvidas no metabolismo dos esfingolipídios e interferir em sua atividade funcional (ONO e HIROOKA, 2003)

Estudos demonstraram que o mecanismo de toxicidade das fumonisinas está relacionado a alterações na biossíntese dos esfingolipídios, devido à semelhança estrutural com as bases esfingóides, esfinganina e esfingosina, bem como, pela capacidade de inibir a esfinganina N-aciltransferase, uma enzima crítica para a biossíntese dos esfingolipídios (WANG et al., 1991).

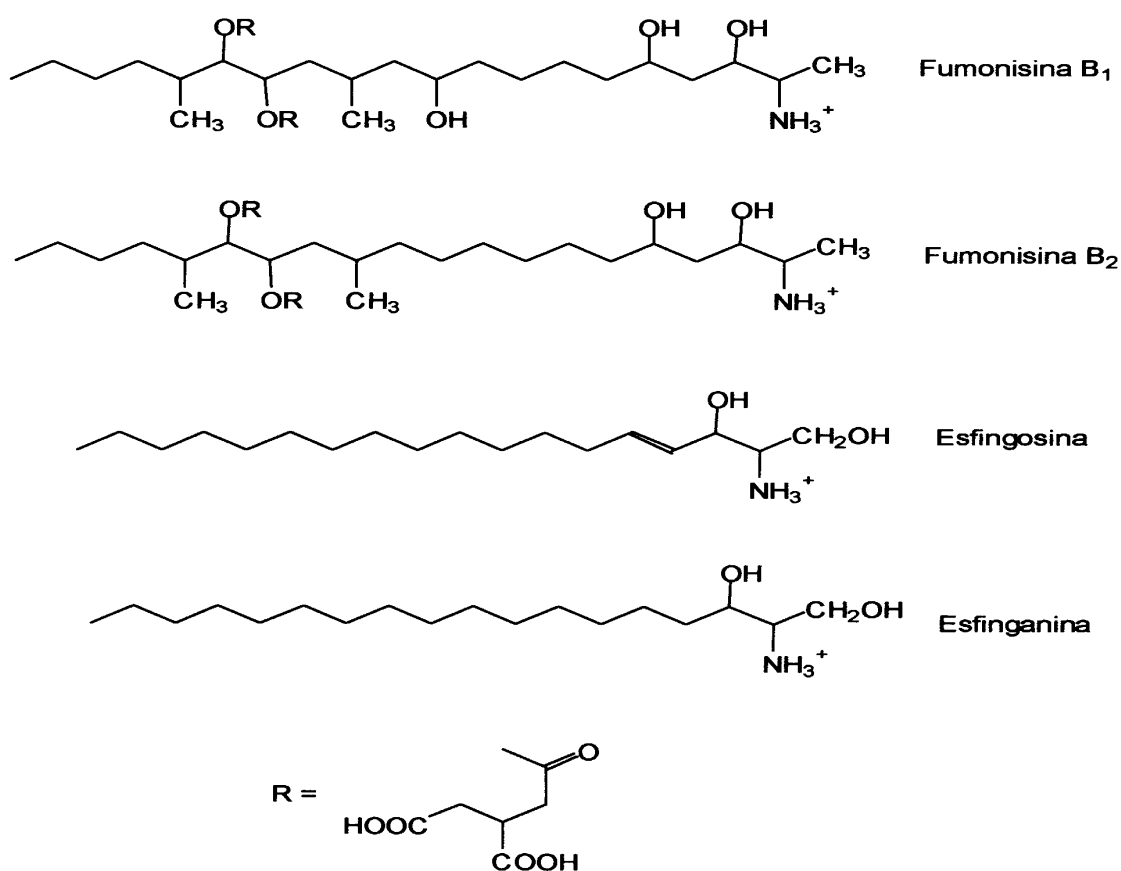


Figura 4 – Estrutura química das fumonisinas B₁ e B₂, esfingosina e esfinganina (MARASAS et al., 1988).

Lesões teciduais do sistema nervoso central (SNC), rico em esfingolipídios, observadas em eqüinos intoxicados com fumonisinas, podem ser atribuídas à inibição da biossíntese da esfingomielina (NORRED et al., 1992).

As fumonisinas afetam os sítios de regulação celular, aparentemente independentes da interrupção do metabolismo de lipídios, resultando na alteração da proliferação celular, comunicação célula-célula, adesão celular, velocidade da apoptose, indução do estresse oxidativo e modulação da expressão gênica (ONO e HIROOKA, 2003).

A constante ingestão de fumonisinas através de produtos e derivados de milho, tem sido associada ao câncer de esôfago em Transkey (África) e Linxian (China), onde se verifica alta incidência desta patologia. Os níveis médios de FB₁ e FB₂ foram significativamente maiores, tanto em grãos de milho mofado, quanto nos aparentemente saudáveis, na região de alta incidência de câncer de esôfago, quando comparados com área de baixa incidência, na África do Sul, no período compreendido entre 1985 e 1989 (SYDENHAM et al., 1990). Em uma amostra de milho, aparentemente saudável, encontrou-se 44 µg/g de FB₁ e grãos visivelmente contaminados por *Fusarium* apresentaram contaminação de 83 µg/g de FB₁ (MARASAS, 1996).

A IARC classificou as toxinas derivadas de *Fusarium verticillioides* no Grupo 2B, como possíveis carcinogênicos para humanos (IARC, 1993), indicando evidências de carcinogenicidade no que se refere a testes em animais, mas os dados em humanos são insuficientes.

2.4 Câncer de esôfago

O câncer de esôfago é o 9º mais comum no mundo, com cerca de 300.000 casos diagnosticados a cada ano, sendo que nos países em desenvolvimento ocupa o quinto lugar e devido a suas características, sugere um predomínio de fatores ambientais externos. Corresponde a 1% dos tumores malignos, 11.000 novos casos ao ano nos EUA. Os homens apresentam uma incidência 5 vezes maior que as mulheres, sendo fumo, álcool e refluxo gastroesofágico os principais fatores de risco para este tipo de câncer, além do uso de chimarrão, no Sul do Brasil (CEPON, 1999).

Dados sobre a distribuição mundial do câncer de esôfago são pobres, mas verifica-se taxas muito elevadas em homens negros da África do Sul e América do Norte, taxas altas ou médias em algumas áreas do Caribe e Índia, taxas muito altas na China e em algumas populações chinesas migrante. Altas taxas também, tem sido observadas, particularmente entre homens, no Uruguai, nordeste da Argentina e Sul do Brasil (MUNÓZ et al., 1987).

Neste contexto o câncer de esôfago, neoplasia bem conhecida por sua marcada variação com relação a região geográfica, grupo étnico e sexo, apresenta-se como 4ª causa de morte por câncer em homens no Brasil sendo a maior incidência no Sul do país com uma taxa bruta de 16,72 (por 100.000 homens) (INCA-MS, 1999). Segundo dados do Registro Hospitalar de Câncer (RHC-1999) do Paraná, a incidência de câncer de esôfago na região Sul do país é de 44 casos por 100.000 habitantes, por ano.

2.5 A relação do chimarrão com o câncer de esôfago

Estudos clínicos e epidemiológicos têm mostrado um moderado (VICTORA *et al.*, 1990; FRANCO, KOWALSKI e OLIVEIRA, 1989) para alto risco (DE STEFANI *et al.*, 1990) de neoplasma maligno do *trato aerodigestivo superior* entre consumidores de chimarrão. E poderia também ser notado que a incidência de câncer oral e orofaríngeo na Argentina, Sul do Brasil e Uruguai é muito alta e aumenta particularmente nas partes Sul da América do Sul. Os fatores de risco específicos identificados são: tabaco, álcool, carnes grelhadas (utilizando carvão) e chimarrão (WUNSH-FILHO e DE CAMARGO, 2001).

O principal problema na avaliação dos efeitos do consumo do chimarrão como um agente carcinogênico é a dificuldade em obter o controle apropriado pois os fatores de risco, álcool e cigarro, comprometem a avaliação. Fumar e consumir álcool são os mais importantes fatores de risco para cânceres de *trato aerodigestivo superior*, não sendo apenas correlacionados mutuamente mas também fortemente associados com o consumo de chimarrão na maioria da população sul americana (PINTOS *et al.*, 1994).

Pintos e colaboradores (1994), investigaram se o aumento do risco de câncer pode ser atribuído a alta temperatura com que o chimarrão é consumido e não encontraram evidências deste efeito.

De Stefani e colaboradores (1990), investigaram a associação entre consumo de chimarrão e câncer na cavidade oral e orofaríngea em humanos. Concluíram que a exposição causada pelo chimarrão aumenta em cinco vezes a incidência de câncer orofaríngeo após ajustamento de variáveis tabaco e álcool.

Segundo Oreggia e colaboradores (1991), em amplo estudo dos fatores de risco para o câncer do *trato aerodigestivo superior*, realizado em um hospital em Montevideu no Uruguai, concluíram que o consumo de chimarrão possui um relativo risco 2,5 vezes para desenvolvimento de câncer de língua (álcool 11,6; tabaco 7).

Os estudos feitos por De Stefani e Orregio não avaliaram o efeito da temperatura da água de consumo do chimarrão e sua relação com o desenvolvimento de carcinoma (GOLDENBERG, 2002). O dano provocado pela alta temperatura de consumo do chimarrão tem sido sugerido como um dos seus efeitos carcinogênicos, particularmente ao esôfago. Um grupo que trabalha para a IARC (*International Agency for Research on Cancer*), concluiu que a alta temperatura do consumo do chimarrão é o provável agente carcinogênico para humanos (IARC, 1991).

Estudos conduzidos para justificar os efeitos carcinogênicos do chimarrão, propõem que o chimarrão pode atuar como um solvente para compostos carcinogênicos químicos encontrados no tabaco ou compostos fenólicos presentes na erva-mate, podendo atuar como promotores do câncer. A erva-mate contém taninos e compostos N-nitrosos, os quais são também suspeitos como possíveis agentes carcinogênicos. A erva-mate contém 7 a 14% de taninos quando bebida em infusão (GOLDENBERG, 2002). Vassallo e colaboradores (1985), sugerem que o conteúdo de taninos no chimarrão pode ser responsável pelo aumento do risco de câncer de esôfago.

Muñoz e colaboradores (1987), também avaliaram o efeito direto do chimarrão no esôfago através da investigação da prevalência de lesões cancerosas no esôfago como esofagites em homens que consumiam chimarrão diariamente comparados com não consumidores de chimarrão. Confirmaram histologicamente que os consumidores

de chimarrão são 2,2 vezes mais suscetíveis ao desenvolvimento de esofagites quando comparados com não consumidores.

BIBLIOGRAFIA

ANKLAM, E.; STROKA, J.; BORKE, A. Acceptance of analytical methods for implementation of EU legislations with a focus on mycotoxins. **Food Control**, v. 13, p. 173-183, 2002.

BAYMAN, P. et al. Ochratoxin production by the *Aspergillus ochraceus* group and *Aspergillus alliaceus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 2323-2329, 2002.

BERKAI, D.; BRAGA, C. A. **Quinhentos anos de história da erva-mate**. Atlas: Porto Alegre, 2000. 97 p.

BITTENCOURT, C.A.F.; OLIVEIRA, P.; CORRÊA, B. Mycotoxin occurrence in corn meal and flour traded in São Paulo, Brazil. **Food Control**, v. 16, p. 117-120, 2003.

CEPON - CENTRO DE PESQUISAS ONCOLÓGICAS DE SANTA CATARINA. **Registro Hospitalar de Câncer – RHC/1997.1999**.

CHELKOWSKI, J.; LEW, H. *Fusarium* species of Liseola section: occurrence in cereals and ability to produce fumonisins. **Microbiology Alimentary Nutrition**, n.10, p. 49-53, 1992.

CHEN, J.; MIROCHA, C. J.; XIE, W.; HOGGE, L.; OLSON, D. Production of the mycotoxin fumonisin B₁ by *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*. **Applied Environmental Microbiology**, v.58, p. 3928-3931, 1992.

CHRISTENSEN, C.M. Field and storage fungi. In: BEUCHAT, L.R. (Ed.). **Food and beverage mycology**. New York: Van Nostrand Reinhold, 1987, p. 211-232.

CHU, F.S. Mycotoxins: food contamination, mechanism, carcinogenic potencial and preventive measures. *Mutation Research*, v. 259, n.3-4, p. 291-306, 1991.

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

COTY, P.J; CARDWELL, K.F. Divergence of west african and north american communities of *Aspergillus* section *flavi*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p.2264-2266, 1999.

DA CROCE, D. M. **Cadeia Produtiva da erva-mate em Santa Catarina**. Chapecó: EPAGRI-Empresa Catarinense de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina S.A. Centro de Pesquisa para Pequenas Propriedades - CPPP, 1996. 35 p.

DA CROCE, D. M.; FLOSS, P. A.; NADAL, R.; BOHNER, J. A. M. Erva-Mate em alta densidade. **Revista Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v. 9, n. 3, p. 19-22, set. 1996.

DE ANDRADE, F. M. **Diagnóstico da cadeia produtiva da *Ilex paraguariensis* St. Hill. Erva-mate.** (UNICAMP – Campinas), 1999. Disponível em: < <http://www.unicamp.br/nipe/rbma/ervmenub.htm>>. Acesso em: 15 julho 2003.

DE CAMARGO, M.C.R; TOLEDO, M.C. Chá-mate e café como fontes de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) na dieta da população de Campinas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 22, n.1, 2002.

DE STEFANI E.; MUNOZ, N.; ESTEVE, J.; VASSALLO, A.; VICTORA, C. G. Teuchmann S. Mate drinking, alcohol, tobacco, diet, and esophageal cancer in Uruguay. **Cancer Research**, v.50, p.426-431, 1990.

DETROY, R.W. Aflatoxin and related compounds. In: **Microbial toxins**. CIEGLER A. et al. (Ed). New York: Academic Press, v.6, 1971.

ESMELINDRO, M. C.; TONIAZZO, G.; WACZUK, A.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, D. Caracterização físico-química da erva-mate: influência das etapas do processamento industrial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.22, n.2, p.193-204, 2002.

FONSECA, H.; MARTINELLI FILHO, A.; DEL NERY, H., RONCATTO, E. Espécies de *Aspergillus* produtoras de aflatoxinas na Região Araraquarense, SP. Anais da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, v. 31, p. 519-536, 1974.

FRANCO, E. L. KOWALSKI, L. P. OLIVEIRA, B. V. Risk factors for oral cancer in Brazil: a case control study. **International Journal of Cancer**, v.41, p.992-1000, 1989.

FRANCO, G. **Tabela de composição química dos alimentos**. 9 ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 1998. 307 p.

GELDERBLOM, W. C. A.; KRIEK, N. P. J.; MARASAS, W. O. F.; THIEL, P. G.; CAWOOD, M. E. Fumonisin isolation, chemical characterization and biological effects. **Mycopathology**, v. 117, p11-16,1992.

GOLDENBERG, D. Maté: a risk factor for oral and oropharyngeal cancer. Review. **Oral Oncology**, v.38, p. 646-649, 2002.

IARC - INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans**. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France, v. 51. 1991.

IARC -INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk to humans. **Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins**. UK, 1993, v.56, p. 445-466.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção da extração vegetal e da silvicultura 2001**. Rio de Janeiro, v.16, p. 114-117.

INCA - INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Coordenação de Programa de Controle de Câncer – Pro-Onco. **Estimativa de Incidência e Mortalidade por Câncer no Brasil 1999**. Rio de Janeiro, 1999.

ITO Y., et al. *Aspergillus pseudotamarii*, a new aflatoxin producing species in *Aspergillus* section *Flavi*. **Mycological Research**, v.105, p. 233-239, 2001.

JONSYN, F.E. Ochratoxin A and aflatoxins in breast milk samples from Sierra Leone. **Mycopathologia**, v. 131, p.121-126, 1995.

KLICH, M.A.; CLEVELAND, T.E. *Aspergillus* systematics and the molecular genetics of mycotoxin biosynthesis. SAMSON, R.A.; PITT, J.I. (Ed.). In: **Integration of Modern Taxonomic Methods for Penicillium and Aspergillus Classification**. Australia: Harwood Academic Publishers, 2000, p. 425-434.

KUIPER-GOODMAN, T; SCOTT, P.M. Risk assessment of the mycotoxin ochratoxin A. **Biomedical Environment Science.**, v. 2, p. 179-248, 1989.

KURUTA, H.; UENO, Y. **Toxigenic Fungi: Their Toxins and Health Hazard**. Developments in Food Science, v.7. Tokyo: Elsevier, 1984.

LACEY, J. Pre-and post-harvest ecology of fungi causing spoilage of foods and other stored products. **Journal of Applied Bacteriology**, Symposium Supplement, p. 11-25, 1989.

MARASAS, W.F.O. Fumonisin: history, worldwide occurrence and impact. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.392, p. 1-17, 1996.

MARASAS, W.F.O.; KELLERMAN, T.S.; GELDERBLUM, W.C.A.; COETZER, J.A.W.; THIEL, P.G.; VAN DER LUGT, J. J. . Leukoencephalomalacia in a horse induced by fumonisin B1, isolated from *Fusarium moniliforme*. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**. v. 55, p. 197 – 203, 1988.

MILLER, J.D. Fungi and mycotoxins in grain: implications for stored product research. **Journal of Stored Products Research**, v.31, p. 1-16, 1995.

MOSS, M.O. Mycotoxins: Centenary review. **Mycological Research**, v.100, n.5, p 513-523, 1996.

MOSS, M.O. The environmental factors controlling mycotoxin formation. In: SMITH, J.F.; HENDERSON, R.S. (Eds.). **Mycotoxins and animal foods**. Boca Raton: CRC Press, 1991, p. 37-56.

MOSS, M.O. The environmental factors controlling mycotoxin formation. In: SMITH, J.F.; HENDERSON, R.S. (Eds.). **Mycotoxins and animal foods**. Boca Ratón: CRC Press, 1991, p. 37-56.

MUÑOZ, N.; VICTORA, C. G.; CRESPI, M.; SAUL, C.; BRAGA, N. M. CORREA, P. Hot mate drinking and precancerous lesions of the oesophagus: na endoscopic survey in southern Brazil. **International Journal of Cancer**, v.39, p.708-709, 1987.

NORRED, W.P.; WANG, E.; YOO, H.; RILEY, R.T.; MERRIL Jr., A.H. In vitro toxicology of fumonisins and mechanistic implications. **Mycopatology**, v. 117, p. 73-78, 1992.

NOVAS, M.V; CABRAL, D. Association of mycotoxin and sclerotia production with compatilibily groups in *Aspergillus flavus*. **Plant Disease**, v. 86, p.215-219, 2002.

OLIVEIRA, Y. M. M.; ROTTA, E. Área de distribuição natural de erva-mate. Seminário sobre Atualidades e Perspectivas Florestais. Silvicultura da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.), 1983. **Anais...**, Curitiba: EMBRAPA-CNPFF, p. 17-36, 1985.

ONO, E. Y. S.; HIROOKA, E. Y. Hazards of *Fusarium verticillioides*, a mycotoxigenic fungus. In: KUSHWAHA, R. K. S (Ed). **Fungi Human and Animal Health**. Cap. 16, p.355-385. Scientific Publishers Jodhpur, 2003.

OREGGIA, F.; DE STEFANI, E.; CORREA, P.; FIERRO, L. Risk factors for cancer of the tongue in Uruguay. **Cancer**, v.67, p. 180-183, 1991.

PERAICA, M.; RADIC, B.; LUCIC, A.; PAVLOVIC, M. Efectos tóxicos de las micotoxinas en el ser humano. **Bulletin of the World Health Organization** v. 77, n.9, p.754-766, 1999.

PINTOS, J.; FRANCO, E. L.; OLIVEIRA, B. V.; KOWAISKI, L. P.; CURADO, M. P.; PITT, J. I. Food mycology – an emerging discipline. **Journal of Applied Bacteriology**, Symposium Supplement. v. 67, n.18, p. 75 – 95, 1988.

PITT, J. I. Toxigenic fungi and mycotoxins. **British Medical Bulletin**, v.56, n.1, p.184-192, 2000.

PITT, J.I. **The genus *Penicillium* and its teleomorphics states *Eupenicillium* and *Taloromyces***. London: Academic Press, 1979, 634 p.

PURCHASE, I.F.H. **Mycotoxins**. Amsterdam: Elsevier, 1974.

QUILLIEN, J.F. Mycotoxins. **Istitut National de la Recherché Agronomique**, France, n.3, p.14-24, 2000.

RICCO, R. A.; WAGNER, M. L.; GURNI., A. A. Estudio comparativo de flavonoides en especies austrosudamericanas del genero *Ilex*. In: WINGE, H.; FERREIRA, A. G.; MARIANTH, J. E. A. TARASCONI, L. C. **Erva Mati: Biologia e cultura no Cone Sul**. Porto Alegre: Editora da Universidade/UFRG, p. 243- 249, 1995. 356 p.

ROSS, P. F.; NELSON, P. E. RICHARD, J. L.; OSWEILER, G. D.; RICE, L. G.; PLATTNER, R. D.; WILSON, T. M. Production of fumonisins by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* isolates associated with equine leukoencephalomalacia and a pulmonary edema syndrome in swine. **Applied Environmental Microbiology**, v. 56, p. 3225-3226, 1990.

SAENS DE RODRIGUEZ, C.A. Environmental hormone contamination in Puerto Rico. **New England Journal of Medicine**, v. 310, p.1741-1742, 1984.

SOUZA, A. M. **Dos ervais ao mate: possibilidade de revalorização dos tradicionais processos de produção e transformação de erva-mate no planalto norte catarinense**. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas). Curso de Pós-Graduação em Agroecossistemas. Universidade Federal de Santa Catarina/SC, 1998. 113 p.

SOUZA, P. F. **Tecnologia de produtos florestais**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, p. 206-254, 1947.

STEYN, P.S. Mycotoxins, general view, chemistry and structure. **Toxicology Letters**, v 82/83, p. 843-851, 1995.

SWANSON, B.G. Mycotoxinas on fruits and vegetables. **Acta Horticulturae**, v. 207, p. 49-61, 1987.

SYDENHAM, E.W. THIEL, P.G.; MARASAS, W.F.O; SHEPHARD, G.S.; VAN SCHALKWYK, D.J; KOCH, K.R. Natural occurrence of some *Fusarium* mycotoxins in corn from low and high esophageal cancer prevalence areas of the Trankey, Southern Africa. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, USA, v.38, p.1900-1903, 1990

TANIWAKI, M.H.; DA SILVA, N. **Fungos em alimentos: Ocorrência e detecção**. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 2001, p. 63-64.

TONON, S. A.; MARUCCI, R. S. Flora fungica contaminante de yerba mate estacionada. **Alimentacion Latinoamericana**, Buenos Aires, n. 206. p. 23-32, 1995.

VASSALLO, A. CORREA, P.; DE STEFANI, E.; CENDAN, M.; ZAVALA, D.; CHEN, V.; CARZOGLIO, J.;DENEOPELLEGRINI, H. Esophagel cancer in Uruguay: a case-control study. **J. Natl Cancer Inst.**, v. 75, p. 1005 – 1009, 1985.

VICTORA, C. G.; MUNOZ, N; HORTA, B. L.; RAMOS, E, O. Patterns of mate drinking in a Brazilian city. **Cancer Research**, v. 50, p. 7112-7115, 1990.

VISCONTI, A.; DOKO, M. B.; BOTTALICO, C.; SCHURER, B.; BOENKE, A. Stability of fumonisins (FB₁ and FB₂) in solution. **Food Additives and Contaminants**, v.11, n.4, p.427-431, 1994.

WANG, E. ; NORRED, W.P.; BACON, C.W.; RILEY, R.T.; MERRILL, A.H.. Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins for diseases associated with *Fusarium moniliforme*. **Journal of Biology Chemistry**, v. 266, p. 14486-14490, 1991.

WHO. Selected Mycotoxins:ochratoxins, trichothecenes, ergot. **Environmental Health Criteria 105**. Geneva:World Health Organization, 1990.

WIDSTROM, N.W. Aflatoxin in developing maize: interactions among involved biota and pertinent economic factors. In: BHATNAGAR, D. et al. (Ed.). **Mycotoxins in ecological systems**. New York, 1992, p. 23-58, 1999

WUNSCH-FILHO, V.; DE CAMARGO, E. A. The burden of mouth cancer in Latin America and the Caribbean: epidemiologic issues. **Semin Oncol**, v.28, p.158-168, 2001.

3 ARTIGO: Ocorrência de fungos toxigênicos e micotoxinas em erva mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil. var *paraguariensis*) comercializada em Santa Catarina

3.1 RESUMO

Foram coletadas 42 amostras de erva-mate adquiridas em estabelecimentos comerciais no período de novembro/2003 a janeiro/2004 nas regiões Oeste, Serrana, Norte e Sul de Santa Catarina nas quais foi analisada a microbiota fúngica, a presença de espécies produtoras de micotoxinas e a presença de aflatoxinas, ocratoxinas e fumonisinas. Quanto à contagem total de fungos e leveduras 28,57 % das marcas de erva-mate analisadas apresentaram valores superiores a 10^3 UFC/g, acima do limite estabelecido pela legislação brasileira. Os seguintes gêneros fúngicos foram isolados em ágar extrato de malte, em ordem decrescente de frequência *Aspergillus* spp., *Mucor* spp., *Rhizopus* spp., *Penicillium* spp., *Paecilomyces* spp., *Helminthosporium* spp., *Botrytis* spp., *Fusarium* spp. e fungos não-esporulados. Das cepas de *Aspergillus* spp. 1,28 % foram produtoras de aflatoxinas do grupo B e 0,11 % de ocratoxina A. A produção de ocratoxina A foi verificada em 50 % das cepas de *Penicillium* spp. isoladas. A cepa de *Fusarium* não apresentou potencial toxigênico para a produção de fumonisinas. Nenhuma das micotoxinas analisadas foi detectada nas amostras de erva-mate.

Palavras-chave: chimarrão, erva-mate, fungos toxigênicos.

3.2 INTRODUÇÃO

A erva mate é o produto constituído, exclusivamente, pelas folhas e ramos das variedades de *Ilex paraguariensis*, na forma inteira ou moída obtido através de processo de secagem e fragmentação, o qual constitui matéria-prima para o chimarrão e tererê. O chimarrão é a bebida preparada com a erva-mate em infusão à quente e muito apreciada nos Estados da região Sul do Brasil (BRASIL, 2002).

O processamento e armazenamento, se mal conduzidos podem ocasionar pontos de reabsorção de umidade durante o período de estocagem, o que favorece o desenvolvimento fúngico podendo ocasionar problemas de conservação do produto e a possível ocorrência de micotoxinas.

Fatores como conteúdo de umidade, atividade de água, temperatura, período de armazenamento, níveis iniciais de contaminação, potencial toxigênico das cepas toxigênicas e substrato influenciam na produção de micotoxinas (BITTENCOURT et al., 2003).

Trabalhos relacionados à erva-mate, sobretudo em microbiologia, ainda permanecem escassos e a abordagem ao estudo de fungos toxigênicos, assim como ao de micotoxinas são ainda mais raros. O presente trabalho teve então, como objetivos verificar a presença de fungos toxigênicos em erva-mate comercializada em Santa Catarina. Considerando a importância econômica do consumo da erva-mate, principalmente no Sul do Brasil.

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL

Amostras: erva-mate (1 Kg), embalagem comercial (papel duplo), utilizada para o preparo de chimarrão, foram adquiridas em estabelecimentos comerciais no período de novembro/2003 a janeiro/2004 nas regiões: Oeste (12), Serrana (12), Norte (08) e Sul (08), totalizando 42 amostras e 14 marcas (3 lotes diferentes). Cada amostra foi homogeneizada e reduzida através de técnica de quarteamento manual até 250 g (sub-amostra) e desta foram retiradas alíquotas de 50 g para análise em duplicata. Foram mantidas a -18 °C até o momento das análises.

Padrões: aflatoxinas (B₁, B₂, G₁ e G₂) e ocratoxina A (Sigma ®), fumonisinas (B₁ B₂) fornecida pelo *Programme on Mycotoxins and Experimental Carcinogenesis* (PROMEC) da África do Sul. Soluções estoques individuais de fumonisinas B₁ e foram preparadas pesando-se 1 mg e dissolvendo-se em 10 mL de acetonitrila-água (1+1), segundo Visconti et al. (1994), obtendo-se uma concentração de 100 µg/mL. Soluções de trabalho foram preparadas em concentrações de 50 µg/mL de FB₁ e FB₂, respectivamente. Aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂, 2,5 µg/mL cada em benzeno. Ocratoxina A, 10 e 1µg/mL em benzeno (Sigma®). A determinação exata das concentrações foi realizada conforme descrito na AOAC (2000). Todas as soluções padrões foram armazenadas em frascos âmbar vedados, a -18°C.

Fase móvel: a fase móvel foi filtrada através de membrana HVLP 01300 de 0,45 µm de diâmetro (Millipore Corporation, Milford, MA) e degaseificadas em banho de ultra-som. Foi empregada fase móvel isocrática, metanol-0,1 M tampão diidrogênio fosfato de sódio(77 + 23; v/v), pH 3,3. O fluxo da fase móvel foi de 1 mL/min.

Reagente de derivatização: 40 mg de o-oftaldialdeído (OPA), dissolvido em 1 mL de metanol, misturado com 5 mL de solução de tetraborato de sódio 0,1 M, e 50 µL de 2-mercaptoetanol .

Sistema para cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE): válvula de injeção, loop 20µL (Rheodyne®). Bomba isocrática, detetor de fluorescência (Gilson®) com comprimento de onda de excitação de 335 nm e de emissão 440 nm. Coluna cromatográfica de fase reversa C₁₈, 250 mm x 4,6 mm, 5 µ (Phenomenex®).

MÉTODOS

(a) Análise micológica: porções de 25 g das amostras foram homogeneizadas em 225 mL de água peptonada 0,1% e diluições seriadas foram preparadas até concentração de 10^{-5} . Em meio ágar extrato de malte (1,5%, pH 5,8) contendo cloranfenicol (100 mg/L), realizou-se semeadura em superfície de 0,1 mL das diluições em duplicata. A contagem total de fungos e leveduras foi realizada após 5 dias de incubação a 25°C (SILVA et al., 1997).

(a.1) Isolamento e identificação de fungos filamentosos: as colônias foram repicadas em meio ágar *Sabouraud* inclinado e permaneceram incubadas por 14 dias em estufa a 25 °C. Após a incubação foi efetuado o microcultivo em lâmina, visando a identificação do gênero através da observação das características micromorfológicas das cepas conforme Riddel (1950), e também através dos critérios taxonômicos descritos por Raper e Fennel (1965), Pitt (1979) e Barnett (1986).

(a.2) Determinação do potencial toxigênico das cepas isoladas: para Aflatoxinas e ocratoxina A – as cepas de *Aspergillus* spp e *Penicillium* spp. foram inoculadas em ágar coco por 7 dias a 25°C para determinação de aflatoxinas e ocratoxina A, conforme Lin e Dianese (1976) e Cruz *et al.* (1992), respectivamente. Alíquota de 10 g deste meio de cultura foi transferida para bécker contendo 30 mL de clorofórmio. A mistura foi macerada, filtrada em papel filtro e o filtrado evaporado em banho-maria, e concentrado em nitrogênio. O extrato seco foi solubilizado em clorofórmio e a identificação realizada em cromatografia em camada delgada cromatografia conforme Gimeno (1980).

Fumonisinas – da cepa de *Fusarium* spp. cultivada em meio *Ágar sabouraud* foram obtidas suspensões de esporos de 1 mL e inoculadas em: 50 g arroz (isento de fumonisin)as), acrescido de 50 mL de água destilada, autoclavados durante 60 minutos a 121°C. Após a inoculação, as culturas foram incubadas por 15 dias à temperatura ambiente em ausência de luz. Ao término desse procedimento, a amostra foi submetida à análise de fumonisin)as (B₁ e B₂) conforme método 995.15 da AOAC (2000).

(b) Determinação do conteúdo de umidade: realizado conforme método AOAC (2000), em triplicata.

(c) Análise de micotoxinas

(c.1) Análise de fumonisin)as B₁ e B₂: foi empregado o método 995.15 da AOAC (2000). A metodologia empregada utiliza metanol - água (CH₃OH-H₂O/3:1) como solvente de extração. A limpeza do extrato foi realizada em colunas de extração em fase sólida (SAX Stata®). A derivatização do extrato foi procedida com OPA (o-ftaldialdeído) e detecção em CLAE.

(c.1.1) Recuperação, repetibilidade e limites de detecção: vários aspectos com relação a técnica analítica foram avaliados, incluindo a recuperação de cada fumonisin)as individualmente, a linearidade da curva padrão, o limite de detecção do método e a repetibilidade da técnica. Para a recuperação, 50 g da amostra de erva mate, livre de fumonisin)as, foram contaminadas com 2 µg/g dos padrões de FB₁ e FB₂. A linearidade

da curva padrão foi determinada pela análise cromatográfica de padrões diluídos em concentrações decrescentes e submetidos a reação com o-ftaldialdeído. O limite de detecção do método foi definido como a concentração das fumonisinas B₁ e B₂ presentes na amostra que originou um pico com uma área de 1×10^5 mV. Esta área foi escolhida por ser a menor que permitia visualização inequívoca do pico. A repetibilidade do método foi avaliada calculando-se o desvio padrão relativo (RSD) do resultado da análise de 5 amostras de erva-mate contaminadas artificialmente com 2 µg/g de FB₁ e FB₂.

(c.2) Análise de aflatoxinas e ocratoxina A

As determinação de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂, e Ocratoxina A, foram realizadas conforme metodologia descrita por Soares e Rodriguez-Amaya (1989). Foram utilizadas 50 g de cada amostra, extraídas com 270 mL de metanol e 30 mL de cloreto de potássio 4 %. As amostras foram misturadas por 5 min em velocidade moderada, filtradas e 150 mL do filtrado foi coletado e adicionado 150 mL de sulfato de amônio 30 % e 50 mL de celite, agitado moderadamente e filtrado. O filtrado foi recuperado novamente até 150 mL e transferido para funil de separação e as toxinas foram extraídas com 10 mL de clorofórmio por 3 vezes. Os extratos clorofórmicos foram submetidos a evaporação do solvente em banho de 60°C até próximo a secura. Os extratos foram ressuspensos em 200 µL de benzeno/acetoneitrila (98 + 2, v/v) e imediatamente submetidos a cromatografia em camada delgada. A eluição foi feita em cuba insaturada com o sistema de solventes: tolueno - acetato de etila - ácido fórmico (60 + 40 + 0,5). Sob luz ultravioleta de comprimento de onda longo ($\lambda = 366 \text{ nm}$) e a

determinação feita através da comparação com os padrões de AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂ e OTA, preparados conforme Scott 1990).

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da contagem total de fungos filamentosos e leveduras são apresentados na Tabela 1. A média das amostras foi de 1×10^5 UFC/g, e das amostras analisadas, 28,57% apresentaram contagem igual ou superior a 10^3 UFC/g, considerado insatisfatório, conforme legislação (BRASIL, 2001). As marcas que apresentaram problemas quanto ao número máximo de UFC/g, são comercializadas no Norte (2) e Sul (2) de Santa Catarina (SC) e provenientes dos Estados do Paraná (PR)(2), Rio Grande do Sul (RS)(1) e Santa Catarina (1).

Tabela 1 – Contagem total de fungos filamentosos e leveduras (UFC/g) das amostras de erva-mate adquiridas em estabelecimentos comerciais no período de novembro/2003 a janeiro/2004 em Santa Catarina.

Marca	Estado	de Região	de Fungos*	Leveduras*	Fungos + Leveduras*
	procedência	comercialização			
I	SC	Oeste	$2,7 \pm 0,2 \times 10^2$	< 10	10^2
II	SC	Oeste	$1,3 \pm 0,6 \times 10^2$	< 10	$1,3 \pm 0,58 \times 10^2$
III	PR	Oeste	$2,3 \pm 0,6 \times 10^2$	< 10	$2,3 \pm 0,58 \times 10^2$
IV	SC	Oeste	$2,7 \pm 2,0 \times 10^2$	< 10	$2,7 \pm 2,00 \times 10^2$
V	SC	Serrana	$1,3 \pm 0,6 \times 10^2$	$7,3 \pm 10,0 \times 10^1$	$2,0 \pm 1,0 \times 10^2$
VI	SC	Serrana	$7,3 \pm 10,0 \times 10^1$	$1,0 \pm 0,95 \times 10^2$	$1,7 \pm 0,58 \times 10^2$
VII	SC	Serrana	$7,0 \pm 5,2 \times 10^1$	$4,0 \pm 5,2 \times 10^1$	$1,0 \pm 0,95 \times 10^2$
VIII	SC	Serrana	$4,0 \pm 5,2 \times 10^1$	< 10	$4,0 \pm 5,2 \times 10^1$
IX	PR	Norte	$7,3 \pm 11 \times 10^4$	$4,0 \pm 5,2 \times 10^1$	$4,0 \pm 5,2 \times 10^4$
X	SC	Norte	$3,7 \pm 0,58 \times 10^2$	$1,73 \pm 2,8 \times 10^2$	$5,33 \pm 3,2 \times 10^2$
XI	PR	Norte	$2,7 \pm 0,58 \times 10^4$	$3,7 \pm 5,4 \times 10^2$	$2,7 \pm 0,58 \times 10^4$
XII	RS	Sul	$3,7 \pm 5,5 \times 10^2$	$4,0 \pm 5,2 \times 10^1$	$4,0 \pm 5,2 \times 10^2$
XIII	RS	Sul	$4,0 \pm 5,3 \times 10^3$	$9,4 \pm 5,6 \times 10^5$	$9,4 \pm 5,5 \times 10^5$
XIV	SC	Sul	$7,0 \pm 5,2 \times 10^1$	$8,0 \pm 7,2 \times 10^5$	$8,0 \pm 7,8 \times 10^5$
Total:		Média	$7,6 \times 10^3$	$1,2 \times 10^5$	$1,0 \times 10^5$

* Média de 3 amostras, em duplicata \pm desvio padrão

A média da contaminação por leveduras foi superior à de fungos filamentosos e a presença das leveduras pode influenciar no crescimento de fungos toxigênicos e a síntese de micotoxinas (BULLERMAN e OLIVIGNI, 1974). Segundo Taniwaki e Silva

(2001), há evidências de que toxinas são produzidas em menor quantidade quando os fungos toxigênicos crescem em presença de outros microrganismos.

Todas as marcas apresentaram valores inferiores ao máximo de 10 % exigido pela legislação (BRASIL, 2002) para o conteúdo de umidade. A umidade média foi de $6,56 \pm 0,40$ %, mínimo de 5,96% e máximo de 7,03 %. O aumento do teor de umidade pode ser verificado com o tempo de armazenamento do produto, contudo esse período foi inferior a 3 meses, ou seja o prazo de validade estipulado pela maioria dos fabricantes de erva-mate do Brasil. A secagem homogênea e eficiente, diminui a atividade de água da erva-mate ocasionando a redução da proliferação de microrganismos. Esse mecanismo de controle aliado a adequadas condições de armazenamento, aumentam a vida de prateleira da erva-mate e minimizam a produção de micotoxinas.

Foram isolados 9 diferentes gêneros de fungos filamentosos contaminantes na erva-mate (Tabela 2), com uma predominância do gênero *Aspergillus* (90,62%), devido a alta contaminação em duas marcas, coletas no Norte de SC e provenientes do PR. Asco-deuteromicetos (*Aspergillus* 90,62 %, *Penicillium* 0,77 % e *Fusarium* 0,05%), totalizaram 91,44 % das cepas isoladas. A classe dos zigomicetos (*Rhizopus* e *Mucor*), contaminantes comuns do solo, representaram apenas 4,83 % do total. Os outros gêneros encontrados, *Alternaria*, *Paecilomyces*, *Helminthosporium* e *Botrytis*, representaram 2,95 %.

Tabela 2 - Fungos isolados das amostras de erva-mate adquiridas em estabelecimentos comerciais no período de novembro/2003 a janeiro/2004 em Santa Catarina

Gênero	Marcas														Total		
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	Incidên- -cia *	Nº	(%)
<i>Aspergillus</i>	01	-	04	28	05	01	02	01	1112	27	661	24	-	09	12/14	1875	90,62
<i>Mucor</i>	08	07	06	-	02	01	02	-	-	-	-	-	43	-	07/14	69	3,33
<i>Alternaria</i>	-	-	01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	43	-	02/14	44	2,13
<i>Rhizopus</i>	14	05	10	-	02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	04/14	31	1,50
<i>Penicillium</i>	03	-	01	03	01	03	-	-	-	02	-	01	02	-	08/14	16	0,77
<i>Paecilomyces</i>	01	04	01	03	01	-	-	01	-	-	-	-	-	-	06/14	11	0,53
<i>Helminthosporium</i>	-	01	-	01	-	-	-	01	-	01	-	-	-	-	05/14	04	0,19
<i>Botrytis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	02	-	-	-	-	01/14	02	0,10
<i>Fusarium</i>	01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	01/14	01	0,05
Não esporulado	-	02	07	01	-	-	01	-	-	-	-	03	-	2	09/14	16	0,77
Total	28	19	30	36	11	05	05	03	1112	32	661	28	88	11	-	2069	30

* Incidência: representa o número de marcas em que o gênero foi identificado

Tonon e Marucci (1995) observaram uma maior ocorrência (68,75%) de fungos da classe dos Zygomycetos comparada aos 31,25 % da classe Asco-Deuteromicetos, isolados em erva-mate argentina que sofreu processo de armazenamento por 9 meses.

Das 1892 cepas de fungos possivelmente toxigênicos isoladas (*Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*), apenas 1,79 % resultaram produtoras das toxinas analisadas (Tabela 3) Sendo que das cepas de *Aspergillus*, apenas 1,28% apresentaram a capacidade de sintetizar uma ou mais aflatoxinas, 0,11% ocratoxina A e 50 % das 16 cepas de *Penicillium*, produziram ocratoxina A. A cepa de *Fusarium* não apresentou potencial toxigênico para a produção de fumonisinas.

Tabela 3 – Potencial toxigênico das cepas isoladas de erva mate comercializada em Santa Catarina.

Gênero	Cepas isoladas	Potencial toxigênico para						Total	
		Aflatoxinas		Ocratoxina A		Fumonisinias		Nº	(%)
		Nº	(%)	Nº	(%)	Nº	(%)		
<i>Aspergillus</i>	1875	24	1,28	02	0,11	-	-	26	1,39
<i>Penicillium</i>	16	-	-	08	50	-	-	08	50
<i>Fusarium</i>	01	-	-	-	-	-	-	-	-
Total	1892	24	1,28	10	52,28	-	-	34	1,79

Estes resultados indicam que a ocorrência de fungos do gênero *Aspergillus* é alta, em erva-mate, entretanto a produção de micotoxinas depende de condições favoráveis que permitam sua produção.

A recuperação do método foi de 93 a 96 % para FB₁ e de 69 a 85 %, para FB₂. As curvas padrão para FB₁ e FB₂ foram lineares de 20 a 1000 ng/g e de 40 a 10000 ng/g, respectivamente. O coeficiente de variação linear foi de $r = 0,9982$ para FB₁ e $0,9994$ para FB₂. Os limites de detecção do método foram de 20 e 40 ng/g para FB₁ e FB₂, respectivamente. A repetibilidade do método mostrou-se adequada com os desvios padrão relativos (RSD) de 0,6 % para FB₁ e 2,2 % para FB₂.

Valores de 91 a 101 % de recuperação foram encontrados para as aflatoxinas e de 89 a 92 % para a Ocratoxina A.

Mesmo sendo as micotoxinas comuns nos mais variados substratos, nenhuma das micotoxinas analisadas foi detectada nas amostras de erva-mate. Em estudos semelhantes, Tonon e Marucci (1995) e Figel et al. (2003), também não detectaram aflatoxinas em erva-mate, apesar da presença de cepas aflatoxigênicas. Noll e colaboradores (2000) também não detectaram micotoxinas em amostras de erva-mate

analisadas, porém no mesmo estudo foi verificada a redução da velocidade de crescimento de uma cepa de *Penicillium*, quando em presença de extrato fenólico extraído da erva-mate.

A composição química da erva-mate não constitui um meio ideal ao desenvolvimento microbiano e produção de micotoxinas, devido a presença de substâncias inibidoras como a cafeína, compostos fenólicos, principalmente os taninos (HASAN, 1999), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, advindos do processo de branqueamento (sapeco) da erva-mate (DE CAMARGO e TOLEDO, 2002). O baixo conteúdo da erva-mate em elementos essenciais como metais, hidratos de carbono e substância nitrogenadas ativadoras do metabolismo secundário, responsáveis pela produção de micotoxinas, minimizam ou impedem a síntese de micotoxinas (DUTTON, 1988).

3.5 CONCLUSÕES

Os resultados das análises demonstraram haver problemas quanto a contaminação micológica de 4 entre 14 marcas analisadas e segundo a legislação brasileira vigente da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, são consideradas insatisfatórias e não poderiam ser comercializadas. O percentual de cepas toxigênicas encontrado foi muito baixo, principalmente de cepas aflatoxigênicas, entretanto as cepas ocratoxigênicas representaram 50 % das cepas de *Penicillium* isoladas.

De acordo com a literatura disponível, os fungos do gênero *Aspergillus* spp, *Penicillium* spp e *Fusarium* spp são facilmente encontrados no Brasil, devido às condições propícias para a sua proliferação. A contaminação fúngica da erva-mate não representa riscos à população quando métodos eficientes de controle são utilizados, principalmente na secagem e no armazenamento do produto.

A presença de aflatoxinas (B₁, B₂, G₁ e G₂), ocratoxina A e fumonisinas (B₁, B₂), não foi detectada em nenhuma das amostras de erva-mate analisadas, mesmo com a presença de fungos toxigênicos produtores das aflatoxinas e ocratoxina A.

A presença de fumonisinas não foi detectada em nenhuma das quarenta e duas amostras na erva-mate analisadas e apenas uma cepa de *Fusarium* spp. foi encontrada no material amostrado, mesmo assim, esta não demonstrou potencial toxigênico para a produção de fumonisinas (B₁ e B₂).

3.6 BIBLIOGRAFIA

AOAC INTERNATIONAL **Official Methods of Analysis of AOAC International**, 17 ed, cap. 49, p. 44-46, Gaithersburg, M.D., 2000.

BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. New York: Macmillan Publishing Company, 1986. 218 p.

BITTENCOURT, C.A.F.; OLIVEIRA, P.; CORRÊA, B. Mycotoxin occurrence in corn meal and flour traded in São Paulo, Brazil. **Food Control**, v. 16, p. 117-120, 2003.

BRASIL. Resolução RDC ANVISA/MS n.º 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre os Padrões Microbiológicos para Alimentos. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 10 jan 2001. Seção I.

BRASIL. Resolução RDC ANVISA/MS n.º 302, de 07 de novembro de 2002. Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de erva-mate. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 08 nov 2002. Seção I.

BULLERMAN, L.B.; OLIVIGNI, J.F. Mycotoxin producing potential of moulds isolated from cheddar cheese. **Journal of Food Science**, v.39, p. 1166-1168, 1974.

CRUZ, L.C.H.; DE CAMPOS, S.G.; ROSA, C.A.R. Aplicação do ágar-coco como meio diferencial para o isolamento de fungos citrinogênicos. **Arquivo da Universidade Federal do Rio de Janeiro**, Itaguaí, v.15, n.1, p.61-64, 1992.

DE CAMARGO, M.C.R; TOLEDO, M.C. Chá-mate e café como fontes de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) na dieta da população de Campinas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 22, n.1, 2002.

DUTTON, M.F. Enzymes and Aflatoxin Biosynthesis. **Microbiological Reviews**, v.52, n2, p. 274-295, 1988.

FIGEL, I.C.; AMARAL, M.T.; KATAOKA, C.E.; YAMADA, M.P.A.; FERREIRA, J.L; ROCHA, A.P.P.; ROSSO, M.L.; NASCIMENTO, H.H.C. **Ocorrência de fungos filamentosos em erva mate comercializada no Estado do Paraná**. In: XXII Congresso Brasileiro de Microbiologia. Florianópolis, Brasil: Sociedade Brasileira de Microbiologia, nov. 2003.

GIMENO, A. Improved method for thin layer chromatographic analysis of mycotoxins. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists** v. 63, n.2, p 182-186, 1980.

HANSAN, H.A.H. Role of caffeine and tannin in anti-tocigenic properties of coffee and tee. **Mycological**, v. 20, n. 1, p. 17-21, 1999.

INCA -INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Coordenação de Programa de Controle de Câncer – Pro-Onco. **Estimativa de Incidência e Mortalidade por Câncer no Brasil 1999**. Rio de Janeiro, 1999.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Produção da extração vegetal e da silvicultura 2001**. Rio de Janeiro, v.16, p. 114-117.

LIN, M.T.; DIANESE, J. C. **A coconut – agar medium for rapid detection of aflatoxin production by *Aspergillus* sp.** *Phytopathology*, v. 66, p.1466-1469, 1976.

MOSS, M.O. The environmental factors controlling mycotoxin formation. In: SMITH, J.F.; HENDERSON, R.S. (Eds.). **Mycotoxins and animal foods**. Boca Raton: CRC Press, 1991, p. 37-56.

NOLL, I.B.; BORTOLATO, D.S; NUNES, I.L; CARVALHO, H.H.C.; HERMANN, G.; BADIALE-FURLONG, E. **Determinação de micotoxinas, mofo e leveduras e a relação com os compostos fenólicos em erva-mate**. In: III Congresso Latinoamericano de Micotoxinas. Córdoba, Argentina: Sociedad Latinoamericana de Micotoxicologia, nov., 2000.

OLIVEIRA, Y. M. M.; ROTTA, E. Área de distribuição natural de erva-mate. Seminário sobre Atualidades e Perspectivas Florestais. Silvicultura da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.), 1983. **Anais...**, Curitiba: EMBRAPA-CNPQ, p. 17-36, 1985.

PITT, J.I. **The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Taloromyces***. London: Academic Press, 1979, 634 p.

PITT, J.I. Toxigenic fungi and mycotoxins. **British Medical Bulletin**, v.56, n.1, p.184-192, 2000.

RAPER, K. B.; FENNEL, D. I. **The genus *Aspergillus***. Baltimore: The William & Wilkins Company, 1965.

REGINATTO, F.H.; GOSMANN, A.G.; SCHENKEL, E.P. Methylxanthines accumulation in *Ilex* species - Caffeine and theobromine in erva-mate (*Ilex paraguariensis*) and other *Ilex* species. **Journal of Brazilian Chemistry Society**, v. 10, n.6, p.443-446, 1999.

RIDDELL, R. W. Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture. **Mycologia**, v. 42, p.265-270, 1950.

SCOTT, P.M. Natural poisons. In K. JELRICH (Ed.). **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**, 15 ed, Arlington: AOAC, p.1184-1213, 1990.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F. **Manual de Métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Varela, 1997, 295 p.

SOARES, L.M.V.; RODRIGUES-AMAYA, D.B. Survey of aflatoxins, ochratoxin A., Zearalenone and sterigmatocystin in some Brazilian foods by using multi-toxin thin layer chromatographic method. **Journal of the Association of Analytical Chemists**, v.72, n.1, p. 22-26, 1989.

TANIWAKI, M.H.; DA SILVA, N. **Fungos em alimentos: Ocorrência e detecção**. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 2001, p. 63-64.

TONON, S.A.; MARUCCI, R.S. Flora fungica contaminante de yerba mate estacionada. **Alimentacion Latinoamericana**, Buenos Aires, n. 206. p. 23-32, 1995.

VISCONTI, A.; DOKO, M.B.; BOTTALICO, C.; SCHURER, B.; BOENKE, A. Stability of fumonisins (FB₁ and FB₂) in solution. **Food Additives and Contaminants**, v.11, n.4, p.427-431, 1994