

## IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE *Aspergillus* DA SEÇÃO *Circundati* E *Penicillium* spp. ASSOCIADOS A GRÃOS DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.) SEPARADOS EM PENEIRAS<sup>1</sup>

NASSER, P.P.<sup>1</sup>; CHALFOUN, S.M.<sup>2</sup>; BATISTA, L.R.<sup>3</sup> e MERCER, J.R.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Pós-Graduanda do DCA/UFLA, <sup>2</sup> EPAMIG/CTSM/EcoCentro, Lavras-MG; <sup>3</sup> Bolsista CBP&D/Café.

**RESUMO:** Com o objetivo de identificar e quantificar espécies de *Aspergillus* da seção *Circundati* e *Penicillium* spp. presentes em amostras de grãos de café beneficiados separados em peneiras. Os grãos foram plaqueados antes e após desinfecção superficial. Cinquenta e cinco isolados de *Aspergillus* da seção *Circundati* e três de *Penicillium* spp. foram isolados e identificados, sendo encontradas três espécies diferentes (*Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus sulphureus* e *Aspergillus sclerotiorum*) da seção *Circundati* e uma espécie de *Penicillium* (*P. brevecompactum*). A seleção dos grãos em diferentes peneiras mostrou-se eficaz na redução de alguns fatores negativos para a qualidade do café, incluindo características de segurança expressa através da redução dos índices de ocorrência (IO) e severidade de contaminação (ISC) dos fungos.

**Palavras-chave:** *Aspergillus*, *Penicillium*, qualidade, peneiras.

## IDENTIFICATION AND QUANTIFICATION OF *Aspergillus* SPECIES *Circundati* SECTION AND *Penicillium* spp. ASSOCIATED TO IN SIEVES SEPARATED COFFEE BEANS (*Coffea arabica* L.)

**ABSTRACT:** The objectives of this study was to determine and quantificate the possible existence of *Aspergillus* section *Circundati*, and *Penicillium* spp. species present in coffee beans samples that were previously separated by size according to different sieves. The sampled beans were plated before and after been superficially disinfect. There after, fifty five isolates of *Aspergillus* section *Circundati* were obtained showing three distincts species. *Aspergillus ochraceus*, *A. sulphureus*, *A. sclerotiorum*, and three isolates of *Penicillium* spp., with only one isolated and identified specie: *P. brevecompactum*. The results obtained in this work lead to a conclusion that the selection made by size of beans are remarkable efficient in the reduction of some negative factors for coffee quality including safety characteristics, caused by this molds, as indicated by the low Occurrence Index (OI) and of Contamination Severity Index (CSI).

**Key words:** *Aspergillus*; *Penicillium*; quality; sieves.

## INTRODUÇÃO

É de conhecimento secular que a atividade de fungos ocasiona alterações na qualidade dos alimentos. Às vezes essas mudanças são desejáveis, mas em maior quantidade elas provocam alterações indesejáveis, como no caso do café, produzindo sabores e aromas desagradáveis, causados por diferentes graus de deterioração. As espécies de maior expressão associadas a grãos de café incluem os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* (Mislivec, Bruce e Gibson, 1983). O presente estudo teve como objetivo identificar e quantificar a população fúngica de *Aspergillus* da seção *Circundati* e *Penicillium* spp. associados a grãos de café beneficiados separados em peneiras.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas amostras procedentes de: Campanha (Região Sul de Minas Gerais); Blend do Sul de Minas (Oliveira, Três Pontas, Campanha e São Sebastião do Paraíso) e Blend da Zona da Mata (Matipó, Manhumirim, Manhuaçu e Caratinga). Foram obtidas as seguintes peneiras: peneira 17 acima; peneira 14/16; peneira 13 acima (Sul de Minas); “Bica corrida” (Campanha e Blend da Zona da Mata); e “Quebra”.

Plaqueamento dos grãos - Para o estudo dos fungos foi utilizada a técnica Blotter Test (Tempe, 1963). Este procedimento foi feito com e sem desinfecção dos grãos.

Isolamento e Identificação dos Fungos - As observações referentes aos grãos colonizados por fungos foram realizadas a olho nu e, em casos de dúvida, com auxílio de microscópio estereoscópico. Os resultados foram expressos em Índice de Severidade de Contaminação (ISC), por meio de notas representadas pela percentagem da área do grão colonizada pelos fungos. Os fungos foram isolados diretamente dos grãos com base na cor das colônias. As espécies da seção *Circundati* foram identificadas de acordo com Christensen (1981) e Klich e Pitt (1988) e as espécies de *Penicillium* spp., de acordo com Pitt (1988) e Pitt e Hocking (1997). Após a exteriorização dos fungos de cada amostra foi realizada a leitura em cada grão, registrando-se os índices de ocorrência e de severidade da contaminação de cada fungo. O índice de ocorrência se refere à presença ou não do fungo nos grãos, dada em percentagem. A severidade da infestação se refere à área da superfície do grão ocupada por colônias do fungo e foi

determinada utilizando-se a escala de Prabhu e Bedendo (1988); foi calculado o índice de severidade de contaminação pela seguinte fórmula:  $ISC = \sum (N * IO) * \text{Nota máxima}$ .

Análise Estatística – (IO) e (ISC): O delineamento estatístico utilizado foi inteiramente casualizado, com parcela subdividida no espaço " Split-plot in space". As análises de variância realizadas levaram em consideração como fator principal o local de amostragem, formada por três níveis: Zona da Mata (1), Campanha (2) e Sul de Minas (3) e como fator secundário o tamanho de peneiras: Quebra (1) Bica Corrida ou 13 acima (no caso do blend oriundo do Sul de Minas) (2), 14/16 (3) e 17 acima (4), com três repetições. As análises estatísticas foram determinadas pelo programa Sisvar versão 4.4 (Build 34). Como não foi observada normalidade nos dados de IO e ISC, optou-se pela transformação destes, segundo a seguinte equação em que ocorreu melhor ajuste na homogeneidade de variância:  $Y_{ijk} = \sqrt{(Y_{ijk} - 0,5)}$ , sendo:  $Y_{ijk}$ : a observação referente ao local i, à peneira j e à repetição k; Procedeu-se à análise de variância para ambos os caracteres, utilizando o modelo estatístico descrito a seguir, considerando todos os componentes do modelo como aleatórios, exceto a média experimental. Na tentativa de isolar o efeito da interação entre tratamentos secundários e repetição do resíduo b, foi utilizada uma modificação no modelo sugerido por Steel & Torrie (1980):

$Y_{ijk} = \mu + l_i + e_{a(ik)} + p_j + (lp)_{ij} + (pr)_{jk} + e_{b(ijk)}$  em que:  $Y_{ijk}$ : é a observação referente ao local i, à peneira j e à repetição k;  $\mu$ : é a média geral do experimento;  $l_i$ : é o efeito do fator principal, ou local i (sendo  $i = 1, 2$  e  $3$ ); erro  $a_{(ik)}$ : é o erro experimental das repetições k ao fator principal – local i;  $p_j$ : é o efeito da peneira j (sendo  $j = 1, 2, 3$  e  $4$ );  $(lp)_{ij}$ : é o efeito da interação da peneira j com o local i;  $(pr)_{jk}$ : é o efeito da interação da peneira j com a repetição k; erro  $b_{(ijk)}$ : é o erro experimental total desconsiderando o erro a, sendo erro  $a_{(ik)} (0, \sigma^2)$ .

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Identificação: De cada procedência examinaram-se quatro amostras com três repetições com e sem desinfecção, perfazendo um total de 1.080 grãos. Das amostras analisadas antes da desinfecção, todas apresentaram contaminações com fungos *Aspergillus* da seção *Circundati* e apenas uma amostra do tratamento "Quebra" da Zona da Mata estava contaminada com fungo do gênero *Penicillium*. Das amostras analisadas após desinfecção, nenhuma estava contaminada com fungos *Aspergillus* da seção *Circundati* e apenas uma estava contaminada com fungo do gênero *Penicillium*. Os resultados, conforme apresentados na Tabela 1, mostram que dos 58 isolados identificados 34 foram *Aspergillus sulphureus*; 18

*Aspergillus ochraceus*; 3 *Aspergillus sclerotiorum*, todos detectados em grãos antes da desinfecção; e 3 *Penicillium brevecompactum*, sendo um destes encontrado após desinfecção.

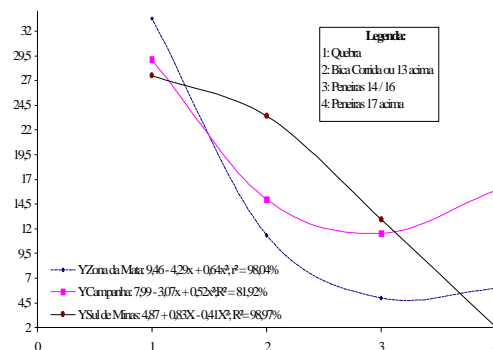
**Tabela 1** - Resultados de *Aspergillus* da seção *Circundati* e *Penicillium* spp. isolados e identificados de grãos de café separados em peneiras

Amostras	Rep.	Tratamento	Número de isolados			
			<i>Aspergillus ochraceus</i>	<i>Aspergillus sulphureus</i>	<i>Aspergillus sclerotiorum</i>	<i>Penicillium brevecompactum</i>
Sul de Minas Quebra	3	Sem Desinfec.	4	6	---	---
		Com Desinfec.	---	---	---	---
Sul de Minas 13 acima	3	Sem Desinfec.	3	3	---	---
		Com Desinfec.	---	---	---	---
Sul de Minas 14/16	3	Sem Desinfec.	2	2	---	---
		Com Desinfec.	---	---	---	---
Sul de Minas 17 acima	3	Sem Desinfec.	3	---	---	---
		Com Desinfec.	---	---	---	---
Zona da Mata Quebra	3	Sem Desinfec.	---	5	2	2
		Com Desinfec.	---	---	---	1
Zona da Mata BC	3	Sem Desinfec.	---	4	1	---
		Com Desinfec.	---	---	---	---
Zona da Mata 14/16	3	Sem Desinfec.	---	2	---	---
		Com Desinfec.	---	---	---	---
Zona da Mata 17 acima	3	Sem Desinfec.	---	2	---	---
		Com Desinfec.	---	---	---	---
Campanha Quebra	3	Sem Desinfec.	2	5	---	---
		Com Desinfec.	---	---	---	---
Campanha BC	3	Sem Desinfec.	2	2	---	---
		Com Desinfec.	---	---	---	---
Campanha 14/16	3	Sem Desinfec.	1	2	---	---
		Com Desinfec.	---	---	---	---
Campanha 17 acima	3	Sem Desinfec.	1	1	---	---
		Com Desinfec.	---	---	---	---

Analisando os tratamentos (diferentes peneiras) de acordo com a procedência, verificou-se que os tratamentos constituídos do Blend do Sul de Minas se mostraram contaminados com fungos *Aspergillus ochraceus* e *Aspergillus sulphureus*. Os tratamentos de Campanha (município da região do Sul de Minas) também se mostraram contaminados por esses mesmos fungos. Já os tratamentos da Zona da Mata diferiram em relação às espécies encontradas, mostrando-se contaminados com os fungos *Aspergillus sclerotiorum*, *Penicillium brevecompactum* e *Aspergillus sulphureus*; nenhum *Aspergillus ochraceus* foi detectado nestas amostras. Esses resultados indicaram influência regional sobre a diversidade da microbiota associada aos grãos beneficiados, provavelmente devido a diferenças climáticas entre as regiões, conforme demonstrado em pesquisas anteriores (Carvalho et al., 1997). Observa-se ainda

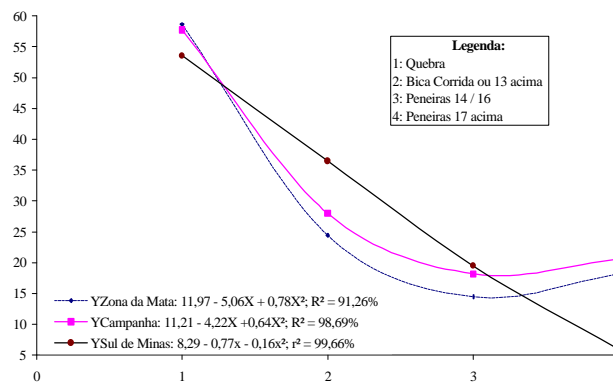
tendência geral de os tratamentos em que se realizou a separação dos grãos através da classificação em peneiras apresentarem menor número de isolados dos fungos identificados, o que era previsível, uma vez que nas parcelas "Quebra" e "Bica Corrida" encontra-se uma maior quantidade de grãos com defeitos e nos quais existe maior probabilidade de ocorrência de fungos. Com relação ao número de isolados observados em cada tratamento com e sem desinfecção, observa-se que, de maneira geral, a desinfecção reduziu o número de isolados obtidos, indicando que no momento da análise estes fungos localizavam-se superficialmente nos grãos.

Quantificação - (IO) - A análise da variância dos índices de ocorrência e comparação de médias provenientes das amostras dos diferentes tamanhos de peneiras de grão oriundas das 3 localidades encontram-se apresentadas nas tabela 1 e 2. Observa-se que somente ocorreu diferença significativa ( $P < 0,01$ ) entre os tamanhos de peneiras, indicando que os fungos se manifestavam diferenciadamente entre os tamanhos de grãos. Observa-se, pela Tabela 3, que a porcentagem de ocorrência dos fungos não variou estatisticamente conforme a localidade; no entanto, pode ser observado que as amostras oriundas do município de Campanha mostraram tendência em ser as mais contaminadas, visto que elas tiveram média de índice de ocorrência 11,1% superior ao dos outros locais. O tamanho de peneira, independentemente do local, como já mencionado, afetou a manifestação de ocorrência dos fungos, constatando-se que os tamanhos 14/16 e 17 acima sofreram os menores índices de severidade de contaminação, diferindo das médias obtidas com os tratamentos "Bica Corrida" ou 13 acima e a "Quebra". Com relação à análise de regressão realizada para a interação entre local x peneira, observa-se, na Figura 1, que realmente o tipo de tratamento mais propenso ao ataque por fungos foi a "Quebra", e, à medida que os grãos foram selecionados em peneiras, isso incidência sofria decréscimo significativo.



**Figura 1** - Representação das médias ajustadas obtidas a partir da análise de regressão do desdobramento da interação locais x tamanho de peneiras, para os dados de índice de ocorrência (IO).

Índice de severidade de contaminação - A comparação de médias de índice de ocorrência e índice de severidade de contaminação está apresentada na Tabela 2 . Embora a precisão experimental dentro de local tenha sido relativamente melhor do que a obtida para o caráter IO (CV = 44,32%), verificou-se que a maioria das fontes de variação foi não-significativa. Detectou-se diferença significativa apenas em peneiras (P 0,05), novamente não sendo detectada qualquer significância para a interação peneira x local. Quanto às diferenças observadas para tamanho de peneira, foi notado que somente houve diferença significativa pelo teste Scott-Knott para a média da peneira “Quebra”, apresentando severidade superior em 52,13, 68,44 e 80,74%, respectivamente, às observadas para as peneiras “Bica corrida” ou 13 acima, 14/16 e 17 acima. Os resultados obtidos, de acordo com a análise de regressão, encontram-se representados na Figura 2. Esses resultados novamente demonstraram a elevada correlação existente entre seleção por peneiras (tratamentos 17 acima, 14/16 e “Bica Corrida” ou 13 acima) e índice de severidade de contaminação por fungos, a exemplo do que ocorreu com o índice de ocorrência.



**Figura 2** - Representação das médias ajustadas obtidas a partir da análise de regressão do desdobramento da interação locais x tamanho de peneiras, para os dados de índice de severidade de contaminação (ISC).

**Tabela 2** - Média geral observada para o caráter (IO) e (ISC), para os três locais e para os quatro tamanhos de peneiras

	IO		ISC	
	Média Locais			
Zona da Mata	26,75	<i>a</i> <sup>1</sup>	11,98	<i>a</i>
Campanha	29,47	<i>a</i>	17,30	<i>a</i>
Sul de Minas	25,66	<i>a</i>	14,41	<i>a</i>
	Média Peneiras			
Quebra	53,62	<i>a</i>	29,31	<i>a</i>
Bica corrida ou >13	29,37	<i>b</i>	14,03	<i>b</i>
14/16	13,68	<i>c</i>	9,25	<i>b</i>
17 acima	12,43	<i>c</i>	5,65	<i>b</i>

<sup>1</sup>Médias seguidas pela mesma letra minúscula na vertical não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

## CONCLUSÕES

Os tratamentos que não são separados em peneiras com “Bica Corrida” e aqueles que constituem o resíduo da separação em peneiras (“Quebra”), por conterem grãos danificados, são muito mais suscetíveis à invasão por fungos. Entre os fungos isolados, identificados e quantificados, verificou-se a presença dos fungos *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus sulphureus* e *Aspergillus sclerotiorum* (seção *Circundati*) e *Penicillium brevecompactum*. A seleção dos grãos em peneiras mostrou-se eficaz na redução (ISC) e (IO).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CARVALHO, V.D. de; CHAGAS, S.J. de R.; CHALFOUN, S.M. Fatores que afetam a qualidade do café. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.18, n.187, p.5-20, 1997.
- CHRISTENSEN, M.A Synoptic key and evaluation of Species in the *Aspergillus flavus* group. **Mycologia**, New York, v.73, n.6, p.1056-1084, Nov./Dec. 1981.
- KLICH, M.A.; PITT, J.I. Differentiation of *Aspergillus flavus* from *Aspergillus parasiticus* and other closely related species. **Transaction British Mycological Society**, Cambridge, v.94. n.1, p.99-108, 1988.
- MISLIVEC, P.B.; BRUCE, V.R.; GIBSON, R. Incidence of Toxigenic and other molds in green coffee beans. **Journal of Food Protection**. Des Moines,
- PITT, J.I. **A Laboratory guide to common *Penicillium* species**. North Ryde, 1988. p.187
- PITT, J.I.; HOCKING, A.D. **Fungi and food spoilage**. 2.ed. Cambridge: Chapman & Hall, 1997.
- PRABHU, A.S.; BEDENDO, I.P. Glume blight of rice in Brazil: etiology, varietal reaction and loss estimates. **Tropical Pest Management, London**, v.34, n.1, p. 85-88, Jan./Mar. 1988.
- STEEL, R.G.D.; TORRIE, J.H. Principles and procedures of statistics. 2ed. Nova York, McGraw Hill, 1980. 633p. v. 46, n.11, p.969-973, Nov. 1983.
- TEMPE, J. The blotter method for seed health testing. **Proceeding International of the Testing Association**, Copenhagen, v. 28, n. 1, p.133-151, Jan.1963.