

49024
MFN 34296

CRISTINA FERREIRA SILVA

**DIVERSIDADE MICROBIANA EM GRÃOS DE CAFÉ (*Coffea arabica*
L.) PROCESSADOS POR VIA SECA NAS FASES PRÉ E PÓS-
COLHEITA.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, área de concentração em Microbiologia dos Alimentos, para obtenção do título de "Mestre".

Orientador
Profa. Dr^a. Rosane Freitas Schwan

LAVRAS
MINAS GERAIS- BRASIL
2000

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Silva, Cristina Ferreira

Diversidade microbiana em grãos de café (*Coffea arabica* L.) processados por via seca nas fases pré e pós-colheita / Cristina Ferreira Silva. -- Lavras : UFLA, 2000.

105 p. : il.

Orientadora: Rosane Freitas Schwan.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Café. 2. Incidência microbiana. 3. Bactéria. 4. Levedura. 5. Fungo filamentosos. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-633.736
-663.93

CRISTINA FERREIRA SILVA

**DIVERSIDADE MICROBIANA EM GRÃOS DE CAFÉ (*Coffea arabica*
L.) PROCESSADOS POR VIA SECA NAS FASES PRÉ E PÓS-
COLHEITA.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, área de concentração em Microbiologia dos Alimentos, para obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 25 de fevereiro de 2000

Prof. Eustáquio Souza Dias UFLA

Prof. Hilário Antônio de Castro UFLA


Prof. Dr.^a Rosane Freitas Schwan
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS- BRASIL
2000

**AOS MEUS PAIS PAULO E FÁTIMA; CELINA E ROGÉRIO
AOS MEUS IRMÃOS CHRIS E PÊ
À MINHA FAMÍLIA
AOS MEUS AMIGOS
AO MEU NAMORADO**

DEDICO

AGRADECIMENTOS

É neste momento que posso expressar minha gratidão àquelas pessoas que efetivamente participaram do meu trabalho e da minha vida.

Agradeço a DEUS por tantos privilégios e força. “TUDO POSSO NAQUELE QUE ME FORTALECE” (Filipenses 4:13).

Aos meus pais, Paulo e Fátima; Celina e Rogério, pelo apoio incondicional. Obrigada por confiarem em mim.

Agradeço aos meus irmãos, Chris e Pê. Chris, obrigada pelas orações e por ser simplesmente minha irmã. A você, João Pedro, por me deixar mais “corajenta”.

Como agradecer às orações da vó Paula? Ao ânimo e incentivo dos meus tios, primos e meu cunhado? Obrigada por serem minha família.

Como agradecer à professora Rosane, que mais do que uma orientadora foi uma verdadeira amiga? Minha amiga que me deu muito trabalho, mas em nenhum momento me desamparou. Muito obrigado, de coração!!

Agradeço ao meu “Co”, Eustáquio, por ter colocado tantas pulgas atrás da minha orelha. “Brigadão”.

Agradeço ao Dr. Alan Wheals pela ajuda incomparável na interpretação dos dados. Dr. Alan, thank you very much!

É difícil ter palavras para agradecer ao meu amigo Newton. Com certeza nossa amizade superará as curvas padrões. Newton, meu muitíssimo obrigada. Valeu amigo!

É impossível agradecer o bem querer da Cidinha, Kátia, Dani, “Cráudia”, Romilda, Leticia e Méia. Queridas, obrigada pela amizade e apoio.

Agradeço à minha família lavrense, Kelly Cris e Rafael, Debby e Mariana, Elis e Margô. Obrigada, meninas, por me ensinarem tanto. Amo vocês!

Luis, obrigada por fazer parte e estar na minha vida. Amo você...

Agradeço a Millena, André (TG), Charles, Dani, Carol 1 e 2, Elenir e Edilson, pela ajuda neste trabalho, e a todos meus amigos do laboratório de Microbiologia- DBI.

Ao professor Romildo pela agradável convivência no DBI.

Agradeço ao Professor Ludwig (DFP), Eduardo Alves, e ao meu amigo Renil pela incomparável ajuda na caracterização e identificação dos fungos filamentosos, e ao amigo José Renato pela ajuda e paciência.

Muito obrigado aos amigos do DCA, Ivana, Beto, Flavinha e a todos os demais, cujos nomes é impossível de se exibir aqui.

Muito obrigado aos produtores de café da região do Sul de Minas Gerais por terem gentilmente cedido o material essencial para este trabalho.

Muito obrigado a Tina e Sandra. Valeu a ajuda nas análises químicas.

Agradeço sobremaneira ao prof. Eduardo Bearzotti pela ajuda preciosa na análise estatística.

Agradeço aos professores e funcionários do Departamento de Ciências dos Alimentos, principalmente à professora Eliana, professor Luís Carlos, professora Vânia- Déa , Seu Piano e Andréia.

Muito obrigado aos funcionários da BC, PRPG e APG.

Obrigado Dona Ironдина e Rosângela, por contribuírem para a minha boa integridade física, e a todos os funcionários e professores do DBI.

Agradeço aos meus amigos do Correio e àqueles do Telecurso 2000.

Agradeço o apoio financeiro cedido pela CAPES.

ABSTRACT

SILVA, C.F. **Microbial diversity in grains of coffee processed by dry method in the phases pre and post harvest** Lavras: UFLA, 2000. 113 p.
(Dissertation- Master's degree in Food Science)

The magnitude and diversity of the microbial population associated with dry processing of coffee (*Coffea arabica*) has been sampled during a two year period on fifteen different farms in the Sul de Minas region of Brazil. The microbial load varied from 3×10^4 to 2.2×10^9 CFU / bean. At all stages, bacteria were the most abundant group, on average, then filamentous fungi and finally yeasts. Counts of bacteria, yeasts and fungi varied considerably between farms and at different stages of maturation and processing on any one farm. Yeasts showed an increase during the fermentation process. Median counts were not significantly different for fungi, yeasts and bacteria between the two years although Gram negative bacteria dominated in a wet year and Gram positive bacteria dominated in a dry year. A total of 612 isolates were identified to at least genus level comprising 41 genera and 61 different species. The 113 isolates of Gram-negative bacteria included 15 genera and 25 species, the most common of which were members of the genera *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Enterobacter* and *Serratia*. Half of the 23 isolates of Gram-positive, spore-forming bacteria were identified into 6 *Bacillus* species. Of the 118 Gram positive non-spore-formers, over half were *Cellulomonas* with lesser numbers of *Arthrobacter*, *Microbacterium*, *Brochothrix*, *Dermabacter* and *Lactobacillus*. The 90 yeast isolates included 12 genera and 23 different species and almost all were fermentative. In incidence, the most common genera were *Pichia*, *Candida*, *Arxula* and *Saccharomycopsis*. There were many rarely described yeasts including *Pichia lynferdii* and *Arxula adenivorans*. Almost all 292 fungal isolates were identified to either genus or species level. *Cladosporium*, *Fusarium* and *Penicillium* each comprised about one third of the isolates and were found on all farms. Only 3% of the isolates were *Aspergillus* and *Beauveria*, *Monilia* and *Arthrotrichum* species were also occasionally found. The microbial flora is much more varied and complex than previously reported for wet fermentations. The genera and species identified includes members known to have all types of pectinase and cellulase activities. Variation between farms, between different stages and in microbial flora revealed some minor patterns of succession.

Guidance Committee: Ds. Rosane Freitas Schwan (UFLA)
Ds. Eustáquio Souza Dias (UFLA)

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
CAPÍTULO 1.....	01
1 Introdução geral.....	01
2- Referencial teórico.....	03
2.1 Espécie de cultivo.....	04
2.2 Tratos culturais.....	06
2.3 Condições climáticas.....	07
2.4 Processamento do café: fermentação e secagem.....	08
2.4.1 Microbiota da fermentação do café.....	11
2.5 Armazenamento, torração, moagem.....	19
2.6 Classificação da bebida do café.....	20
2.7 Composição química dos grãos de café de bebidas de qualidade inferior.....	23
2.8 Enzimas do café.....	24
2.8.1 Polifenoloxidase.....	25
2.8.2 Pectinases.....	26
2.8.3 Celulases e xilanases.....	28
3 Referências Bibliográficas.....	31
CAPÍTULO 2: Incidência de microrganismos em grãos de café (<i>Coffea arabica</i>) em diferentes estádios de maturação.....	42
Resumo.....	42
Abstract.....	43
1 Introdução.....	44

2 Material e Métodos.....	47
2.1 Material.....	47
2.2 Contagem e isolamento de microrganismos.....	50
2.3 Determinação da atividade de polifenoloxidase.....	51
3 Resultados e Discussão.....	52
4 Conclusões.....	66
5 Referências Bibliográficas.....	67
CAPÍTULO 3: Identificação e caracterização de bactérias, leveduras e fungos filamentosos isolados de grãos de café da região Sul de Minas Gerais- Brasil.....	
	71
Resumo.....	71
Abstract.....	72
1 Introdução.....	73
2 Material e Métodos.....	75
2.1 Isolamento e conservação dos microrganismos.....	75
2.2 Identificação de bactérias.....	75
2.2.1 Identificação de bactérias Gram negativas.....	76
2.2.2 Identificação de bactérias Gram positivas.....	77
2.3 Identificação de fungos leveduriformes.....	78
2.4 Identificação de fungos filamentosos.....	79
2.4.1 Identificação de fungos filamentosos do gênero <i>Penicillium</i> Link.....	79
2.4.2 Identificação de fungos filamentosos do gênero <i>Fusarium</i> Link.....	80
2.4.3 Identificação de fungos filamentosos do gênero <i>Aspergillus</i> Fr: Fr.....	81
3 Resultados e Discussão.....	82
3.1 Espécies bacterianas Gram negativas.....	83

3.2 Espécies bacterianas Gram positivas.....	86
3.3 Espécies de fungos leveduriformes.....	87
3.4 Espécies de fungos filamentosos.....	90
4 Conclusões.....	98
5 Referências Bibliográficas.....	99
ANEXOS.....	103

RESUMO

SILVA, C.F. **Diversidade microbiana em grãos de café processados por via seca nas fases pré e pós- colheita.** Lavras: UFLA, 2000. 113p. (Dissertação-Mestrado em Ciência dos Alimentos).

A magnitude e diversidade da população microbiana, associadas ao processo seco de café (*Coffea arabica*), foram analisadas durante dois anos em quinze fazendas diferentes do Sul de Minas Gerais. A carga microbiana variou de 3×10^4 a 2.2×10^9 CFU / grão. Em todas as fases, bactérias foram o grupo mais abundante, seguido de fungos filamentosos e finalmente leveduras. Contagem de bactérias, leveduras e fungos variaram consideravelmente entre fazendas e em diferentes fases de maturação e processamento, em todas as fazendas. Leveduras mostraram um aumento durante o processo de fermentação. A contagem não foi significativamente diferentes para fungos, leveduras e bactérias entre os dois anos, embora bactérias Gram negativas tenham dominado no ano de 1997 e bactérias Gram positivas tenham dominado no ano de 1998. Um total de 612 isolados foram identificados pelo menos quanto ao gênero (41) e 61 espécies diferentes. Os 113 isolados de bactérias Gram -negativas incluíram 15 gêneros e 25 espécies, sendo as mais comuns *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Enterobacter* e *Serratia*. A metade dos 23 isolados de bactérias Gram -positivas esporuladas foi identificada em 6 espécies de *Bacillus*. Das 118 bactérias Gram positivas não esporuladas, a mais comum foi *Cellulomonas*, e as menos incidentes foram *Arthrobacter*, *Microbacterium*, *Brochothrix*, *Dermabacter* e *Lactobacillus*. As 90 leveduras identificadas incluíram-se em 12 gêneros e 23 espécies diferentes, e quase todas eram fermentativas. Em incidência, os gêneros mais comuns foram *Pichia*, *Candida*, *Arxula* e *Saccharomycopsis*. *Pichia lynferdii* e *Arxula adenivorans* são raramente descritas na literatura. Quase todos 292 isolados fúngicos foram identificados quanto ao gênero ou quanto a espécie. *Cladosporium*, *Fusarium* e *Penicillium* representaram três terços do total dos isolados e foram encontrados em todas as fazendas. Só 3% do isolados foram *Aspergillus* e ocasionalmente *Beauvaria*, *Monilia* e *Arthrobotrys*. A flora microbiana é variada e muito mais complexa que previamente descrita em processamento úmido. Alguns dos gêneros e espécies identificados são capazes de apresentar atividade pectinolítica e celulolítica. Variações entre fazendas, entre diferentes fases de processamento e a flora microbiana, revelaram alguns padrões secundários de sucessão.

Comitê Orientador: Dr^a Rosane Freitas Schwan - UFLA (Orientadora)
Dr. Eustáquio Souza Dias - UFLA (Coorientador)

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO GERAL

As populações microbianas desenvolvem-se em vários habitats, interagindo e modificando aspectos químicos e físicos do ambiente. Neste, podem colonizar vários substratos, modificando-os através da excreção de seus produtos metabólicos.

Os grãos de café (casca, polpa e semente) servem de substrato para o desenvolvimento de bactérias, leveduras e fungos filamentosos, suprindo-os de fontes de carbono e nitrogênio por apresentarem celulose, hemicelulose, pectinas, açúcares redutores, sacarose, amido, óleos, proteínas, ácidos e cafeína.

A biodiversidade microbiana presente nos grãos de café depende de fatores ambientais da região de cultivo, como umidade, temperatura, época do ano, população do solo e variedade do café cultivado.

A presença de microrganismos durante o processamento dos grãos de café parece ser um dos fatores que colaboram para o detrimento da qualidade da bebida e por isso deve ser estudada e compreendido o papel que cada grupo microbiano exerce na fermentação do café.

As contaminações microbianas são geralmente favorecidas pela falta de cuidado durante as operações agrícolas. Estas contaminações podem comprometer a qualidade do produto final, principalmente em situações como a secagem desuniforme dos grãos de café, grãos colhidos do chão ou grãos que permanecem sob chuva durante o processo de secagem.

A qualidade de produtos alimentares é de difícil definição, mas o produto deve ter boa aparência, sabor, aroma, alto valor nutricional e ser seguro

do ponto de vista toxicológico. O café é um dos poucos produtos agrícolas que recebe valor comercial não somente pela especulação do mercado, como também de acordo com a qualidade da bebida produzida. De acordo com a legislação vigente do Ministério da Agricultura e Reforma Agrária, cafés classificados como estritamente mole ou mole possuem valor agregado 30 % a mais que cafés classificados como duro, rio ou riado.

Atualmente, o Brasil é o principal país produtor e exportador de café, seguido por países da África, Colômbia e países da América Central. No entanto, o produto brasileiro sofreu queda nas exportações, entre 1961 e 1995, devido à crescente demanda por cafés especiais de bebida superior pelos países importadores, Estados Unidos, Alemanha, Itália, Japão e França.

Minas Gerais é o principal Estado produtor de café do Brasil. Dos 853 municípios do Estado, 590 são produtores de café, com 65.560 propriedades envolvidas no processo produtivo, a maioria concentrada na região Sul de Minas.

A cafeicultura para o país, para o Estado de Minas Gerais, e em especial para a região Sul de Minas Gerais, possibilita a geração de empregos e arrecadações de impostos importantes para a economia local por contribuir com 35 % da exportação mundial. Para que haja a continuidade de lavouras cafeeiras, é necessário produzir e produzir bem, o que significa aumentar produtividade e melhorar a qualidade.

A fim de se analisar a influência microbiana na qualidade da bebida do café produzido, a proposta deste trabalho foi de avaliar a biodiversidade e caracterizar a população microbiana em grãos de café em quatro estádios de amadurecimento e processamento, em lavouras da região Sul de Minas Gerais, Brasil.

quantidades de ácidos não voláteis, trigonelina e cafeína. Diferenças genéticas, tempo de colheita, grau de maturidade dos frutos e localização geográfica podem alterar a composição química dos grãos (Jones e Jones, 1984).

2.2 Tratos culturais

A composição química dos grãos e qualidade da bebida de café podem ser influenciadas pela adubação de nitrogênio, fósforo, potássio, ferro, magnésio e matéria orgânica (Amorim et al., 1965; Amorim et al., 1967; Amorim, 1968; Amorim et al., 1973)

Amorim et al. (1965) acreditavam que o tipo de processamento dos grãos de café interferia na composição mineral do grão, ou seja, cafés secos inteiros manteriam o nível de adubação feita no solo, enquanto cafés processados por via úmida proporcionariam maior lixiviação dos compostos da adubação. No entanto, estes mesmos autores observaram, posteriormente, que não houve perdas nutricionais, principalmente de K, no processamento por via seca ou úmida (Amorim et al., 1967).

Os níveis de nitrogênio estão diretamente relacionados aos de potássio e fósforo, sendo maiores no grão quando há adubação potássica e na polpa, quando ocorre a adubação fosfatada (Amorim et al., 1973). A adubação fosfatada incrementou a qualidade da bebida, principalmente com a presença de magnésio, que possibilitou aumento da absorção de fósforo (Amorim et al., 1965). Entretanto, em experimento realizado por Blore (1965), os resultados indicaram que a adubação potássica prejudica a qualidade, mas pode ser controlada com aplicação de magnésio. O mesmo efeito depreciativo pôde ser observado com a adubação nitrogenada (Amorim et al., 1967). Adubação com matéria orgânica não apresentou efeito significativo sobre a qualidade da bebida (Amorim et al., 1967). Outra observação feita por Amorim et al. (1967) e

(Carvalho, Chagas e Chalfoun, 1997). No entanto, Menon (1989) afirmou que, na Índia, cafés robusta processados por via úmida oferecem bebidas de melhor qualidade que em outros países que utilizam esta cultivar. Cafés robustas são usados, nas indústrias de café, em misturas na produção de cafés solúveis, devido ao maior teor de solúveis (Sivetz e Desrosier, 1979).

A polpa de café é o primeiro produto que se obtém no processamento (por via úmida) e representa cerca de 29% do peso seco do fruto inteiro, sendo composta de 76% de água, 10% de proteína, 21% de fibras, 8% de cinzas e 4% de extrato livre de nitrogênio, os quais são representados por taninos, substâncias pécticas, açúcares redutores (glicose) e não redutores, cafeína, ácido clorogênico e ácido caféico, celulose, hemicelulose, lignina, aminoácidos (geralmente não enxofrados) e minerais como potássio, cálcio, ferro, sódio, magnésio e outros. Estes valores podem variar de acordo com a variedade de café, localidade e práticas agrícolas (Elias, 1978).

A mucilagem dos grãos de café está localizada entre a polpa e o pergaminho do grão e representa 5 % do peso seco. A mucilagem é um sistema de hidrogel composto de água, ácido péctico com pequenas quantidades de arabinose, galactose, xilose e ramnose (Amorim e Amorim, 1977), açúcares redutores e ácidos orgânicos (Elias, 1978). A mucilagem também apresenta enzimas hidrolíticas e oxidativas como as pectinesterases, poligalacturonases, α galacturonases, peroxidases e polifenoloxidasas (Wong, 1995; Amorim e Amorim, 1977; Amorim e Melo, 1991),

O pergaminho envolve a semente do café e representa 12 % do peso seco, sendo composto de 7,6% de água, 92,8% de matéria seca, 0,39% de nitrogênio, 18,9 % de extrato livre de nitrogênio, 150 mg de cálcio e 28 mg de fósforo por grama de peso seco (Elias, 1978).

Os grãos verdes não torrados podem ser compostos de cerca de 60 % de carboidratos, 14 % de proteínas, aproximadamente 13 % de lipídios e pequenas

2 REFERENCIAL TEÓRICO

A cultura do café chegou ao Brasil pelas mãos de Mello Palheta, em 1727, e foi instalada em Belém do Pará (Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 1987). A cafeicultura como atividade econômica existe desde o período colonial, no século XVIII, no Vale do Paraíba, e posteriormente expandiu-se para Oeste do Estado de São Paulo (<http://www.ciagri.usp.br>).

A cultura do café é típica de regiões intertropicais, pois necessita de clima quente e úmido (<http://www.ciagri.usp.br>) e constitui a cultura tropical permanente mais difundida na faixa tropical, que mais riquezas criou e que ainda vem contribuindo, decisivamente, para elevar o nível social de suas populações rurais (Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 1987).

As safras cafeeiras no Brasil representavam, no início do século, 70-80% do café comercializado no mundo. Atualmente, a cultura de café estendeu-se por várias outras regiões do mundo, tendo sido modificado o panorama da economia cafeeira. As produções mundiais cresceram rapidamente e com qualidade em países como Colômbia, México e países da América Central, levando a uma queda de 20 % das exportações brasileiras no período de 1968 a 1993 (Meirelles, 1990 e Chalfoun, 1996).

Países produtores, como a Colômbia, Indonésia e México, visaram a produtividade com qualidade e vêm assumindo o suprimento de café nos países importadores (<http://www.minasmundo.com.br>).

Os cafés podem ser classificados quanto à qualidade, através da análise sensorial (prova de xícara) e determinando-se a atividade de polifenoloxidasas e peroxidases. Ambos permitem que o café seja classificado como estritamente mole, mole, apenas mole, duro, riado e rio zona.

A relação entre qualidade da bebida e atividade enzimática da polifenoloxidase é possível, pois esta enzima entra em contato com seu substrato quando há injúrias nos grãos, provocadas na colheita, processamento, no beneficiamento ou em ataques de insetos, já que enzima e substrato localizam-se celularmente em compartimentos separados (Amorim et al., 1977).

A qualidade final da bebida de café é resultante de fatores como a espécie e variedade de cultivo, tratos culturais (adubação), condições climáticas e, principalmente, cuidado nas operações agrícolas pós-colheita, não podendo ser desconsideradas as etapas de armazenamento, torração, moagem e preparo da infusão (Carvalho, Chagas e Chalfoun, 1997; Puerta, 1998 e Menon, 1989).

2.1 Espécie de cultivo

O aroma característico da bebida de café é manifestado durante a pirólise (torração) por reações químicas sob os precursores de aroma presentes na semente (Amorim et al., 1977). A composição química dos grãos, conteúdo de cafeína, ácidos clorogênico e graxos, trigonelina e outros compostos (Amorim e Amorim, 1977) diferem nas várias espécies cultivadas, como em *Coffea arabica* Linneo e *Coffea canephora* Pierre ex Froehner, sendo estas as duas principais espécies cultivadas (Fazuoli, 1990). Assim, a qualidade da bebida de café é determinada pela composição química dos grãos, que é certamente dependente da extensão das reações catalisadas por enzimas endógenas e exógenas (Amorim e Melo, 1991).

Cafés arábicas possuem um fino aroma e acidez desejável, enquanto cafés robustas apresentam baixa acidez e mais corpo na bebida (Jones e Jones, 1984; Sivetz e Desrosier, 1979 e Puerta, 1998). Söndahl e Corp (1995) inferiram que o café arábica sempre oferece uma boa bebida, enquanto o café robusta produz bebida de qualidade inferior por não apresentar sabor muito agradável

Amorim (1968) foi que a deficiência em ferro no solo do cafeeiro pode acarretar em bebidas inferiores.

2.3 Condições climáticas

Os fatores ambientais, como o clima e tipo de solo, têm grande influência na qualidade da bebida de café. Cortez (1997) e Gomes e Teixeira (1974), em Minas Gerais, observaram a qualidade da bebida em função de regiões ou mesmo de microregiões com condições edafoclimáticas bem diferenciadas. Carvalho e Chalfoun (1985) comentaram que apesar da importância destas variações ambientais, pouco tem sido estudado sobre o mecanismo destes efeitos na qualidade da bebida.

No Estado de Minas Gerais existe uma grande diferença entre a qualidade de cafés produzidos na Zona da Mata, Sul de Minas e na Região do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba. Em estudos mais recentes, Cortez (1993) publicou que em regiões de clima quente e/ou úmido no período da colheita (como na proximidade de represas), os grãos passam rapidamente da fase cereja para passa.

Estas condições permitem que as duas fases iniciais da fermentação dos grãos (acética e láctica) possam evoluir para as duas fases seguintes (propiónica e butírica), que são prejudiciais à bebida, aparecendo o gosto 'rio', comum nos cafés produzidos às margens da Represa de Furnas (Sul de Minas Gerais).

Dentre as regiões mineiras, também é conhecido que a maioria do café produzido na Zona da Mata não é de boa qualidade, devido aos fatores climáticos adversos (Cortez, 1997). Entretanto, nas regiões do Triângulo Mineiro, Alto Paranaíba e Sul de Minas, o café produzido apresenta atributos especiais como "corpo" e acidez, sendo que, nas duas primeiras regiões, apresentam um corpo mais acentuado, enquanto o Sul de Minas sempre se

caracterizou como região produtora de bebida de acidez desejável (Chalfoun, 1996).

Chagas (1994) observou que um dos fatores que faz o Cerrado mineiro despontar como produtor de café de melhor qualidade, e conseqüentemente alcançar melhor preço, é o clima. Na região do Cerrado há chuvas em abundância durante a época da florada, enquanto no período da colheita, que dura em torno de quatro meses, a umidade relativa é baixa, dificultando a contaminação dos frutos pelos microrganismos causadores de fermentações indesejáveis. A importância de um adequado manejo dos frutos após a colheita tem sido enfatizada (Menon, 1989), pois este diminui o crescimento microbiano e, conseqüentemente, as fermentações indesejáveis (Bitancourt, 1957).

2.4 Processamento do café: fermentação e secagem

O estágio do processamento é considerado a fase mais crítica para preservação e incremento da qualidade do café (Menon, 1989 e Valencia, 1973) influenciando diretamente aspecto, qualidade e rendimento (Rena et al., 1986).

Os grãos de café, após colhidos, podem ser processados por via seca (café natural) ou por via úmida (café despulpado), segundo Van Pee e Castelein, 1972; Menchú e Rolz, 1973; Jones e Jones, 1984; Clarke e Macrae, 1987; Puerta, 1996; Chalfoun e Carvalho, 1997; Puerta, 1998 e Brando, 1999. Os fatores que determinam o método a ser usado são governados pela tradição e economia de cada região produtora (Sivetz e Desrosier, 1979).

As operações do processamento dos grãos de café por via úmida incluem a colheita de grãos cereja, lavagem e seleção dos grãos flutuantes (que serão processados separadamente), despulpamento, fermentação ou uso de enzimas ou substâncias químicas para demucilação, lavagem para remoção da mucilagem, secagem, beneficiamento e armazenamento (Jones e Jones, 1984; Clarke e

Macrae, 1987; Chalfoun e Carvalho, 1997). O tempo de fermentação dependerá principalmente da altitude e variedade do café, podendo chegar a 78 h em altas altitudes e 48 h a baixas altitudes para cafés arábicas na Etiópia (Woelore, 1993) e 72 horas para cafés robustas na Índia (Menon, 1989). Esta é a etapa mais crítica do processamento por via úmida (Puerta, 1998).

O processamento por via seca exige menos etapas e normalmente é mais prolongado do que por via úmida (Puerta, 1996). O tempo de secagem é influenciado pela espessura da camada, tempo de movimentação das camadas e principalmente pela condição climática local (Androcioli Filho et al., 1999). Eles trabalharam com duas espessuras de camadas (2 e 6 cm) e movimentação das camadas de 9, 4, 2, 1 vez ao dia e nenhuma movimentação. Observaram que movimentando-se o café 9 vezes ao dia, o tempo de seca foi de 16 e 22 dias para as espessuras de 2 e 6 cm, respectivamente. O tratamento dos grãos sem nenhuma movimentação diária apresentou a maior diferença (10 dias) entre as camadas de 2 e 6 cm. Neste processamento, as etapas seguem a de colheita (não selecionada dos grãos), lavagem ou não dos grãos, secagem em terreiros e/ou secadores, beneficiamento e armazenamento (Jones e Jones, 1984; Clarke e Macrae, 1987; Chalfoun e Carvalho, 1997).

No Brasil, o processamento por via seca é imperativo, ou seja, os grãos são colhidos e secos em côco, em terreiros e/ ou secadores (Menchú e Rolz, 1973; Lacerda et al., 1985; Carvalho e Chalfoun, 1985; Puerta, 1996; Puerta, 1998;). Pelo preparo por via seca, obtêm-se cafés de “terreiro” (Rena et al., 1986; Lacerda et al., 1985; Gomes e Teixeira, 1974), terminologia hoje errônea, pois há uso de secadores ou cafés “não-lavados” e, mais apropriadamente, “café natural” (Brando, 1999). Neste tipo de processamento, a colheita é feita por derriça, portanto, sem seleção prévia dos grãos em diferentes estádios de amadurecimento (Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 1987).

Em países como Guatemala e Colômbia, o processamento faz-se mediante lavagem e fermentação natural dos grãos antes da seca (Calle, 1957; Menchú e Rolz, 1973 e Puerta, 1996). Jones e Jones (1984) e Amorim e Amorim (1977) atribuíram, ao processamento por via úmida, cafés de melhor qualidade, pois para este procedimento, é necessária a colheita selecionada de grãos cereja, possibilitando a demucilação. A melhor qualidade do produto quando processado por via úmida também foi observada por Van Pee e Castelein (1972) em cafés do Congo. A qualidade da bebida é preservada e/ou aumentada por este processamento, havendo cuidados na operação como, por exemplo, rápido despulpamento e controle no tempo da fermentação, evitando fermentações prolongadas e misturas do café fermentado e secagem (Puerta, 1996).

Cafés processados por via seca (café natural) sempre fornecem bebidas de pior qualidade quando comparados aos cafés processados por via úmida (Jones e Jones, 1984), devido a sabores e aromas indesejados provenientes de grãos verdes, não excluídos na coleta, como “flavour” sujo ou gosto de lodo ou terra pela contaminação por organismos do solo presentes pela não lavagem dos grãos (Menon, 1989). A qualidade do café por este processo fica na dependência das condições climáticas locais, no período de colheita e secagem (Lacerda et al., 1985). Na ausência de insolação e alta umidade do ar, os microrganismos têm ambiente propício para seu desenvolvimento, produzindo metabólicos (ácidos butírico e propiônico) que afetam a qualidade do produto final através da difusão destes da polpa para a semente (Carvalho, 1997).

O processamento por via seca favorece a obtenção de cafés com defeito “fermento” porque o café fica em contato por mais tempo com a polpa e mucilagem, por ser uma barreira para perda de umidade dos grãos (Puerta, 1996).

A perda de qualidade por via seca pode ser observada visualmente pela coloração apresentada nos grãos após o beneficiamento. Os grãos que

apresentam coloração amarela originam bebidas de pior qualidade (confirmada pela prova da xícara ou pela atividade da polifenoloxidase), e cafés que originam bebidas de boa qualidade apresentam grãos em tons verde-azulados (Puerta, 1996; Jones e Jones, 1984).

A secagem dos grãos de café é uma operação agrícola comum nos dois tipos de processamento. Cuidados na secagem do café podem melhorar a qualidade (Lacerda Filho, 1986), principalmente em regiões climaticamente adversas que processam os grãos por via seca (Lacerda et al., 1985), devido à presença de microrganismos selvagens no café.

Cuidados nesta fase são exigidos, pois feita a derriça de grãos em vários estádios de amadurecimento, o tempo de secagem dos grãos é diretamente proporcional à umidade. Grãos verdes e cerejas apresentam 50 a 70 % de umidade; passas, de 35 a 50 %; bóia, de 25 a 35 %, e coco, menos de 25 % de umidade (Bártholo e Guimarães, 1997).

Lacerda Filho (1986) publicou novas técnicas de secagem, incluindo a seca no terreiro e em secadores. Melhores resultados na secagem dos grãos foram obtidos iniciando a seca em terreiro e, posteriormente, em secadores (Sivetz e Desrosier, 1979 e Lacerda Filho, 1986). O emprego da secagem artificial elimina ou diminui a influência dos fatores atmosféricos na secagem. Isto permite um melhor controle da uniformidade da umidade (Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 1987), essencial para um bom beneficiamento e armazenamento.

2.4.1 Microbiota da fermentação do café

A flora microbiana do café é bastante variada e sua atuação está diretamente relacionada a alguns sabores e aromas que alteram as características peculiares do produto (Bitancourt, 1957). Bitancourt (1957) analisando cafés em diferentes fases do preparo, no cafezal e no terreiro de secagem, fez diversos

isolamentos e observou que os fungos mais abundantes foram *Colletotrichum gloeosporioides* Penz, *Colletotrichum coffeanum* (Zinn) Noack, *Fusarium* sp. e bolores verdes (*Penicillium* spp.). Também foram identificados: *Aspergillus niger* v. Tiegh, no café seco no terreiro, e *Cladosporium*, que foi encontrado até o estádio seco no pé e não no terreiro durante a secagem, como normalmente ocorre com outros fungos. Ainda neste trabalho, verificou-se que no café seco do terreiro, 55% dos frutos apresentaram leveduras. Agate e Bhat (1966) isolaram leveduras produtoras de pectinases durante a fermentação de café processado via úmida. Encontraram espécies de *Kluyveromyces*, *Saccharomyces* e atribuíram a ação das pectinases na pectina da polpa do café à atividade microbiana leveduriforme. Van Pee e Castellein (1972) também estudaram a microbiota durante o amadurecimento e beneficiamento de café no Congo e encontraram uma flora variada, com grande porcentagem de Enterobacteriaceae e algumas leveduras. Arunga (1982) ressaltou a importância dos microrganismos na fermentação de café e citou que os principais gêneros de microrganismos encontrados por outros pesquisadores foram *Bacillus*, *Erwinia*, *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*. Apesar destes isolamentos já realizados em cafés processados por via úmida, ainda não se conhece o papel de cada tipo de microrganismo que se desenvolve no processo por via úmida ou via seca, em função da complexidade destes tipos de fermentação e a falta de pesquisa na área.

Trabalhos realizados, no Brasil, por Carvalho, Chalfoun e Chagas (1989) e Meirelles (1990) demonstraram uma elevada taxa de contaminação microbiana nos cafés de pior qualidade (rio e riado). Foi também constatado que, nestes cafés, a umidade dos grãos beneficiados se achava em teores superiores a 10%, valor este, segundo Moreau (1979), favorável ao desenvolvimento de *Aspergillus flavus* e *A. niger*, produtores de aflatoxinas. O perigo de contaminação se agrava, uma vez que esta alta umidade do grão favorece o

larvas deixam um orifício, nas paredes dos frutos, através do qual vão penetrar os microrganismos. Estes se nutrem dos restos de açúcares da polpa e provocam uma seca rápida dos frutos, que caem ou permanecem na planta. Os mesmos autores concluíram que o controle de insetos, particularmente da mosca-das-frutas, poderá diminuir a queda dos frutos e a incidência de microrganismos, conseqüentemente, ocorrendo uma melhoria na qualidade do café.

Carvalho e Chalfoun (1985) citam que na produção de café natural (sem despulpamento), o fruto é seco integral. Durante a secagem, a mucilagem é digerida e degradada, constituindo material alimentar para semente, propiciando uma continuação do seu metabolismo e respiração. Estas mudanças químicas modificam o sabor do café, o qual poderá ser prejudicado ou melhorado de acordo com a presença ou ausência de microrganismos contaminantes.

O café despulpado e o café natural estão expostos a uma diversidade de microrganismos, tais como leveduras, fungos filamentosos e bactérias, que encontrando condições favoráveis para desenvolverem, infectam os grãos. Estes microrganismos, em seu desenvolvimento, produzem enzimas que agem sobre os componentes da mucilagem, principalmente os açúcares, fermentando-os e produzindo álcool. Este pode ser desdobrado em ácido acético, láctico, butírico e outros ácidos carboxílicos superiores. Ao se iniciar a produção de ácido butírico e propiônico, começam a haver prejuízos na qualidade do café (Amorim e Amorim, 1977), por este fornecer à bebida de café sabores desagradáveis, como os de cebola (Monaco, 1961). Estes compostos são produzidos em condições favoráveis de anaerobiose quando os grãos são amontoados. Esta produção de ácido butírico talvez esteja mais relacionada com bactérias e leveduras do que com fungos filamentosos que, em geral, são aeróbios (Bitancourt, 1957).

Os principais ácidos presentes no café são o málico e cítrico, que são responsáveis por uma acidez desejável, proporcionando sabor ácido característico e desejável ao produto (Sivetz, 1963).

desenvolvimento destes fungos durante a fase de armazenamento. Partindo-se da hipótese de serem os microrganismos responsáveis pela origem dos cafés duros, Krug (1940a) comparou fungos filamentosos isolados de café cereja, seco no pé e seco no chão, mostrando 0% de fungos para o cereja, 15% para seco no pé e 21% para seco no chão. O mesmo autor verificou, em 1940b, uma relação entre microrganismos e sabor da bebida. Foi observado que os cafés que apresentam qualidade inferior de bebida tinham tido uma colonização microbiana mais intensa. Cafés classificados como mole apresentaram um total de 9,28% de microrganismos, sendo 3,38% de *Fusarium* sp; cafés apenas mole apresentaram um total de 23,40%, sendo 11,04% de *Fusarium* sp; café duro, 44,9%, sendo 23% de *Fusarium* sp, e para cafés rio, um total de 54,50% de microrganismos, sendo 34,5% de *Fusarium* sp.

Carvalho, Chalfoun e Chagas (1989), estudando a relação entre classificação do café pela prova de xícara e composição físico-química, química e microflora presente no grão beneficiado, concluíram que as amostras de café classificadas como de bebida mole e duro apresentaram índices de contaminação de *Fusarium roseum*, *Aspergillus ochraceus* e *Aspergillus flavus* acentuadamente menores que os cafés classificados como de bebida riada e rio. Por outro lado, apresentaram índices igualmente elevados dos fungos *Fusarium* sp e *Penicillium* sp. O fungo do gênero *Cladosporium* predominou nos cafés classificados como de bebida mole e dura.

Segundo Krug (1947) e Bitancourt (1957), as injúrias da película dos frutos, ocasionadas por insetos, particularmente a mosca-das-frutas, possibilitam o acesso de fungos e bactérias. Trabalhos realizados em frutos de diversas fases de maturação demonstraram que as moscas começam sua postura quando os frutos passam de verde para amarelados, e que as larvas atingem o desenvolvimento máximo ao saírem dos frutos, transformando-se, em seguida, em pupas no chão. Quando os frutos estão na fase de cereja, na imigração, as

Um sério problema ligado à secagem de café em terreiros é a contaminação pelos microrganismos. Como a secagem se processa mais lentamente em virtude das camadas do pericarpo do fruto, ele fica úmido por mais tempo, aumentando o período durante o qual os microrganismos podem se desenvolver. Um outro fator que agrava essa situação é que as camadas do pericarpo dos frutos constituem um meio muito mais favorável ao desenvolvimento dos microrganismos do que o pergaminho dos grãos despolidos, devido ao alto conteúdo de açúcares, tornando a proteção do café, contra tal risco, mais difícil.

O grupo de microrganismos mais citado na literatura é o de fungos filamentosos, havendo ainda poucos trabalhos sobre fungos leveduriformes e bactérias.

Os principais gêneros relatados de fungos filamentosos isolados de grãos de café nos diferentes estádios de maturação, processamento e beneficiamento estão listados na Tabela 1.

Vários trabalhos visaram a detecção de micotoxinas em grãos beneficiados de café e relatam as espécies de fungos filamentosos que provavelmente estão relacionados com a produção de substâncias toxinogênicas (Tabela 2).

A presença de leveduras durante o processamento via úmida de café foi constatada por alguns autores (Van Pee e Castelein, 1971; Daivasikamani e Kannan, 1986) em cafés robusta. Entretanto, poucos referem-se à contribuição

TABELA 1 Principais gêneros de fungos filamentosos isolados e identificados em grãos de café em diferentes estádios de maturação, processamento e beneficiamento.

Fungos	País	Referências
<i>Alternaria</i>	Brasil	Mislivec, Bruce e Gibson, 1983
<i>Aspergillus</i>	Brasil; Índia	Bitancourt, 1957; Wosiacki, 1977; Mislivec, Bruce e Gibson, 1983; Daivasikamani e Kanan, 1986; Carvalho, Chalfou e Chagas, 1989; Meirelles, 1990; Amorim e Melo, 1991; Alves, 1996.
<i>Cercospora</i>	Brasil	Alves, 1996
<i>Cladosporium</i>	Brasil; Índia	Bitancourt, 1957; Teixeira et al., 1977; Wosiacki, 1977; Daivasikamani e Kanan, 1986; Carvalho, Chalfoun e Chagas, 1989; Meirelles, 1990; Chalfoun et al., 1992; Alves, 1996.
<i>Colletotrichum</i>	Brasil	Bitancourt, 1957; Teixeira et al., 1977; Wosiacki, 1977
<i>Epicoccum</i>	Brasil	Bitancourt, 1957; Teixeira et al., 1977
<i>Fusarium</i>	Brasil; México	Krug, 1940; Bitancourt, 1957; Gordon, 1960; Teixeira et al., 1977; Wosiacki, 1977; Carvalho, Chalfoun e Chagas, 1989; Meirelles, 1990; Chalfoun et al., 1992; Roussos et al., 1995; Alves, 1996.
<i>Mucor</i>	Brasil; Índia	Daivasikamani e Kanan, 1986; Alves, 1996
<i>Penicillium</i>	Brasil; México; Colômbia	Bitancourt, 1957; Calle, 1957; Wosiacki, 1977; Teixeira et al., 1977; Mislivec, Bruce e Gibson, 1983; Daivasikamani e Kanan, 1986; Carvalho, Chalfoun e Chagas, 1989; Meirelles, 1990; Chalfoun et al., 1992; Roussos, 1995; Alves, 1996
<i>Phoma</i>	Brasil	Alves, 1996
<i>Phomopsis</i>	Brasil	Bitancourt, 1957
<i>Trichoderma</i>	Índia; México	Daivasikamani e Kanan, 1986; Roussos et al., 1995

TABELA 2 Espécies de fungos filamentosos potencialmente toxigênicos.

REFERÊNCIAS	ESPÉCIES
Mislivec, Bruce e Gibson. (1983)	<i>Aspergillus flavus</i> ; <i>A. niger</i> ; <i>A. tamaritii</i> ; <i>A. ochraceus</i> ; <i>A. wentii</i> ; <i>A. versicolor</i> ; <i>Cladosporium herbarum</i> ; <i>F. stilboides</i> ; <i>Penicillium chrysogenum</i> ; <i>P. viridicatum</i> ; <i>P. islandicum</i>
Abdel- Hafez e El Maghraby (1992)	<i>Aspergillus flavus</i> ; <i>A. fumigatus</i> ; <i>A. niger</i> ; <i>A. parasiticus</i> ; <i>A. sydowii</i> ; <i>A. tamaritii</i> ; <i>A. terreus</i> ; <i>Cladosporium cladosporoides</i> ; <i>C. herbarum</i> ; <i>C. macrocarpum</i> ; <i>Fusarium oxysporum</i> ; <i>Penicillium albidum</i> ; <i>P. brevicompactum</i> ; <i>P. chrysogenum</i> ; <i>P. citrinum</i> ; <i>P. cyclopium</i> ; <i>P. funiculosum</i> ; <i>P. jensenii</i>
Liardon, Braendlin e Spadone, 1992	<i>Aspergillus fumigatus</i> ; <i>A. niger</i> ; <i>Fusarium graminearum</i> ; <i>Penicillium granulatum</i>

destes microrganismos na qualidade do café e outros nem mesmo identificaram os isolados quanto à espécie.

Agate e Bhat (1966) isolaram na Índia, leveduras pectinolíticas de cafés robusta e argumentam sobre a ação destas na degradação da mucilagem devido à alta capacidade pectinolíticas de *Saccharomyces marxianus* (*Kluyveromyces marxianus* (EC Hansen) van der Walt, 1971), *S. bayanus*, *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus*. Frank, Lum e Deal Cruz (1965) encontraram, em seus isolados, predomínio de bactérias e poucas leveduras não identificadas, mas acreditaram não serem capazes de degradar a mucilagem dos grãos. Van Pee e Castelein (1971) identificaram leveduras do gênero *Candida*, sendo *C. guilliermondii* var. *membranaefaciens*, na superfície e mucilagem dos grãos; *C. parapsilosis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulopsis famata* (*Candida famata* (Harrison) S.A. Meyer & Yarrow (Yarrow and Meyer 1978)), *Saccharomyces marxianus* (*Kluyveromyces marxianus* (EC Hansen) van der Walt, 1971), *Candida tropicalis*, *Rhodotorula mucilaginosa* e *Candida pelliculosa* na superfície dos grãos. Daivasikamani e Kannan (1986) citaram a ocorrência de leveduras de coloração rosa em cafés robusta até o quinto dia de incubação.

Assim como as leveduras, a flora bacteriana está presente nos grãos de café sem, no entanto, conhecermos sua ação fermentativa na qualidade da bebida de café.

Rose (1982) e Agate e Bhat (1966) afirmam que bactérias predominantes no café são pectinolíticas, Gram negativas, não formadoras de esporos e fermentadoras de lactose. Jones e Jones (1984) argumentam que caracterizar as bactérias predominantes pela fermentação de lactose torna os dados confusos, pois este dissacarídeo não está presente na composição química dos grãos de café.

Agate e Bhat (1966) isolaram bactérias identificadas como *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium* e *Proteus*, mas nenhum estudo com estes isolados foi realizado a fim de se conhecer sua capacidade pectinolítica. Vaughn et al. (1958) isolaram *Erwinia dissolvens* (reclassificada atualmente como *Enterobacter dissolvens* (Rosen) por Brenner et al (1986), segundo The Prokaryotes (Balows et al., 1992)) e demonstraram a capacidade pectinolítica de degradação da mucilagem dos grãos de café por esta bactéria.

Em amostras de café da Colômbia e México, Pederson e Breed (1946) isolaram fungos filamentosos e leveduriformes e bactérias dos tipos cocos e bastonetes microaerofílicos, como *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis* e *Streptococcus faecalis*, as quais estariam atuando na lise da mucilagem, porém não no seu desprendimento.

Variações na microbiota e sua interferência na degradação e qualidade da bebida de café podem estar associadas à composição diferente do mesocarpo (mucilagem). As diferenças no tipo de pectinases produzidas pelos organismos, podem afetar o grau de despolimerização dos componentes da pectina que poderiam, então, influenciar a seleção do grupo de microrganismo dominante (Jones e Jones, 1984).

2.5 Armazenamento, Torração, Moagem

Após beneficiados, os grãos de café podem ser armazenados, na entressafra, em sacos de juta, em galpões arejados e limpos. A umidade ideal de

armazenamento é de 11 a 12 % (Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 1987), a fim de se evitar a proliferação de fungos de armazenamento, como os do gênero *Penicillium* e *Aspergillus* (Christensen e Kaufmann, 1969).

Um dos requisitos para obtenção de uma boa bebida de café é o grau de torração, que pode ser claro, médio ou escuro (Coelho, Pereira e Licciardi, 1999). O grau de torração dependerá do paladar do consumidor. No Brasil, a torração dos grãos é média, a qual acentua o sabor e aroma (Coelho, Pereira e Licciardi, 1999), com moagem fina, permitindo uma maior solubilidade de sólidos, reforçando o sabor do café (Sivetz e Desrosier, 1979). Cafés árabes e turcos também apresentam torração escura e moagem fina, enquanto o preparo de bebida de café na América Latina não apresenta torração escura e nem moagem fina (Sivetz e Desrosier, 1979).

2.6 Classificação da bebida do café

A qualidade do café brasileiro é avaliada principalmente em função de duas classificações: a primeira se baseia nas características físicas, como tipo (Classificação quanto ao tipo nas Tabelas 1A e 2A em anexo), através de seu aspecto de pureza, e a segunda pelo aroma da bebida (Instituto Brasileiro do Café, 1977; Carvalho et al., 1994). Amorim et al. (1977) e Prete (1992) definem a qualidade como sendo o resultado da somatória de atributos físicos do grão cru, como cor, tamanho, densidade, forma e uniformidade; dos atributos do grão torrado, destacando a homogeneidade na cor e cor da película prateada, e das características organolépticas da bebida, expressas pelo gosto e aroma. Na comercialização do café, a qualidade da bebida tem maior peso que os outros atributos, podendo haver uma diferença em torno de 30% no preço entre cafés finos (bebida mole) e os de pior qualidade (bebida rio). A classificação por Tipo é realizada segundo a Tabela Oficial Brasileira de Classificação do Instituto

Brasileiro do Café (1977), enquanto a classificação feita pela “prova da xícara”, que surgiu no Brasil no início do século XX foi adotada pela Bolsa Oficial do Café e Mercadorias de Santos, a partir de 1917.

A classificação da bebida utilizada ainda hoje foi instituída por Garuti e Conagin (1961), na qual foi estabelecida uma escala de valores para avaliação da bebida do café, representada por média de 160 determinações feitas por degustadores previamente selecionados e treinados. Esta classificação separa o café em: ‘estritamente mole’, como bebida de sabor suavíssimo e adocicado; ‘mole’, como bebida de sabor suave acentuado e adocicado; ‘apenas mole’, bebida de sabor suave, porém com leve adstringente e gosto áspero; ‘dura’, bebida com sabor adstringente e gosto áspero; ‘riada’, bebida com leve sabor de iodoformio ou ácido fênico, e ‘rio’, bebida com forte e desagradável sabor, lembrando iodoformio ou ácido fênico.

Fairbanks (1962) citado por Wiesel, J.B.C (1981) afirmou que a classificação por bebida é um trabalho complexo e exige não somente um conhecimento perfeito e grande prática, como também a educação do paladar. Este deverá ser apurado a fim de possibilitar distinguir, com precisão, não apenas as variedades de bebida, mas também aromas, corpo, acidez e adstringência. Esta avaliação deve ser cuidadosa, pois o café é um dos poucos produtos agrícolas que recebe valor comercial equivalente à sua qualidade. Valencia (1973) afirmou que a prova da xícara é uma opinião determinada subjetivamente pela capacidade sensorial do provador, que pode ser deformada e não é apta como padrão de qualidade.

Vários estudos afirmam que a análise de compostos químicos presentes no grão processado estão relacionados com a qualidade da bebida, como a enzima polifenoloxidase. Amorim e colaboradores (1975 ; 1977) relacionaram a baixa atividade da polifenoloxidase em cafés de piores bebidas.

Carvalho et al. (1994) mostraram que o índice de atividade da polifenoloxidase, associado ao índice de coloração, permitem avaliar de modo mais objetivo a qualidade do café, e elaboraram uma tabela para classificação da bebida. A Tabela 3 mostra a relação entre atividade de polifenoloxidase e qualidade da bebida produzida.

TABELA 3 Qualidade da bebida produzida e atividade de Polifenoloxidase (U/ minuto/ g de amostra) em grãos de café.

Classificação pela Prova de Xícara	Atividade de Polifenoloxidase Faixa de Variação
Estritamente Mole	67,66 - 74,66
Mole	64,16 - 67,66
Apenas Mole	62,99 - 66,94
Dura	55,99 - 62,99
Riada	37,33 - 53,66
Rio	36,16 - 47,83

Fonte: Carvalho et al. (1994).

Esta atividade enzimática foi também estudada por Chalfoun (1996), que confirmou ser este um bom parâmetro para avaliação qualitativa do café, pois o menor valor de sua atividade é explicado pelo fato dos cafés que passaram por condições de injúria, seja de origem patológica ou mecânica, apresentarem bebida de pior qualidade. A veracidade da análise da enzima polifenoloxidase sobre a classificação da bebida de café foi confirmada por Pimenta, Chagas e Costa (1997), cuja análise possibilitou a classificação de cafés de “estritamente

mole” a “rio”, enquanto pela análise sensorial, todas as amostras foram julgadas como “bebida dura”.

2.7 Composição química dos grãos de café de bebidas de qualidade inferior

O sabor e aroma característicos de café são formados pela decomposição de substâncias durante o processo de pirólise (torração). Os produtos da torração são açúcares caramelizados, carboidratos, ácido acético e seus homólogos, aldeídos, cetonas, furfural, ésteres, ácidos graxos, aminas, CO₂ e sulfetos (Carvalho, Chagas e Chalfoun, 1997). Estes compostos são provenientes de precursores como trigonelina, sacarose, frutose, glicose, aminoácidos livres e peptídeos e mais de 500 compostos (Jones e Jones, 1984).

Sabe-se, no entanto, que cafés de mesma variedade podem não fornecer o mesma qualidade de bebida devido à má conduta durante e após a colheita, gerando transformações, nos grãos verdes, de natureza enzimática, envolvendo principalmente as polifenoloxidasas, glicosidasas, lipases e proteases (Amorim e Teixeira, 1975).

O grão verde de café que origina bebidas finas pode ser caracterizado da seguinte maneira: coloração verde- azulada (Jones e Jones, 1984) devido à presença do complexo magnésio- ácido clorogênico (Northmore, 1967) ou, como sugere Gibson (1971) ,pela presença de cafestol e “Kahweol”; presença de compostos redutores, principalmente aldeídos (Calle, 1963); pequenas concentrações de acetaldeído (Rodriguez, Franco e Yamamoto, 1969) e alta atividade de polifenoloxidase (Amorim e Silva, 1968; Carvalho, Chagas e Chalfoun, 1997; Pimenta, Chagas e Costa, 1997).

Amorim et al., (1977) pesquisaram as alterações provocadas nos grãos de café que originam bebidas de qualidade inferior e, observaram que a primeira mudança acontece na desorganização das membranas celulares, colocando em

contato compostos antes separado por elas, provocando a descoloração dos grãos (Amorim, Aoki e Costa, 1980).

As características de grãos verdes de café que originaram bebidas inferiores são: paredes celulares mais finas, possibilitando a liberação de voláteis e de compostos que depreciam a qualidade (Amorim et al., 1976); menor densidade dos grãos; maior presença de açúcares redutores; maior concentração de ácido clorogênico (Amorim et al., 1973; Vilas Boas, Pádua e Cravalho, 1999); perda da atividade de peroxidases e polifenoloxidasas (Amorim e Amorim, 1977); menor concentração de lipídios e compostos fênicos nos bordos; maior lixiviação do potássio; decréscimo de material insaponificável (Amorim et al., 1977); maior concentração de proteínas de baixo peso molecular (Amorim e Amorim, 1977; Jones e Jones, 1984).

Em cafés brasileiros, a maior concentração de compostos fenólicos, como o ácido clorogênico, pode ser sugerida pelo ataque intenso do fungo filamentoso do gênero *Fusarium* (Krug, 1940a) que induz a planta a alterar seu metabolismo e produzir compostos de defesa (Uritani, 1961 citado por Amorim et al., 1973).

2.8 Enzimas do café

A presença de enzimas nos grãos de café pode servir como parâmetro para determinação da qualidade da bebida. Outras enzimas, de origem microbiana, podem atuar sobre a mucilagem dos grãos de café degradando-os, podendo favorecer ou prejudicar o processamento e qualidade da bebida. As enzimas polifenoloxidasas (PFO) e peroxidases (PER) são indicadoras de qualidade da bebida de café, e outras enzimas, como pectinases, celulases e xilanase, favorecem a degradação de compostos complexos quimicamente e

importantes no processo fermentativo do café (Amorim e Amorim, 1977; Jones e Jones, 1984).

2.8.1 Polifenoloxidase

A polifenoloxidase (PFO) (1,2- benzenediol: oxigênio oxido redutase; EC 1.10.3.1), também é conhecida como tirosinase, fenolase, catecol oxidase, mono fenol oxidase, cresolase e catecolase. Encontra-se em humanos (no processo de melanização da pele), animais (no processo de esclerotização das cutículas de insetos) e em plantas, nas quais exerce um efeito protetor contra o ataque de insetos e microrganismos (Whitaker, 1995).

Quimicamente, a PFO é uma enzima cúprica que oxida os o-difenóis a quinonas (Amorim e Amorim, 1977 e Whitaker, 1995). Considerada como enzima de membrana, é ativada quando liberada. Trata-se de uma importante enzima na determinação de qualidade e valor econômico de frutos e vegetais estocados e processados (Whitaker, 1995). Sua atividade é reduzida pelo produto formado na sua catálise (Amorim e Amorim, 1977).

Em café, cacau, chá, ameixas, uva seca preta e figo, a ação desta enzima é desejável (Whitaker, 1995), conferindo coloração característica ao produto. Porém, quando alimentos são processados de modo incorreto, a ação enzimática torna o produto rejeitado pelo consumidor. Muitos são os relatos, na literatura, sobre a relação desta enzima com a qualidade da bebida de café (Pimenta et al., 1997; Carvalho, Chagas e Chalfoun, 1997; Amorim e Amorim, 1977; Amorim, Smucher e Pfister, 1976; Amorim e Silva, 1968; Jones e Jones, 1984; Valencia, 1973; Amorim et al., 1977; Draetta e Lima, 1975).

Sabe-se que a PFO pode ser encontrada na parte externa dos grãos, no centro e no embrião (Amorim, Smucher e Pfister, 1976), fora de contato com seu substrato, os compostos fenólicos. Em cafés mal processados, as injúrias

permitem o contato da PFO com compostos fenólicos, como o ácido clorogênico e caféico, oxidando-os. Esta oxidação produz as quinonas, que se ligarão com aminoácidos, produzindo coloração amarronzada na película prateada e no centro do grão (Amorim e Teixeira, 1975).

A atividade de PFO pode ser usada na diferenciação de espécies de café analisando-se as sementes secas. Estudos feitos por Oliveira (1972) mostraram esta correlação. Em *Coffea dewevrei*, a atividade determinada foi de 100 %; em *Coffea canephora* a atividade foi de 58,2 %, em *Coffea liberica*, a atividade foi de 23,5 %, e em *Coffea arabica*, houve atividade entre 10 e 13 %. Neste mesmo trabalho, Oliveira (1972) afirmou que não é possível distinguir variedades de *Coffea arabica* somente pela determinação da atividade de polifenoloxidase, pois os valores encontrados são muito similares.

A classificação da bebida pela PFO permite uma real identificação da qualidade da bebida, permitindo agregar valor ao produto, proporcionalmente à sua qualidade.

Assim como a PFO, a peroxidase também se relaciona com a qualidade da bebida, ou seja, quanto menor sua atividade, pior a qualidade da bebida de café. Oliveira (1972) relatou que só é possível relacionar atividade da peroxidase quando a avaliação é feita comparando-se cafés de pior qualidade com outros. Esta perda de qualidade se dá mediante o esbranquiçamento dos grãos, nos quais a lesão das membranas provocadas por injúrias, seja no processamento ou armazenamento, coloca a peroxidase em contato com o substrato, H_2O_2 (Amorim et al., 1977; Amorim e Melo, 1991).

8.2 Pectinases

A mucilagem dos grãos de café apresenta, em sua composição, pectinas e outros compostos, que podem ser substratos de enzimas da própria mucilagem

ou para ação de enzimas microbianas. A despolimerização da pectina é geralmente associada com o amadurecimento dos frutos (Wong, 1995).

A rápida degradação da mucilagem é importante para a melhoria da qualidade da bebida de café, pois é um meio rico para o desenvolvimento de microrganismos que, através de seus metabólitos, podem depreciar a qualidade da infusão (Carvalho e Chalfoun, 1985). Para tal degradação, é necessária a ação de enzimas pectinolíticas. Jones e Jones (1984) afirmam que as enzimas da mucilagem não são capazes de degradá-la na ausência de microrganismos. O controle da fermentação para degradação da mucilagem, no entanto, não é um procedimento simples, pois fermentações prolongadas deterioram a qualidade da bebida (Jones e Jones, 1984). Boccas et al. (1994) afirmam que algumas indústrias preferem acrescentar aos grãos enzimas pécticas comerciais para hidrólise da mucilagem. Estas enzimas são produzidas em escala industrial por microrganismos selecionados.

Substâncias pécticas são substâncias heterogêneas na estrutura química e tamanho molecular. A estrutura química básica das substâncias pécticas é α -D-galacturonas ou α -D-galacturonoglicanos em cadeias lineares de 1,4- α -D-galactopiranosilurônico. O polímero contém vários graus de esterificação com grupos carboxílicos e metoxilícos (Wong, 1995).

As enzimas pécticas podem ser classificadas de acordo com seu modo de ação, sendo que a poligalacturonase (PG) catalisa a quebra das ligações glicosídicas α 1,4. As exo PG (exo- poli- 1,4 α -D galacturonohidrolase - EC. 3.2.1.67) atacam as porções finais não redutoras, enquanto as endo PG (endo- poli α -D- glicanohidrolase- EC 3.2.1.15) atacam a molécula aleatoriamente; pectinesterase (pectina pectilhidrolase- EC 3.1.1.11) catalisa a desmetoxilação do polímero; a pectato liase (endo e exo -poli 1,4 α -D- galactoronideo liase) catalisa a clivagem de grupos desmetoxilados via β eliminação, e a pectina liase catalisa a clivagem de unidades de galacturonato esterificados (Wong, 1995).

A pectina esterase, PE (EC 3.1.1.11), é a única enzima péctica própria da mucilagem atuando na desmetoxilação do polímero (Elias, 1978). A ação de microrganismos na mucilagem parece ser restrita a bactérias, segundo Jones e Jones (1984), os quais não encontraram isolados fúngicos capazes de produzir pectinases. Entretanto, Boccas et al. (1994) selecionaram espécies de fungos filamentosos super produtores de pectinas para produção em escala industrial a partir da polpa e mucilagem dos grãos de café.

Van Pee e Castelein (1972) observaram que somente *Erwinia dissolvens* (renomeada como *Enterobacter dissolvens* segundo The Prokaryotes, 1992) foi capaz de produzir exo poligalacturonases e nenhuma produção de polimetilgalacturonase e polimetilesterase foi observada. Alguns anos depois, Jones e Jones (1984) também isolaram bactérias que só produziam enzimas que atuavam em pectinas com baixo grau de metoxilação ou em ácidos poligalacturônicos.

Agate e Bhat (1966), trabalhando com cafés robusta na Índia, isolaram espécies de *Saccharomyces* e *Schizosaccharomyces* e afirmaram sobre a ação destas leveduras na degradação da mucilagem, tendo sido identificadas as leveduras altamente pectinolíticas *Saccharomyces marxianus* (renomeada de *Kluyveromyces marxianus* (E.C. Hansen) van der Walt (1971) Kurtzman e Fell, 1998), *S. bayanus*, *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus*.

2.8.3 Celulases e xilanases

A parede celular da casca do fruto de café é composta por celulose e hemicelulose. A celulose é um polímero de glicose com regiões altamente complexas, regiões cristalinas e regiões amorfas. Amplamente encontrada na natureza, sua degradação representa uma perspectiva ecológica, uma aplicação industrial ou uma fonte para crescimento microbiano (Goyal, Gosh e Eveleigh,

1991). Para tal degradação, são necessárias enzimas específicas, como as endoglucanases (1,4- beta- D- glucano 4- glucanohidrolase), celobiohidrolase (1,4- beta- D- glucano celobiohidrolase) e as β glicosidasas (beta -D- glicosídeo glicohidrolase) (Wong, 1995).

É conhecido o alto grau de contaminação dos grãos de café por fungos filamentosos em vários estádios de processamento e beneficiamento, como já foi exposto no item 2.4.2. Para que haja a colonização dos tecidos por estes microrganismos, é necessária a desintegração da parede celular mediante o ataque de celulases e xilanases.

Talvez sejam os fungos filamentosos os principais responsáveis pela degradação da parede celular por produzirem celulases secretadas extracelularmente (Wong, 1995) e disponíveis em grandes quantidades (maior que 20 g/l), como cita Goldman (1988).

Os fungos filamentosos podem secretar todo o sistema celulolítico (endo e exo glucanase glicosidasas), como acontece nas espécies *Trichoderma reesei*, *T. koningii*, *T. viride*, *Fusarium solani*, *Penicillium pinophilum* e *P. funiculosum*. Ao contrário, a maioria das bactérias sintetiza somente endoglucanases e β glicosidasas (Wong, 1995).

A ação das enzimas celulolíticas fúngicas necessita de sinergismo, principalmente entre endo glucanase e celobiohidrolases (Wong, 1995; Goyal, Gosh e Eveleigh, 1991). É neste sinergismo que se alcançará o maior grau de degradação do polímero (Wong, 1995). O ataque inicial do polímero de celulose acontece pela ação das endo glucanases. seguida da ação combinada de endo e celobiohidrolases, com a hidrólise final à glicose mediante a ação das glicosidasas (Goyal, Gosh e Eveleigh, 1991).

As endoglucanases são responsáveis pela clivagem das ligações glicosídicas β 1,4 e atuam em celulose cristalina e em celulosas substituídas, como a carboximetilcelulose. As celobiohidrolases liberam celobiose a partir da

porção final não redutora de celuloses não substituídas. As β glicosidases atuam sobre as celobiose liberando monômeros de glicose (Goldman, 1988; Wong, 1995).

A degradação da porção hemicelulolítica da parede celular fica a cargo de endo β 1,4 xilanase (EC 3.2.1.8), que atua nas ligações β -D-xilanopiranosil da xilana formando xilooligossacarídeos.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-HAFEZ, A.I.I.; EL- MAGHRABY, O.M.O. Fungal flora and aflatoxin associated with cocoa, roasted coffee and tea powders in Egypt. *Cryptogamie, Mycologie*, Paris, v.13, n.1, p.31-45, 1992.

AGATE, A.D.; BHAT, J.V. Role of pectinolytic yeasts in the degradation of mucilage layer of coffee robusta cherries. *Applied Microbiology*, New York, v.14, p. 256-260, Mar. 1966.

ALVES, E. **População fúngica associada ao café (*Coffea arabica* L.) beneficiado e as fases pré e pós colheita- relação com a bebida e local de cultivo.** Lavras: UFLA, 1996. 48 p. (Dissertação - Mestrado em Fitopatologia).

AMORIM, H.V. Estado nutricional do cafeeiro e qualidade da bebida. *Revista de Agricultura*, Piracicaba, v. 43, n.2, p. 93-102, jun. 1968.

XAMORIM, H.V.; AMORIM, V.L. Coffee enzymes and coffee quality. In: ORY, R.L. ; ANGELO, A.J.St. (eds) **Enzymes in food and beverage processing**, Washington: American Chemical Society, 1977. n.47, p. 27-55.

AMORIM, H.V.; AOKI, R.T.; COSTA, J.D. Variação da permeabilidade celular e da coloração do grão de café em função de condições de armazenamento. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEIRAS, 8., 1980, Campos do Jordão. **Resumos...**Rio de Janeiro: IBC/ GERCA, 1980. p. 226.

AMORIM, H.V.; CRUZ, A.R.; ANGELO, A.J.ST.; DIAS, R.M.; MELO, M.; TEIXEIRA, A.A.; GUTIERREZ, L.E. ORY, R.L. Biochemical, physical and organoleptical changes during raw coffee quality deterioration. **ASIC, 8° Colloque**, Abidjan, 1977, p. 183-186.

AMORIM, H.V.; MELLO, M. Significance of enzymes in non alcoholic coffee beverage. In: FOX, P. F. (ed). **Food Enzymology**. Amsterdam: Elsevier, 1991. v. 2, p 189-209.

AMORIM, H.V.; SCOTON, L.C.; CASTILHO, A. de; PIMENTEL GOMES, F.; MALAVOLTA, E. Estudos sobre a alimentação mineral do cafeeiro. XVII. Efeito da adubação NPK na composição química do solo, do fruto, e na qualidade da bebida (nota preliminar) **Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiróz"**, Piracicaba, v. 22, p.140-151, nov.1965.

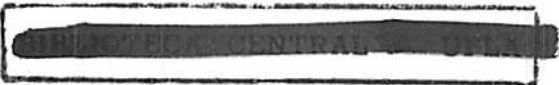
AMORIM, H.V.; SCOTON, L.C.; CASTILHO, A. de; PIMENTEL GOMES, F.; MALAVOLTA, E. Estudos sobre a alimentação mineral do cafeeiro. XXI. Efeito da adubação NPK e orgânica na composição mineral do grão e na qualidade da bebida (2º nota). **Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiróz"** Piracicaba, v. 24, p.215-228, out. 1967.

AMORIM, H.V.; SILVA, D.M. Relação da atividade da polifenoloxidase do grão de *Coffea arabica* L. com a qualidade da bebida. **Boletim Técnico-científico**, Piracicaba, n.31, p. 1-16, 1968.

AMORIM, H.V.; SMUCKER, R.; PFISTER, R. Some physical aspects of Brazilian green coffee beans and the quality of the beverage. **Turrialba**, San José, v.26, n.1, p. 24-27, Jan./Mar. 1976.

AMORIM, H.V.; TEIXEIRA, A.A. Transformações bioquímicas, químicas e físicas do grão de café verde e qualidade da bebida. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEIRAS, 3., 1975, Curitiba. **Resumos...** Rio de Janeiro: MIC/TBC, 1975. p.21-23.

AMORIM, H.V.; TEIXEIRA, A.A.; MORALES, R.S.; REIS, A.J.; PIMENTEL GOMES, F.; MALAVOLTA, E. Estudos sobre a alimentação mineral do cafeeiro XXVII. Efeito da adubação N, P, e K no teor de macro e micro nutrientes do fruto na qualidade da bebida do café. **Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiróz"** Piracicaba, v. 30, p.323-333, dez. 1973.



X ANDROCIOLO FILHO, A.; CARNEIRO FILHO, F.; LIMA, F.B.; SCHOLZ, M.B. dos S.; FERREIRA, D.; BONATTO, L.C.; CARVALHO, M.V.R. de. Influência da espessura de camada e do tempo de movimentação do café no terreiro na duração da secagem e na qualidade do produto. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 25., 1999, Franca. **Trabalhos apresentados...** Rio de Janeiro: MAA/ PROCAFÉ, 1999.p.203

ARUNGA, R.O. Coffee. In: ROSE, A.H. (ed). **Fermented foods: economic microbiology.** Oxford: Academic Press, 1982, v.7, p 259-274.

BALOWS, A.; TRUPER, H.G.; DWORKIN, M.; SCHLEIFER, K.H. (eds). **The prokaryotes.** Berlin: Springer verlag, 1992. 4126 p.

BÁRTHOLO, G.F.; GUIMARÃES, P.T.G. Cuidados na colheita e preparo do café. **Informe Agropecuário,** Belo Horizonte, v.18, n.187, p. 33-42, 1997.

BITANCOURT, A.A. As fermentações e podridões da cereja de café. **Boletim da Superintendência dos Serviços do Café,** São Paulo, v. 32, n.1, p. 7-14, jan. 1957.

BLORE, T.W.D. Some agronomic practices affecting the quality of Kenya Coffee. **Turrialba,** San José, v.15, n.2, p.111-118, Abr./june 1965.

BOCCAS, F.; ROUSSOS, S.; GUTIERREZ, M.; SERRANO, L.; VINIEGRA, G.G. Production of pectinase from coffee pulp in solid state fermentation system: selection of wild fungal isolate of high potency by a simple three-step screening technique. **Journal of Food Science and Technology,** Mysore, v.31, n.1, p.22-26, 1994.

X BRANDO, C.H.J. Cereja descascado, desmucilado, fermentado, despulpado ou lavado? CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 25., 1999, Franca. **Trabalhos apresentados...** Rio de Janeiro: MAA/ PROCAFÉ, 1999. p.342-346.

CALLE V., H. Activadores bioquímicos para la fermentación del café. In :
Seminarios. **Cenicafé**, Chinchiná, v.8, n.3, p. 94-101, mar. 1957.

CALLE, H.V. Reacciones cualitativas en la determinación del aroma del café.
Cenicafé, Chinchiná, v.14, n.3, p. 187-194, jul./set. 1963.

X CARVALHO, V.D. **Cafeicultura empresarial: Produtividade e qualidade**.
Lavras: UFLA- FAEPE, 1997. 73p.

CARVALHO, V.D.; CHAGAS, S.J.R.; CHALFOUN, S.M. Fatores que afetam
a qualidade do café. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.18, n.187,
p. 15-20, 1997.

CARVALHO, V.D.; CHAGAS, S.J.R.; CHALFOUN, S.M.; BOTREL, N.;
JUSTE Jr., E.S.G. Relação entre a composição físico-química e química do
grão de café beneficiado e a qualidade de bebida do café. **Pesquisa
Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.29, n.3, p.449-445, mar. 1994.

CARVALHO, V.D.; CHALFOUN, S.M. Aspectos qualitativos do café.
Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v.11, n.126, p.79-92, jun.1985.

CARVALHO, V.D; CHALFOUN, S.M; CHAGAS, S.J. de R. Relação entre
classificação de café pela bebida e composição físico-química, química e
microflora do grão beneficiado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE
PESQUISAS CAFEIIRAS 15., 1989, Maringá. **Resumos ...** Rio de
Janeiro: MIC/IBC, 1989. p.25-26.

CHAGAS, S.J.R. **Caracterização química e qualitativa de cafés de alguns
municípios das regiões produtoras de Minas Gerais**, Lavras: ESAL,
1994. 83p. (Dissertação- Mestrado em Ciência dos Alimentos).

X CHALFOUN, S.M. **O café (Coffea arabica L.) na região Sul de Minas
Gerais - Relação da qualidade com fatores ambientais, estruturais e
tecnológicos**. Lavras: UFLA, 1996. 125 p (Tese- Doutorado em Fitotecnia).



X CHALFOUN , S.M.; CARVALHO, V.D. de Efeito de microrganismos na qualidade da bebida de café. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.18, n.187, p. 21-26, 1997.

CHALFOUN , S.M.; CARVALHO, V.L de; AZEVEDO, P.J. de; CARVALHO, V.D. de. Efeitos de tratamento com fungicidas, aplicados na fase pré colheita, sobre a qualidade do café. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 18., 1992, Araxá. **Resumos...** Rio de Janeiro: MARA/ PROCAFÉ, 1992. p.63-65.

CHRISTENSEN, C.M.; KAUFMANN, H.H. **Grain storage the role of fungi in quality loss**. Minneapolis, University of Minnesota Press, 1969. 153 p.

X CLARKE, R.J.; MACRAE, R. **Coffee -Technology**. New York: Elsevier Applied Science, 1987. 321 p.

COELHO, K.F.; PEREIRA, R.G.F.A.; LICCIARDI, R. Influência do grau de torração em algumas características químicas do café (*Coffea arabica* L). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 25., 1999, Franca. **Trabalhos apresentados...** Rio de Janeiro: MAA/ PROCAFÉ, 1999. p. 147-148.

CORTEZ, J.G. Aptidão climática para a qualidade da bebida nas principais regiões cafeeiras de Minas Gerais. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 18, n. 187, p. 27-31, 1997.

CORTEZ, J.G. Controle das fermentações de café e qualidade da bebida. In : CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 19., 1993, Três Pontas. **Resumos...** Rio de Janeiro : MARA ,1993. p. 86.

DAIVASIKAMANI, S.; KANNAN, N. Studies on Post- Harvest Mycoflora Of Coffee Cherry Os Robusta. Brief note. **Journal Coffee Research**, Balehonnur, v.16, n.3/4, p.102-106, 1986.

DRAETTA, I. S.; LIMA, D.C. de. Isolamento e caracterização de polifenoloxidase do café. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 3., 1975, Curitiba. Resumos...Rio de Janeiro: MIC/IBC, 1975. p.89

ELIAS, L.G. Composición química de la pulpa de café y otros subproductos. In: BRAHAM, J.E.; BRESSAN, R. (ed). Pulpa de café: [Composición, tecnología y utilización]. Panamá: INCAP, 1978. p.19-29.

FAZUOLI, L.C. Variedade de café. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 16., 1990, Espírito Santo do Pinhal. Anais... São Paulo: Faculdade de Agronomia e Zootecnia "Manoel Carlos Gonçalves", 1990.

FRANK, H.A.; LUM, N.A.; DELA CRUZ, A.S. Bacteria responsible for mucilage layer decomposition in Kona coffee cherries. *Applied Microbiology*, New York, v.13, p. 201-207, 1965.

GARRUTI, R.S.; CONAGIN, A. Escala de valores para avaliação da qualidade de bebida de café. *Bragantia*, Campinas, v. 20, n 18, p.557-562, maio 1961.

GIBSON, A. Photochemical aspects of drying east African Arabica coffees: II. Raw bean colors produced from Kahweol esteres. ASIC Cinquième Colloque International sur la Chimie des cafés- Lisboa, Jun. 1971.

GOLDMAN, G.H. Estudos genéticos e produção de celulase em *Aspergillus niger*. Piracicaba: ESALQ, 1988. 153p. (Dissertação- Mestrado em Agronomia).

X GOMES, F.P.; TEIXEIRA, A.A. Zoneamento do Sul de Minas, por qualidade de bebida de café. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 2., 1974, Poços de Caldas. Resumos... Rio de Janeiro:IBC, 1974. P. 370.

GORDON, W.L. The taxonomy and habitats of *Fusarium* species from tropical and temperate regions. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.38, n.3, p. 643-658, Mar.1960.

GOYAL,A.; GHOSH,B.; EVELEIGH, D. Characteristics of fungal cellulases. **Bioresource Technology**, Kidlington, v. 36, p. 27-50, 1991.

INSTITUTO BRASILEIRO DO CAFÉ. **Cultura do café no Brasil: [manual de recomendações]**. 2 ed. Rio de Janeiro, 1977. p 36.

x INSTITUTO CAMPINEIRO DE ENSINO AGRÍCOLA. **Cultura do café**. Campinas, 1987. 84p

✓ JONES, K.L.; JONES, S.E. Fermentations involved in the production of cocoa, coffee and tea. **Progress Industrial Microbiology**, Amsterdam, v. 19, p.411-56, 1984.

KRUG, H.P. Cafés duros. **Revista do Instituto do Café**, São Paulo, v.25, n.159, p. 636-638, maio 1940a.

KRUG, H.P. Cafés Duros III. Relação entre a porcentagem de microrganismos e qualidade do café. **Revista do Instituto do Café**, São Paulo, v.27, n. 163, p. 1827- 1831, set. 1940b.

KRUG, H.P. Origem dos cafés duros. **Boletim da Agricultura**, São Paulo, v. 46, p. 397-406, 1947.

KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W. (eds). **The yeasts a taxonomic study**, 4 ed., Amsterdam: Elsevier, 1998. 1055 p.

✓ LACERDA, L.A.O.; MIARELLI, M.; DAVOLI, J.Z.; CARVALHO, R. de ; LOPES, I.C.; GUERRA NETO, E.G.; KANASHIRO, J.K.; LUZIN, N.R.; SANTINATO, R.; CORTEZ, J.G.; PAES DE CAMARGO, A.; TEIXEIRA,

A.A. Influência dos sistemas de colheita e preparo, na qualidade do café, nas diferentes regiões cafeeiras do Estado de São Paulo- resultados preliminares. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEIRAS, 12., 1985, Caxambu. **Trabalhos apresentados...** Rio de Janeiro: IBC, 1985. p. 210-214.

LACERDA FILHO, A. F. **Avaliação de diferentes sistemas de secadores e suas influências na qualidade do café (Coffea arabica, L.)**. Viçosa: UFV. 1986. 68p. (Dissertação - Mestrado).

LIARDON, R.; BRAENDLIN, N.; SPADONE, J.C. Biogenesis of Rio flavour impact compound: 2,4,6- trichloroanisole. In: **Quartozieme colloque scientifique international sur le café**. San Francisco, 14-19 Jul. Paris France; Association Scientifique Internationale du Café, 1992.

MEIRELLES, A.M.A. **Ocorrência e controle da microflora associada aos frutos de café (Coffea arabica L.) provenientes de diferentes localidades do estado de Minas Gerais**. Lavras: UFLA, 1990. 71p. (Dissertação - Mestrado em Fitotecnia).

✕ MENCHÚ, J.F.; ROLZ, C. Coffee Fermentation Technology. **Café, Cacao Thé**, Paris, v. 17, n.1, p.53-61, jan./mar. 1973.

✕ MENON, S.N. Quality Improvement on the Estate and Processing Technology in Coffee. **Indian Coffee**, Bangalore, v. 53, n.12, p. 15-20, dez. 1989.

MISLIVEC, P.B.; BRUCE, V.R.; GIBSON, R. Incidence of Toxigenic and other Molds in Green Coffee Beans. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.46, n.11, p. 969-73, Nov. 1983.

MONACO, L.C. Armazenamento do café. **Boletim da Superintendência dos Serviços do Café**, São Paulo, v.36, n.417, p.15-16, nov. 1961.

MOREAU, C. **Moulds, toxins and Food**. New York: John Wiley,. 1979. 477 p

NORTHMORE, J.M. Raw bean color an the quality of Kenya arabica coffee. **ASIC Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés**, Trieste, 1967.

OLIVEIRA , J.C. **Relação da atividade da Polifenoloxidase, peroxidase e catalase dos grãos de café e a qualidade da bebida**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, 1972, 80 p. (Tese- Doutorado).

PERDERSON, C.S.; BREED, R.S. Fermentation of coffee. **Food Research**. Oxford, v.11, n.2, p. 99, 1946.

PIMENTA, C.J.; CHAGAS, S.J. de R.; COSTA, L. Polifenoloxidase, lixiviação de potássio e qualidade de bebida de café colhido em quatro estádios de maturação. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 32, n.2, p. 171-177, fev. 1997.

PRETE, C.E.C. **Condutividade elétrica do exsudato de grãos de café (*Coffea arabica* L.) e sua relação com a qualidade da bebida**. Piracicaba: ESALQ, 1992. 125p. (Tese-Doutorado em Fitotecnia).

✓ PUERTA QUINTERO, G.I. Calidad en taza de las variedades de *Coffea arabica* L. cultivadas en Colombia. **Cenicafé**, Chinchiná, v. 49, n. 4, p. 265-278, oct./dic.1998.

✓ PUERTA QUINTERO, G.I. Evaluación de la calidad del café colombiano processado por vía seca. **Cenicafé**, Chinchiná, v.47, n.2, p. 85-90, abr./jun.1996.

✓ RENA, A.B.; MALAVOLTA, E.; ROCHA, M.; YAMADA, T (eds). **Cultura do cafeeiro- fatores que afetam a produtividade**. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e Fosfato., 1986. 447 p.

RODRIGUEZ, D.B.; FRANK, H.A. & YAMAMOTO, H.Y. Acetaldehyde as possible indicator of spoilage in green Kona (Hawaiian) Coffee. **Journal of the Science of Food Agriculture**, New York, v.20, n.1, p. 15-17, jan.1969.

ROSE, A.H. (ed) **Fermented foods: economic microbiology**. Coffee fermentations, Oxford: Academic Press, 1982. p. 259-273.

ROUSSOS, S.; ANGELES AQUIÁHUATL, M.; TREJO-HERNÁNDEZ, M. R.; GAIME PERRAUD, I.; FAVELA, E.; RAMAKRISHNA, M.; RAIMBAULT, M.; VINIEGRA-GONZÁLEZ, G. Biotechnological management of coffee pulp- isolation, screening, characterization, selection of caffeine-degrading fungi and natural microflora present in coffee pulp and husk. **Applied Microbiology Biotechnology**, Berlin, v.42, p.756-762.1995.

SIVETZ, M. **Coffee processing technology**. Westport: Connecticut: AVIC, v.2, 1963.

X SIVETZ, M.; DESROSIER, N.W. **Coffee Technology**, EUA: AVI Publishing Company, 1979. 716 p.

SÖNDAHL, M.R.; CORP, F. Produção de café: considerações sobre qualidade. **Revista Illycaffé**, São Paulo, v.1, n.1 p. 9, 1995.

TEIXEIRA, A.A.; SILVEIRA, A.P. da; ARRUDA, H.V. de; MARIOTTO, P.R.; FIGUEIREDO, P. Influência de diversos fungicidas aplicados a alto e baixo volumes na qualidade da bebida do café. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEIRAS, 5., 1977, Guarapari. **Resumos...** Rio de Janeiro: IBC-GERCA, [1977]. p. 89-90.

X VALENCIA A., G. Actividad enzimatica en el grano de café en relacion com la calidad de la bebida de café. **Cenicafé**, CHinchiná, v.23, n. 1, nov. 1973.

- XVAN PEE, W. & CASTELEIN, J.M. Study of the pectinolytic microflora, particularly the Enterobacteriaceae, from fermenting coffee in the Congo. **Journal of Food Science**, Chicago, n.37, n.2, p.171-174, Mar./Apr. 1972.
- XVAN PEE, W.; CASTELEIN, J.M The yeasts flora of fermenting robusta coffee. **East african Agricultural and Forestry Journal**, Nairobi, v.26, n.3, p. 308-310, jan. 1971.
- VAUGHN, R.H.; CAMARGO, R. DE; FALLANGE, H.; MELLO AYRES, G.; SERGEDELLO, A. Observations on the microbiology of the coffee fermentation in Brazil. **Food Technology**, Chicago, v.12, p. 12-57, Apr. 1958. Supplement.
- VILAS BOAS, B.M.; PÁDUA, F.R.M.; CARVALHO, V.D. de. Teores de compostos fenólicos em cafés de diferentes padrões de bebida. In: SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS, 3., 1999, Campinas. **Resumos...** Campinas: UNICAMP, 1999, p. 62.
- WHITAKER, J.R. Polyphenol Oxidase. In: WONG, D.W.S. **Food Enzymes- Structure and Mechanism**. London: Chapman & Hall, 1995. p. 271-307.
- WIEZEL, J.B.C. **Qualidade da bebida de café**. Piracicaba: ESALQ. 1981, 24p. (Curso de Pós Graduação- fitotecnia).
- XWOELORE, W.M. Optimum fermentation protocols for Arabica coffee under Ethiopian conditions. In: **SCIENTIFIC SYMPOSIUM ON COFFEE** Association Scientifique Internationale du Café, 1993. p. 727-733
- WONG, D.W.S. **Food Enzymes- Structure and mechanism**. Chapman & Hall, EUA, 1995. 390 p. Cellulolytics Enzymes, p. 85-114.
- WOSIACKI, G. **Enzimas pectinolíticas de *Fusarium oxysporum* Schlecht EX. Fr. isolado de frutos de café**. Campinas: UNICAMP, 1977. 73p. (Tese-Doutorado em Ciência dos Alimentos).

CAPÍTULO 2

INCIDÊNCIA DE MICRORGANISMOS EM GRÃOS DE CAFÉ (*Coffea arabica*) EM DIFERENTES ESTÁDIOS DE MATURAÇÃO.

RESUMO

SILVA, C.F. Incidência de microrganismos em grãos de café (*Coffea arabica* L.) em diferentes estádios de maturação. Lavras: UFLA, 2000 (Dissertação- Mestrado em Ciência dos Alimentos).

Os grãos de café apresentam condições ideais para a colonização por bactérias, leveduras e fungos filamentosos, pois são constituídos de açúcares, pectinas, celulose e água. Um dos grandes problemas da cafeicultura brasileira e mineira é a incidência destes microrganismos e sua possível interferência na qualidade da bebida. Estudos que visem o entendimento da ação microbiana são escassos e, quando presentes, tratam-se de processamento por via úmida, o que, na maioria das fazendas brasileiras produtoras, não é procedimento padrão. Assim, foi realizada a contagem e isolamento de bactérias, leveduras e fungos filamentosos presentes em grãos de café processados por via seca durante a maturação dos grãos e colheita. As amostras de grãos de café foram coletadas de modo a evitar contaminações, em duas safras (1997 e 1998), em 15 fazendas localizadas na região Sul de Minas Gerais. A população microbiana total variou de 3×10^4 a $2,2 \times 10^9$ Unidades Formadoras de Colônia/ grão (UFC/grão) com valor médio de $1,6 \times 10^7$. Em todos os estádios de maturação, o grupo de bactérias foi mais abundante do que fungos filamentosos e leveduras. A contagem de bactérias, leveduras e fungos filamentosos variou consideravelmente entre fazendas e nos diferentes estádios de maturação em uma mesma fazenda, não sendo possível estabelecer nenhuma relação. No primeiro ano de coleta, houve predomínio de bactérias Gram negativas, e no segundo ano, Gram positivas. Houve um aumento da população leveduriforme durante a fermentação em terreiro em bebida classificada como "Riada".

Comitê Orientador: Dr^a Rosane Freitas Schwan - UFLA (Orientadora)
Dr. Eustáquio Souza Dias - UFLA (Coorientador)

ABSTRACT

SILVA, C.F. Microrganismos incidence in grains of coffee (*Coffea arabica* L.) in different degree of maturation. Lavras: UFLA, 2000. (Dissertation-Master 's degree in Food Science).

The coffee beans present ideal conditions for the colonization of bacterias, yeasts and filamentous fungi as sugars, pectins, cellulose and water. One of the great problems of coffee growing in Brazil and in Minas Gerais is the incidence of these microrganisms and their possible interference in the quality of the drink. Studies of microbial action are scarce and predominantly on wet processing which is rarely performed in Brazilian farms.. The aim of this work was to count and isolate bacteria, yeasts and filamentous fungi present in coffee beans processed by dry method at different degree of maturation. The samples of coffee beans were collected assepticamente during a two year period (1997 and 1998) on fifteen different farms in the Sul de Minas region. The microbial load varied from 3×10^4 to 2.2×10^9 UFC/bean with a medium value of 1.6×10^7 . At all stages, bacteria were the most abundant group, on average, then filamentous fungi and finally yeasts. Counts of bacteria, yeasts and filamentous fungi varied considerably between farms and at different stages of maturation and processing on any one farm and no consistent pattern could be seen. Median counts were not significantly different for fungi, yeasts and bacteria between the two years although Gram negative bacteria dominated in a wet year and Gram positive bacteria dominated in a dry year. Yeasts showed an increase during the fermentation process.

Guidance Committee: Ds. Rosane Freitas Schwan (UFLA)
Ds. Eustáquio Souza Dias (UFLA)

1 INTRODUÇÃO

O processamento dos grãos de café após a colheita pode ser realizado por via úmida ou via seca. Ambas originam, no final do beneficiamento, café verde, como é conhecido no comércio (Menchú e Rolz, 1973). No processamento por via úmida, os grãos de café já despulpados sofrem a ação de microrganismos para degradação da mucilagem (Jones e Jones, 1984). Países como Colômbia, Costa Rica, Guatemala, México, El Salvador, Quênia (Puerta, 1996), Congo (Van Pee e Castelein, 1972) e Índia (Agate e Bhat, 1966) utilizam, tradicionalmente, o processamento por via úmida. Neste tipo de processamento, a fermentação natural tem que ser bem controlada quanto ao tempo, umidade relativa (Puerta, 1996) e produção de ácidos, que podem ser influenciados pela temperatura ambiente, altitude (Woelore, 1993) e condição de aerobiose ou anaerobiose (Menchú e Rolz, 1973). O controle nesta etapa é um dos fatores que garante a boa qualidade dos cafés despulpados. Não se pode desprezar, também, a influência do grau de maturação dos grãos, tratamento com água limpa e secagem imediata após a fermentação (Puerta, 1996).

No processamento por via seca, realizado principalmente em cafés arábicas brasileiros (Menchú e Rolz, 1973) e em cafés da Etiópia, os grãos são colhidos em vários estádios de maturação e levados para terreiros e/ou secadores para secagem com casca, polpa, mucilagem e semente (Lacerda et al., 1985; Jones e Jones, 1984; Sivetz e Desrosier, 1979). A secagem dos grãos é a parte mais prolongada deste processamento devido ao alto teor de umidade, em torno de 70 %, presente nos grãos (Bártholo e Guimarães, 1997).

Durante a secagem em terreiro, a qualidade final do produto é bastante influenciada pelas condições atmosféricas (Lacerda et al., 1985). Dependendo destas condições, pode haver a colonização por grupos de microrganismos que

utilizam os grãos de café como substrato para seu desenvolvimento (Carvalho e Chalfoun 1985).

Jones e Jones (1984) afirmaram que no processamento por via seca não há participação de microrganismos. No entanto, uma incidência significativa de microrganismos já foi mencionada por vários autores (Alves e Castro, 1998; Liardon, 1989; Carvalho, Chalfoun e Chagas, 1989; Mislivec, Bruce e Gibson, 1983; Vaughn et al., 1958; Bitancourt, 1957; Krug, 1947, Krug, 1940).

Em localidades do Estado de Minas Gerais, principalmente Zona da Mata e Jequitinhonha, onde se verifica alta umidade do ar (Cortez, 1997) e há chuvas na época da colheita, o produto é de baixa qualidade devido a fermentações indesejáveis. Estas fermentações não são controladas e podem resultar em produtos metabólicos microbianos, como ácidos butírico e propiônico que, uma vez presentes no grão, depreciarão a qualidade final da bebida (Krug, 1945).

Vaughn et al. (1958) realizaram várias observações sobre a microbiologia da fermentação do café no Brasil e concluíram que a superfície dos grãos apresentou, inicialmente, uma população bacteriana variável entre 10^2 e 10^5 bactérias por grama, chegando a 10^9 bactérias por grama em 24 horas de fermentação. Observaram crescimento de fungos filamentosos e poucas leveduras. Liardon et al. (1989), estudando a origem do gosto "rio" em cafés brasileiros, observaram significativa contaminação externa dos grãos oriundos de locais que forneciam bebida "rio".

Considerando que a maioria dos produtores de café no Brasil utilizam, como procedimento padrão, o processamento por via seca e que nenhum estudo foi ainda realizado para verificar a influência de grupos de microrganismos interferindo na qualidade do café, objetivou-se, com este trabalho, quantificar, isolar e identificar bactérias, leveduras e fungos filamentosos presentes em grãos

de café colhidos em quatro estádios de processamento em fazendas da região Sul de Minas Gerais, Brasil.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

Foram coletados grãos de café, espécie *Coffea arabica* var. Mundo Novo, nos estádios de maturação cereja, passa, seco no pé e em terreiro em quinze fazendas localizadas nas cidades do Sul de Minas Gerais: Lavras (2 fazendas), Campo Belo, Cristais, Três Pontas e Perdões, no primeiro ano de coleta (1997), em Varginha, Machado, Botelhos, Poço Fundo, Carmo do Rio Claro, Três Corações, Carmo da Cachoeira, Ijaci e Ilicínea, no segundo ano (1998). As cidades amostradas foram escolhidas principalmente devido à diferença de altitude e proximidade com represa.

A localização das cidades no Estado de Minas Gerais pode ser encontrada na Figura 1 e as condições climáticas e geográficas dos locais de amostragem encontram-se na Tabela 1. Dados de algumas cidades foram agrupados em regiões de acordo com a proximidade da Estação meteorológica. Assim, na estação de Lavras podem ser agrupadas as cidades de Perdões e Ijaci; na estação de Machado, Botelhos e Poço Fundo e na Estação de São Lourenço, a cidade de Três Corações. Os dados sobre altitude, temperatura média, máxima e mínima, precipitação e umidade encontram-se na Tabela 2.

Os grãos, colhidos de forma a evitar contaminações e aleatoriamente, percorrendo vários pés, nos estádios cereja, passa, secos no pé e secos em terreiro de cimento, foram acondicionados em frascos esterilizados e imediatamente transferidos para o laboratório de Microbiologia do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras - MG.

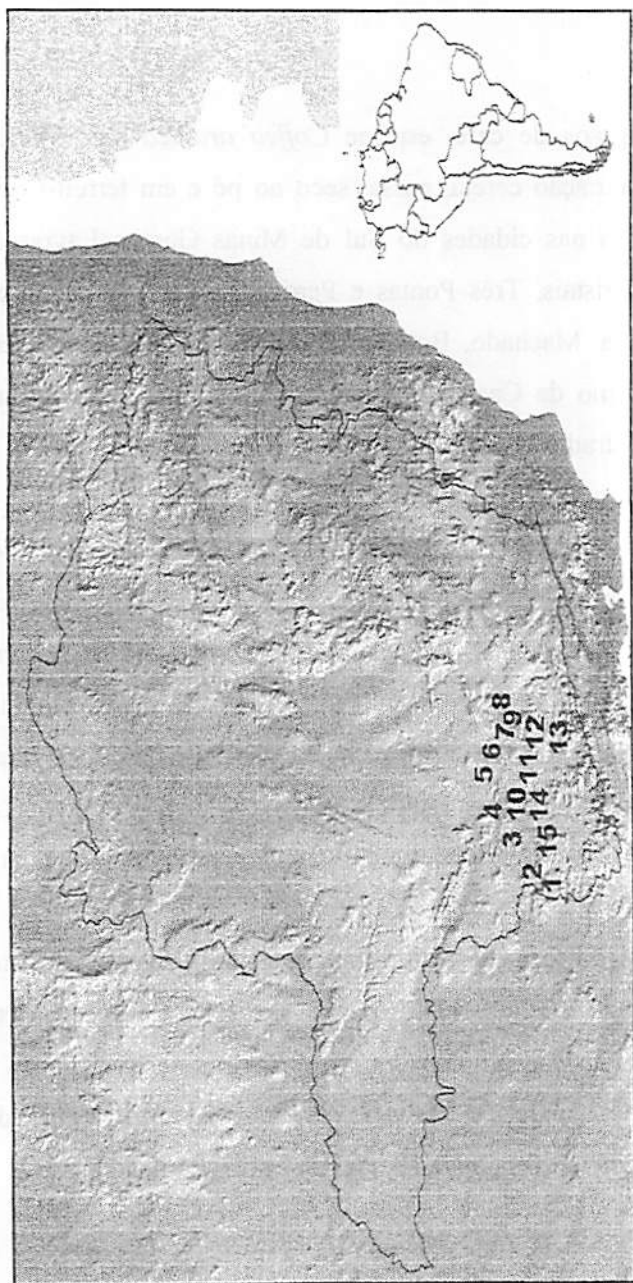


FIGURA 1 -Localização geográfica das cidades amostradas para coleta de grãos de café na região Sul de Minas Gerais. Cidade 1 (Poços de Caldas- referencial), 2 Botelhos, 3 Carmo do Rio Claro, 4 Ilínea, 5 Cristais, 6 Campo Belo, 7 Perdões, 8 Ijaci, 9 Lavras, 10 Três Pontas, 11 Varginha, 12 Carmo da Cachoeira, 13 Três Corações, 14 Machado, 15 Poço Fundo.

TABELA 1 Dados sobre temperatura, umidade e altitude das cidades amostradas para coleta de grãos de café na região Sul de Minas Gerais.

Cidades	Temperaturas médias (° C)			Umidade (%)	Altitude (m)
	Máxima	Mínima	Média		
Botelhos	30	5	-	-	970
Campo Belo	32	10	-	-	780
C. Cachoeira	24	9	-	-	907
C. Rio Claro	36	14	-	-	750
Cristais	32	12	-	-	920
Ilicínea	32	10	-	-	
Lavras	26,1	14,8	19,4	76,2	918,8
Machado	26,9	14,3	19,6	72,3	873,3
Perdões	-	-	-	-	767
Poço Fundo	36	12	-	-	845
Três Corações	26,9	13,5	-	76,6	-
Três Pontas	24	14	-	-	902
Varginha	32	8	-	-	894

Fonte: Enciclopédia dos municípios brasileiros, 1959, vol. XXIV, XXV, XXVI, XXVII, Rio de Janeiro. Brasil (1969).

TABELA 2 Dados médios, dos anos 1969 a 1999, sobre altitude, Temperatura média, máxima e mínima, precipitação e umidade nas três estações meteorológicas do Sul de Minas Gerais.

Estações	Temperaturas (° C)			Umidade relativa (%)	Precipitação (mm.ano)	Altitude (m)
	Max.	Min.	Média			
Lavras	26,1	14,8	19,4	76,2	1530	918,8
Machado	26,9	14,3	19,6	72,3	1593	873,3
S. Lourenço	27,1	13,3	19,1	76,4	1569	900,3

Fonte: Normais climatológicas, 1969-1999.

2.2 Contagem e isolamento de microrganismos

Os grãos de café foram escolhidos aleatoriamente, em número de vinte (20), de cada estágio de maturação e processamento, e então colocados, assepticamente, em Erlenmeyers com duzentos (200) ml de água peptonada estéril (1% de peptona e 5% de NaCl, esterilizada a 121° C/ 15 min.) nas quais foram agitados durante vinte (20) minutos, em agitador orbital Tecnal - TE 140 em 80 rpm. A partir do extrato obtido, foram preparadas diluições decimais de 10^{-1} a 10^{-6} .

Para a determinação da contagem total de bactérias e leveduras, foi tomado 0,1 ml de cada diluição, em triplicata, espalhando com alça de Drigalsky no meio WL (DIFCO). Foi utilizado o meio "Eosine Methylene Blue" (MERCK) para detecção prévia de *Escherichia coli* ou Enterobacteriaceae, MRS (OXOID), acrescido de nistatina para contagem de bactérias lácticas e YW (extrato de levedura 0,3%; extrato de malte 0,3%; peptona de soja 0,5%; glicose 1%; ágar 1,3%, água destilada 100 ml- pH 3.5) (Wickerham, 1951) para

crescimento de fungos filamentosos e leveduras. As placas foram incubadas a 28° C e a contagem total de bactérias foi realizada após 24-48 horas de incubação. Para a contagem e morfologia de fungos filamentosos, as placas foram incubadas por 168 horas.

A partir da contagem total, escolheu-se, para morfologia de colônia, uma placa de cada meio e diluição cuja contagem estivesse entre 30 e 300 colônias. O número de isolados foi determinado calculando-se a raiz quadrada do número total de isolados conforme mencionado no Bacteriological Manual for Foods (FDA, 1972). Foram isoladas uma ou duas colônias de cada morfotipo diferente nas placas. A morfologia de colônia inclui as seguintes características observadas: tamanho da colônia (análise comparativa com outras colônias presentes naquele meio), forma, elevação, cor e bordo.

Os isolados foram purificados e as leveduras foram separadas de bactérias por exame microscópico. Das culturas puras de bactérias, foram realizados testes de coloração diferencial de Gram (técnica formulada por Christian Gram, 1884 e descrita em Pelczar, Chan e Krieg, 1996), teste de produção da enzima catalase e de motilidade.

Os isolados foram transferidos para tubos de ensaio contendo PCA inclinado (triptona 0,5%, extrato de levedura 0,25%, glicose 0,1%) e preservados sob óleo mineral a 4° C para posterior identificação.

2.3 Determinação da atividade de Polifenoloxidase.

Para determinação da atividade de Polifenoloxidase nos cafés verdes, utilizou-se o método proposto por Ponting e Josling (1948), utilizando extrato de amostra sem di- hidroxí- fenilalanina (DOPA) como branco.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A população microbiana encontrada em grãos de café de quinze fazendas de café localizadas no Sul de Minas Gerais foi avaliada por dois anos consecutivos (1997 e 1998). Os resultados mostraram uma diferença significativa na quantidade dos grupos microbianos encontrados nos estádios de maturação (Tabela 3). A população total, por exemplo, variou bastante entre os grãos cereja, passa, seco no pé e seco em terreiro em todas as fazendas. A população total variou de 3×10^4 a $2,2 \times 10^9$ com valor médio de $1,6 \times 10^7$ UFC/grão. Somente no estádio passa a variabilidade foi menor, sendo de $1,2 \times 10^6$ a $6,8 \times 10^7$ UFC/grão. Entretanto, esta variação observada não foi sistemática entre os diferentes estádios de maturação, não sendo possível estabelecer correlação entre a contagem total de microrganismos com os estádios de processamento. Krug (1940) citou que os frutos de café são mais atacados na transição de cereja a seco, o que não foi observado neste trabalho. Em todas as regiões amostradas houve aproximadamente o mesmo índice de pluviometria (dados médios do período de 1969-1999), a temperatura média também não foi muito diferente apesar da variação da altitude, portanto, não foi possível estabelecer correlações entre as condições climáticas do local e a população microbiana.

Os dados da Tabela 3 foram usados para a elaboração da Tabela 4. O método usado foi a contagem no meio WL, que proporcionou a contagem total, isto é, de bactérias, leveduras e fungos filamentosos. Leveduras foram contadas no meio YW. Da diferença da população de leveduras do total da população no meio WL, foi calculada a população bacteriana. Estes valores foram, então, expressos em porcentagem dos três grupos na Tabela 4. Dados da fazenda 7 foram incompletos e das fazendas 8-12 foram omitidos porque os fungos

filamentosos não foram contados separadamente. Durante o primeiro ano, YW não foi utilizado e, portanto, não foi possível separar leveduras de bactérias.

Embora a população microbiana tenha variado numa ordem de magnitude de cinco vezes, os dados da Tabela 4 mostram uma consistência. Com algumas poucas exceções, a população bacteriana foi a mais abundante dos três grupos. As proporções dos outros dois grupos variaram substancialmente, sendo, algumas vezes, leveduras, e outras vezes, fungos filamentosos. Entretanto, o resultado mais comum foi os dois grupos sendo bem representados.

Em termos gerais, a incidência de isolados da população bacteriana, leveduriforme e fúngica segue a mesma tendência que a da contagem total. O número de isolados bacterianos foi de 1,2 vezes maior que o de fungos, e este foi 3 vezes maior que o número de isolados de leveduras, considerando-se todos os locais e estádios amostrados.

Vaughn et al. (1958) observaram, em cafés brasileiros, predomínio da flora bacteriana sobre a de leveduras e fungos filamentosos. Posteriormente, Frank et al. (1965), avaliando a contaminação microbiana da superfície dos grãos de café em Kona, no Havá, observaram que a flora bacteriana representava entre 20 e 60 % da população total da superfície dos grãos. Opostamente, Van Pee e Castelein (1971) e Agate e Bhat (1966) encontraram predomínio de leveduras na mucilagem e superfície de grãos de cafés em proporções de 10:1, porém tratava-se de isolamentos realizados com grãos de café da variedade Robusta. Segundo Van Pee e Castelein (1971), a variabilidade microbiana pode estar relacionada, entre outros fatores, à variedade de café analisada.

TABELA 3 Contagem total de microrganismos (UFC/ml x 10⁶), em quatro meios de cultura, nas quinze fazendas amostradas. **A- WL** (contagem total); **B- MRS** (OXOID- contagem de *Lactobacillus*), **C- EMB** (MERCK- contagem de Enterobacteriaceae), **D- YW** (pH 3,5- contagem de leveduras e fungos filamentosos).

FAZ.	ESTÁDIOS DE MATURAÇÃO E PROCESSAMENTO															
	CEREJA				PASSA				SECO PÉ				SECO TERREIRO			
	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
1	0.15	0	0.08	²	1.85	0.013	1.52	²	0.03	0.03	0.013	²	21	20	0.095	²
2	3.2	1.2	3	²	30	2.5	9.5	²	6	3	2	²	135	102	35	²
3	197	0	155	²	44	0.3	4.5	²	30	0.7	15.2	²	300	282	0.9	²
4	*	*	*	²	68	59	0.06	²	10	0.2	5.3	²	167	20	12.3	²
5	7.	0.1	6.4	²	8.9	0.2	6.3	²	10	0.2	6.6	²	6	0.8	0.5	²
6	1.6	0.2	0.5	²	12.6	0.7	11.3	²	18.2	0.8	16.9	-	24	0.2	0.9	²
7	²	²	²	²	²	²	²	²	²	²	-	²	1	-	0.1	²

...continua...

TABELA 3, Cont..

ESTÁDIOS DE MATURAÇÃO E PROCESSAMENTO																
FAZ.	CEREJA				PASSA				SECO PÉ				SECO TERREIRO			
	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
8	0.4	0.2	0	0	20.4	0	9.5	0.3	· ^a	· ^a	· ^a	· ^a	130	38	83.4	15.8
9	0.4	0	0.04	0	· ^a	· ^a	· ^a	· ^a	16	0	0.4	1.6	· ^a	· ^a	· ^a	· ^a
10	4.3	0	0.6	0	1.2	0	0.92	0.1	5.2	0	1.7	0	4.5	0.66	1.8	0.7
11	2230	0.4	90.4	5	22.4	8.3	35	0.01	23.6	11.7	9.5	*	1630	0.4	1466	163
12	23.8	0	1	0	5	0	1.2	0	3.4	0	1	0	460	0	429	3.9
13	92.7	0	59.4	0.06	14.7	0	8.4	0.6	· ^a	· ^a	· ^a	· ^a	<u>122.4</u>	<u>11.20</u>	<u>10.21.5</u>	<u>5.11.5</u>
14	20.7	0	18.6	0.01	21.7	16.8	2.2	1.8	15	0	9.6	*	20	21.6	5	0.7
15	36	22.5	12.3	0.2	36.6	16.7	28.8	3.3	6.3	2.4	6.7	*	12.7	1.85	8.6	1.8

*Placa com mais de 300 colônias; ^a dados não coletados.

Dados sublinhados na fazenda 13, estágio terreiro representam a contagem total no terreiro 1 (grãos sob chuva) e terreiro 2 (grãos que não receberam chuva durante a secagem), respectivamente

TABELA 4 Porcentagem da contagem total de bactérias, leveduras e fungos filamentosos nos quatro estádios de maturação e processamento dos grãos de café das quinze fazendas amostradas na região Sul de Minas Gerais. As letras B, L e FF representam, respectivamente, bactérias, leveduras e fungos filamentosos.

FAZ.	CEREJA			PASSA			SECO PÉ			SECO TERREIRO		
	B	L	FF	B	L	FF	B	L	FF	B	L	FF
1	31,7	51,7	16,6	55,1	24,9	20	75,9	24,1	0	69	16,7	14,3
2	85,3		14,7	99,9		0,1	100		0	100		0
3	100		0	100		0	100		0	100		0
4	100		0	100		0	100		0	100		0
5	86,1		13,9	83,1		16,9	90		10	66,7		33,3
6	31,3		68,7	86,5		13,5	84,6		15,4	45,8		54,2

...continua...

TABELA 4, Cont.

FAZ.	CEREJA			PASSA			SECO PÉ			SECO TERREIRO		
	B	L	FF	B	L	FF	B	L	FF	B	L	FF
13	88	0,1	11,9	91,8	3,9	4,3	- ^a	- ^a	- ^a	<u>73,5/</u>	<u>22,9/</u>	<u>3,6/</u>
										<u>28,3</u>	<u>63,3</u>	<u>8,4</u>
14	85,5	0,01	14,49	83,8	8,3	7,9	*	*	*	78,4	3,6	18
15	91,1	0,6	8,3	82,2	8,9	8,9	57,1	32,9	10	85	14	1

Números sublinhados na fazenda 13 estádio terreiro, referem-se a contagem de grãos que ficaram sob chuva durante a seca (terreiro 1) e grãos que não ficaram sob chuva (terreiro 2).

*Contagem impossível.

^a Dados não coletados.

Foram isolados 754 microrganismos, entre bactérias, leveduras e fungos filamentosos, para posterior identificação. Na Tabela 5 encontra-se o número de isolados de bactérias, leveduras e fungos filamentosos nos quatro estádios de maturação e processamento, em cada ano de coleta, em todos os locais amostrados.

Entre os isolados de bactérias do primeiro ano de coleta, houve predominância de bactérias Gram negativas representando 64,6 % dos isolados bacterianos do ano de 1997. No segundo ano de coleta foi observado o inverso, ou seja, ocorreu uma predominância de bactérias Gram positivas com 88,6% dos isolados bacterianos. Observou-se, nos dois anos de coleta, significativa mudança quanto ao índice de chuva ocorrida durante o período de coleta. Apesar dos dados fornecidos na Tabela 2 apresentarem precipitação pluviométrica muito semelhante nas estações meteorológicas, vale ressaltar que são dados médios divulgados de alguns anos. Na prática, observou-se que o ano de 1997 foi mais úmido na época da amostragem que o ano seguinte, 1998 (Tabela 3A em Anexo).

Poucos são os trabalhos na literatura revisada que mencionam contagem dos microrganismos isolados do café. Entretanto, alguns autores referem-se à atividade destes microrganismos e concluem que a participação de bactérias Gram negativas seria na degradação da mucilagem da polpa de café (Jones e Jones, 1984; Frank, Lum e Dela Cruz, 1965). Nos resultados obtidos do isolamento de microrganismos de grãos de café do Sul de Minas Gerais, observou-se o predomínio de bactérias Gram positivas que talvez possam estar atuando na degradação da polpa e mucilagem no processamento dos grãos por via seca.

O predomínio de bactérias Gram positivas sobre Gram negativas talvez possa ser justificado pelo tipo de processamento dos grãos. O isolamento de bactérias Gram negativas deu-se em cafés do Havai onde o processamento foi realizado

por via úmida (Frank, Lum e Dela Cruz, 1965) enquanto o que foi desenvolvido no Sul de Minas Gerais foi por via seca. A segunda possível causa do predomínio de bactérias Gram positivas em um dos anos de coleta pode ter sido a variação climática.

Vaughn et al. (1958) isolaram bactérias coliformes, trabalhando com cafés brasileiros, as quais poderiam estar atuando na degradação de substâncias pécticas dos grãos por apresentarem maior incidência, comparados a outros microrganismos também ali presentes. Estudos complementares são necessários, já que o predomínio deste grupo bacteriano fez-se somente no primeiro ano (estação úmida), opondo-se a Gram positivas no segundo ano de coleta (estação seca).

Trabalhos sobre a microbiota de café são relativamente antigos, mas segundo Agate e Bhat (1966) e Castaño (1956), variações nas espécies microbianas também podem ser observadas de acordo com o as estações do ano, população do solo, variedades de café, época do ano, temperatura e umidade.

O número de leveduras isoladas sofreu incremento no primeiro ano de amostragem durante as etapas de maturação e processamento (Tabela 5), enquanto, no ano seguinte, não apresentaram nenhuma tendência de colonização nos estádios de maturação e processamento (Tabela 5). Opostamente, a incidência de fungos filamentosos foi menor durante o prosseguimento dos estádios no primeiro ano e sem tendência de colonização no segundo ano (Tabela 5).

As amostras de café verde coletadas em 7 fazendas amostradas foram submetidas à classificação de bebida pela atividade de polifenoloxidase (Tabela 6).

TABELA 5 Números de isolados de bactéria, leveduras e fungos filamentosos em dois anos de coleta.

Estádio	Bactérias				Leveduras		Fungos filamentosos	
	Gram negativas		Gram positivas					
Ano	1997	1998	1997	1998	1997	1998	1997	1998
Cereja	15	4	15	29	2	13	57	15
Passa	31	4	8	26	9	15	53	30
Seco no pé	51	1	21	21	14	7	33	53
Seco terreiro	53	5	38	33	22	25	30	21

TABELA 6 Classificação das amostras de café coletadas nas cidades do Sul de Minas Gerais, segundo a atividade de polifenoloxidase.

ATIVIDADE DE POLIFENOLOXIDASE			
FAZENDAS	CIDADES	PFO (μ / g tecido)	CLASSIFICAÇÃO
8	Machado	45,49	"Riada ou Rio"
10	Botelhos	64,16	"Apenas Mole ou Mole"
11	Ilicínea	61,83	"Dura"
12	Carmo Rio Claro	60,66	"Dura"
13	Varginha	53,66	"Riada"
14	Três Corações	68,83	"Estritamente Mole"
15	Carmo Cachoeira	62,99	"Apenas Mole"

Esta enzima atua protegendo fenóis contra a oxidação. Se há injúrias nos grãos causadas por insetos ou mal processados, enzima e substrato entram em contato. No entanto, esta enzima sofre controle regulatório do seu produto, sendo então inativada. Resumindo, em cafés com atividade de polifenoloxidase baixa (entre 36,16 a 53,66 U/ min/ g de amostra), a bebida de café oferecida será de qualidade inferior ("Rio" e "Riada"), enquanto, alta atividade enzimática (55,9 a 74,66 U/ min/ g de amostra) origina bebidas classificadas como "Dura" a "Estritamente Mole" (Amorim, Smucker e Pfister, 1976; Amorim e Amorim, 1977; Carvalho, Chagas e Chalfoun, 1997).

Das amostras coletadas, duas apresentaram classificação "Dura", as demais foram "Estritamente Mole", "Apenas Mole ou Mole", "Apenas Mole", "Riada ou Rio" e "Riada".

O grau de contaminação por bactérias, leveduras e fungos filamentosos nas bebidas "Estritamente Mole" (fazenda14), "Dura" (fazenda 11) e "Riada" (fazenda 13) apresenta-se na Figura 2.

As porcentagens da incidência de bactérias, leveduras e fungos filamentosos foram obtidas, através de dados da contagem total, subtraindo-se a contagem de WL e YW. Isto porque os meios seletivos, EMB e MRS, utilizados não foram eficientes para Enterobacteriaceae e *Lactobacillus*, respectivamente.

Na Figura 2 observa-se que na bebida classificada como Estritamente Mole, segundo a análise de polifenoloxidase, a incidência de bactérias permanece superior durante todo o processamento, comparada à incidência de leveduras e fungos filamentosos. Na bebida classificada como "Riada" a incidência de bactérias foi geralmente menor do que a de fungos filamentosos e leveduras em amostras retiradas da plataforma de secagem, exceto nas amostras que tinham maior teor de umidade devido à exposição durante o período chuvoso. Nesta amostra, observa-se crescente aumento da população leveduriforme. Feita a análise estatística utilizando-se o teste de contingência a 5% (Steel e Torrie, 1980), confirma-se a relação entre maior incidência de bactérias e bebidas de qualidade superior nos estádios de processamento estudados e maior incidência de leveduras relacionada a bebidas de pior qualidade ($X^2_c = 11,72$; $X^2_c = 4,69$; $X^2_c = 85,05$ para cereja, passa e terreiro, respectivamente).

Poisson et al. (1976), analisando a flora de cafés verdes arábicas, observaram que bebidas de pior qualidade apresentaram reduzidas incidências de bactérias e maiores de fungos filamentosos. Liardon et al. (1989) observaram que, em cafés classificados como "Rio", o grau de contaminação da superfície dos grãos por fungos e leveduras foi maior que o de bebidas classificadas por eles como "não Rio", mas não mencionaram a incidência de bactérias.

O número de fungos filamentosos foi semelhante (Figura 2) ou inferior

ao de leveduras (Figura 2). Dados da incidência de fungos filamentosos na bebida classificada como "Dura" não constam devido à falta de dados.

Krug (1940a), observando a influência da contaminação fúngica em cafés durante a secagem, observou que cafés classificados como "Estritamente Mole" apresentaram menor contaminação que aqueles cuja bebida era inferior. Esta tendência não pôde ser observada neste trabalho.

Somente em um tipo da bebida de café classificada como "Riada", foi observada maior porcentagem de leveduras em relação aos fungos filamentosos. Nesta amostra, foram encontradas 22,9% de leveduras, 3,6 % de fungos filamentosos e 73,5% de bactérias. Entretanto, esta coleta foi realizada com grãos de café que permaneceram sob chuva durante a secagem (Figura 2). Isto talvez possa ser explicado pela "lavagem" que os grãos de café sofreram durante a chuva ou pelo excesso de umidade que pode ter auxiliado uma população leveduriforme e retardado o processo de secagem.

As características morfológicas dos isolados de bactérias dos grãos de bebidas classificadas como "Estritamente Mole", "Dura" e "Riada" não apresentaram diferenças e podem ser assim resumidas: colônias circulares, de bordos inteiros, coloração branca, cinza, salmão e rosa, achatadas a convexas.

Dos isolados bacterianos, 80 %, 75 % e 88,2 % foram catalase positivos, para as bebidas "Estritamente Mole", "Dura" e "Riada", respectivamente. Bactérias Gram positivas e esporuladas foram isoladas em grãos de bebida "Dura" (10%) e "Riada" (20%). Nas três classificações de bebida, bactérias apresentaram capacidade móvel, sendo 88,9% em bebida "Estritamente Mole", 100 % em bebida "Dura" e 76,5% em bebida "Riada".

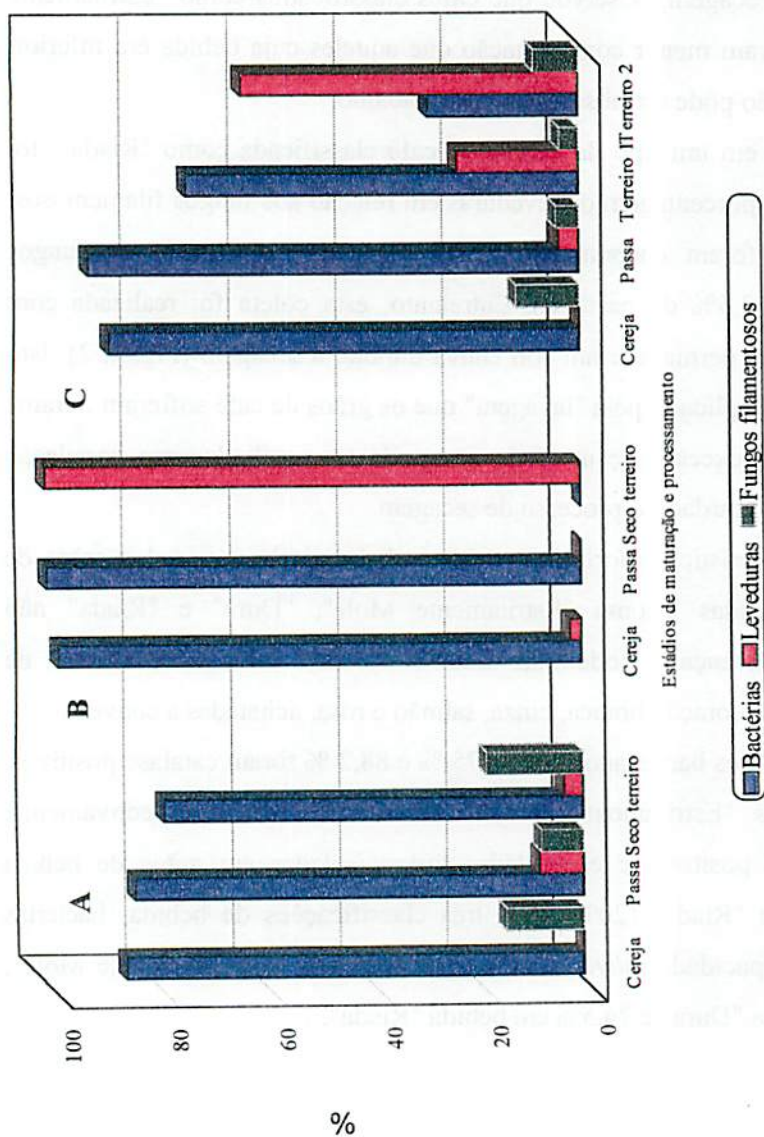



FIGURA 2 - Contaminação total de bactérias, leveduras e fungos filamentosos em três estádios de processamento em grãos de café classificados pela atividade de polifenoloxidase como "Estritamente Mole" (A), "Dura" (B) e "Riada" (C).



As leveduras também apresentaram semelhanças morfológicas nas três classificações de bebida, sendo circulares, achatadas a convexas, brancas, salmão ou rosa, bordos inteiros, ondulados ou irregulares, com tamanhos pequenos a médios.

Fungos filamentosos apresentaram quatro morfotipos diferentes em todas as amostras: micélio verde oliva escuro com aspecto de tapete, micélio branco ou rosa com aspecto de algodão, micélio verde em aspecto de veludo e micélio flocoso preto e amarelo.

A falta de trabalhos sobre o conhecimento da fermentação e microbiota do café no processamento por via seca impede a comparação de dados, prejudicando uma melhor discussão dos dados.



4 CONCLUSÕES

A partir dos isolamentos da microbiota realizados na superfície dos grãos de café, conclui-se:

- ✓ A incidência da flora microbiana nos diferentes estádios de processamento e localidades foi variável, sem ter tido relação nítida com as condições climáticas do local.
- ✓ Houve predomínio de bactérias sobre leveduras e fungos filamentosos encontradas nas amostras nos dois anos de coleta.
- ✓ Ocorreu maior incidência de isolados de bactérias Gram negativas no ano de 1997, e maior de bactérias Gram positivas no ano de 1998.
- ✓ Foi observado incremento da população de leveduras e menor de bactérias em cafés classificados como "Riado", pela análise de polifenoloxodase, nos estádios finais do processamento.
- ✓ Em cafés classificados como "Estritamente Mole" foi encontrada uma população maior de bactérias e menor de leveduras e fungos filamentosos.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGATE, A.D.; BHAT, J.V. Role of pectinolytic yeasts in the degradation of mucilage layer of coffee robusta cherries. **Applied Microbiology**, New York, v.14, p. 256-260, Mar. 1966.

ALVES, E.; CASTRO, H.A de Fungos associados ao café (*Coffea arabica* L) nas fases de pré e pós colheita em lavouras da região de Lavras. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v.24, n.1, p.4-7, 1998.

AMORIM, H.V.; CRUZ, A.R.; ANGELO, A.J.ST.; DIAS, R.M.; MELO, M.; TEIXEIRA, A.A.; GUTIERREZ, L.E. ORY, R.L. Biochemical, physical and organoleptical changes during raw coffee quality deterioration. **ASIC, 8º Colloque**, Abidjan, 1977, p. 183-186.

AMORIM, H.V.; SMUCKER, R.; PFISTER, R. Some physical aspects of Brazilian green coffee beans and the quality of the beverage. **Turrialba**, San José, v.26, n.1, p. 24-27, Jan./Mar. 1976.

BÁRTHOLO, G.F.; GUIMARÃES, P.T.G. Cuidados na colheita e preparo do café. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 18, n. 187, p. 33-42, 1997.

BITANCOURT, A.A. As fermentações e podridões da cereja de café. **Boletim da Superintendência dos Serviços do Café**, São Paulo, v. 32, p. 7-14, jan. 1957.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Escritório de meteorologia. **Normais climatológicas** (Minas Gérias, Espírito Santo, Rio de Janeiro- Guanabara). Rio de Janeiro, 1969. v.3, 99p.

CARVALHO, V.D.; CHALFOUN, S.M. Aspectos qualitativos do café. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.11, n.126, p.79-92, jun.1985.

CARVALHO, V.D.; CHALFOUN, S.M.; CHAGAS, S.J.DE R. Relação entre classificação de café pela bebida e composição físico-química, química e microflora do grão beneficiado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 15., 1989, Maringá. Resumos ... Rio de Janeiro: MIC/IBC, 1989. p.25-26.

CARVALHO, V.D.; CHAGAS, S.J.R.; CHALFOUN, S.M. Fatores que afetam a qualidade do café. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.18, n.187, p. 15-20, 1997.

CASTAÑO A., J.J. Antagonismo entre *Penicillium* sp e *Thielaviopsis paradoxa* (De Seynes von Hohn) agente patógeno de una pudrición del plátano. **Agricultura Tropical**, Bogotá, v.12, p. 735-6, 1956.

CORTEZ, J.G. Aptidão climática para a qualidade da bebida nas principais regiões cafeeiras de Minas Gerais. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 18, n. 187, p. 27-31, 1997.

ENCICLOPÉDIA dos municípios brasileiros. Rio de Janeiro: IBGE, 1959.

FRANK, H.A.; LUM, N.A.; DELA CRUZ, A.S. Bacteria responsible for mucilage layer decomposition in Kona coffee cherries. **Applied Microbiology**, New York, v. 13, p. 201-207, 1965.

FOOD DRUGS ADMINISTRATION- Bacteriological Analytical Manual, AOAC International, 1972.

JONES, K.L.; JONES, S.E. Fermentations involved in the production of cocoa, coffee and tea. **Progress Industrial Microbiology**, Amsterdam, v. 19, p.411-56, 1984.

KRUG, H.P. Cafés duros. **Revista do Instituto do Café**, São Paulo, v.25, n.159, p. 636-638, maio 1940.

KRUG, H.P. Conceção moderna sobre a origem dos cafés duros. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v.20, n.9/12, p.416-426, set./dez. 1945.

KRUG, H.P. Origem dos cafés duros. **Boletim da Agricultura**, São Paulo, v. 46, p. 397-406, 1947.

LACERDA, L.A.O.; MIARELLI, M.; DAVOLI, J.Z.; CARVALHO, R. de ; LOPES, I.C.; GUERRA NETO, E.G.; KANASHIRO, J.K.; LUZIN, N.R.; SANTINATO, R.; CORTEZ, J.G.; PAES DE CAMARGO, A.; TEIXEIRA, A.A. Influência dos sistemas de colheita e preparo, na qualidade do café, nas diferentes regiões cafeeiras do Estado de São Paulo- resultados preliminares. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEIRAS, 12., 1985, Caxambu. **Trabalhos apresentados...** Rio de Janeiro: IBC, 1985. p. 210-214.

LIARDON, R.; SPADONE, J.C.; BRAENDLIN, N.; DENTAN, E. Multidisciplinary study of Rio flavour in Brazilian green coffee. In: **ASIC, 13 Colloque**, Paipa, 1989, p.117-126.

MENCHÚ, J.F.; ROLZ, C. Coffee Fermentation Technology. **Café, Cacao Thé**, Paris, v. 17, n.1, p.53-61, Jan./Mar. 1973.

MISLIVEC, P.B.; BRUCE, V.R.; GIBSON, R. Incidence of Toxigenic and other Molds in Green Coffee Beans. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.46, n.11, p. 969-973, Nov. 1983.

PELCZAR Jr, J.M.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. **Microbiologia**: [conceitos e aplicações], vol. I, 2 ed., 1996, 524p.

POISSON, J.; CAHAGNIER, B.; MULTON, J.L.; HAHN, D.; CORTE DOS SANTOS, A. Microflora of coffee: method of counting, and influence on organoleptic properties. In: **INTERNATIONAL COLLOQUIUM ON THE CHEMISTRY OF COFFEE**. ASIC, 1976. p. 311-321.

- PONTING, J.D.; JOSLING, M.A. Ascorbic acid oxidation and browning in apple tissue extracts. *Archives of Biochemistry*, New York, v.19, p. 47-63, 1948.
- PUERTA QUINTERO, G.I. Evaluación de la calidad del café colombiano processado por vía seca. *Cenicafé*, Chinchiná, v.47, n.2, p. 85-90, abr./jun.1996.
- SIVETZ, M.; DESROSIER, N.W. *Coffee technology*, Westport: AVI, 1979. 716 p.
- STEEL, R.G.D.; TORRIE, J.A. *Principles and procedure of statistics*. 2. ed. New York: Mc GrawHull, 1980. 633 p.
- VAN PEE, W.; CASTELEIN, J.M. Study of the pectinolytic microflora, particularly the Enterobacteriaceae, from fermenting coffee in the Congo. *Journal of Food Science*, Chicago, v.37, n.2, p.171-174, Mar./Apr.1972.
- VAN PEE, W.; CASTELEIN, J.M. The yeasts flora of fermenting robusta coffee. *East African Agricultural and Forestry Journal*, Nairobi, v.26, n.3, p 308-310, Jan. 1971.
- VAUGHN, R.H.; CAMARGO, R. DE; FALLANGE, H.; MELLO AYRES, G.; SERGEDELLO, A. Observations on the microbiology of the coffee fermentation in Brazil. *Food Technology*, Chicago, v.12, p. 12-57, Apr. 1958. Supplement.
- WICKERHAM, L.J. *Taxonomic of Yeast*, Us, Dep. Agr. Tech. Bull., 1029p, 1951.
- WOELORE, W.M. Optimum fermentation protocols for arabica coffee under Ethiopian conditions. In: *SCIENTIFIC SYMPOSIUM ON COFFEE.*, Association Scientifique Internationale du Café, 1993, p. 727-733.

CAPÍTULO 3

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS, LEVEDURAS E FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS DE GRÃOS DE CAFÉ DA REGIÃO SUL DE MINAS GERAIS- BRASIL

RESUMO

SILVA, C.F. **Identificação e caracterização de bactérias, leveduras e fungos filamentosos isolados de grãos de café da região Sul de Minas Gerais - Brasil: Lavras: UFLA, 2000 (Dissertação- Mestrado em Ciência dos Alimentos)**

O Brasil é o maior produtor e exportador de café mundial e tem como padrão de processamento dos grãos de café a via seca. Sabe-se que há alta contaminação microbiana dos grãos de café durante as fases pré e pós colheita, mas poucos estudos foram feitos no sentido de se conhecer o possível papel de bactérias, leveduras e fungos filamentosos na fermentação do café. Este estudo objetivou o isolamento e a identificação das espécies microbianas, das quais pode-se conhecer aspectos fisiológicos e ecológicos. Um total de 754 isolados foram identificados em 41 gêneros e 61 espécies. Um total de 113 isolados de bactérias Gram negativas foram identificadas em 15 gêneros e 25 espécies. Os gêneros mais comuns encontrados foram *Aeromonas*, *Enterobacter* e *Pseudomonas*. Dos 23 isolados de bacterias Gram positivas esporuladas, foram identificadas seis espécies do gênero *Bacillus*. Bactérias Gram positivas não esporuladas foram identificadas como pertencentes ao gênero *Cellulomonas*. Do total de 107 leveduras isoladas, 90 foram identificadas em 23 espécies diferentes sendo quase todas leveduras fermentativas. Os gêneros mais comuns foram *Arxula*, *Pichia* e *Candida*. Quase todos os 292 isolados de fungos filamentosos foram identificados quanto ao gênero ou quanto a espécie. *Cladosporium* e *Fusarium* foram os fungos filamentosos mais abundantes, ocorrendo em frequência similar em todas as fazendas. *Aspergillus* e *Penicillium* tiveram uma pequena incidência. *Beauvaria* e *Monilia* foram ocasionalmente encontrados. A microflora encontrada é muito mais variada e complexa do que já foi previamente publicado para fermentações pela via úmida.

Comitê orientador: Dr^a Rosane Freitas Schwan- UFLA (Orientadora)
Dr. Eustáquio Souza Dias- UFLA (Coorientador)

ABSTRACT

SILVA, C.F. Identification and characterization of bacterias, yeasts and filamentous fungi isolated of coffee beans of the South area of Minas Gerais – Brazil Lavras: UFLA, 2000 (Dissertation of Master's degree in Food Science)

Brazil is the largest producer and exporter of coffee in the world and uses the dry method for processing coffee beans. It is known that there is a high level of microbial contamination of the coffee beans during the pre and post-harvest phases but no studies have been made simultaneously monitoring bacteria, yeasts and filamentous fungi during coffee fermentation. The aim of this study was to isolate and identify the microbial species in order to understand their physiological and ecological roles. A total of 754 isolates were identified into 41 genera and 61 species. A total of 113 isolated of Gram negatives bacteria were identified into 15 genera and 25 species. The most common genera found were *Aeromonas*, *Enterobacter* and *Pseudomonas*. The 23 isolates of Gram positive sporulating bacteria were identified into six species of the genus *Bacillus*. Over half of the Gram positive non-sporulating bacteria belonged to the genus *Cellulomonas*. Of the total of 107 yeasts isolated, 90 were identified into 23 different species which were mostly fermentative. The most common genera were *Pichia*, *Candida* and *Arxula*. Almost all the 292 isolates of filamentous fungi were identified to genus or species level. *Cladosporium* and *Fusarium* were the more abundant filamentous fungi, occurring at a similar frequency in all the farms. *Aspergillus* and *Penicillium* had a lower incidence. *Beauvaria* and *Monilia* were occasionally found. The microflora was found to be much more varied and complex than previously reported for wet coffee processing fermentations.

Guidance Committee: Ds. Rosane Freitas Schwan (UFLA)
Ds. Eustáquio Souza Dias (UFLA)

1 INTRODUÇÃO

A maioria dos microrganismos são heterotróficos e podem buscar, nos alimentos, sua fonte de energia, podendo crescer em diferentes tipos de substratos. A colonização por microrganismos nos alimentos pode ser desejável por contribuir com a produção de compostos que incrementem o "flavour", como em queijos, iogurtes, cacau, chucrutes. Entretanto, é também sabido que alguns grupos de microrganismos podem colonizar alimentos, causando sua deterioração (Pitt e Hocking, 1997).

Cada grupo microbiano pode realizar reações e produtos metabólitos de acordo com suas próprias necessidades nutricionais, as quais poderão ser influenciadas pelo ambiente, substrato, temperatura e relações bióticas. Estas condições podem contribuir para que um mesmo substrato seja utilizado por um grupo de microrganismos que os pré-dispõem a outros, ou seja, um grupo ou espécie de microrganismo utiliza o substrato de tal modo que o torna disponível (talvez menos complexo quimicamente) ao grupo seguinte, que irá colonizá-lo.

A composição da mucilagem dos grãos de café é um bom substrato para o desenvolvimento de microrganismos por apresentar 30% de açúcares redutores, 20% de não redutores, 35,8 % de pectina e 84,2% de água (Elias, 1978). A população de bactérias, fungos filamentosos e leveduras é notória e significativa em grãos de café durante as diferentes fases do processamento (Krug, 1947; Bitancourt, 1957; Alves e Castro, 1998). Existem indicações de que alguns tipos de bactérias e leveduras podem contribuir para a retirada da polpa de café através da degradação das substâncias pécticas (Bitancourt, 1957; Vaughn et al., 1958; Frank, Lum e Dela Cruz, 1965; Agate e Bhat, 1966; Van Pee e Castelein, 1972). Outros tipos de bactérias, entretanto, podem prejudicar a qualidade da bebida do café pela formação de ácidos que alteram o sabor e

aroma do café (Bitancourt, 1957). Algumas espécies de fungos filamentosos podem também apresentar risco para o consumidor devido à capacidade de produzirem toxinas (Nakamura, 1968; Pitt e Hocking, 1998). Apesar de reconhecida a participação dos diferentes grupos de microrganismos no processamento do café, poucos foram os estudos já relatados que mostraram o que a microbiota envolvida interfere ou pode contribuir com a qualidade final da bebida. No entanto, a confirmação ou não da presença destes grupos de microrganismos nos grãos de café não é suficiente para o conhecimento da atuação destes na qualidade da bebida e, quando atuam como e quando o fazem.

Objetivando-se o conhecimento da biologia e ecologia das espécies associadas ao café, foram identificadas espécies de bactérias, leveduras e fungos filamentosos isolados de grãos de café da região Sul de Minas Gerais.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Isolamento e conservação dos microrganismos

Os microrganismos (bactérias, leveduras e fungos filamentosos) foram isolados da superfície dos grãos de café, por diluição em água peptonada, em quatro diferentes estádios de maturação, de 15 fazendas localizadas no Sul de Minas Gerais. Para identificação de gêneros e espécies dos grupos microbianos, os isolados foram mantidos em meios de cultura sólidos específicos como PCA (triptona 0,5%; extrato de levedura 0,25%; glicose 0,1%; ágar 1,5%) para preservação de bactérias, YW (extrato de levedura 0,3%; extrato de malte 0,3%; peptona 0,5%; glicose 1%; ágar 1,3%) para leveduras e SNA (KH_2PO_4 0,1%; KNO_3 0,1%; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05%; KCl 0,05%; glicose 0,05%; sacarose 0,05%; ágar 1,5%) ou BDA (batata 25g; glicose 2%; ágar 1,5%) para fungos filamentosos e conservados a 4° C.

2.2 Identificação de bactérias

Os isolados bacterianos foram repicados para placas com meio PCA (triptona 0,5%; extrato de levedura 0,25%; glicose 0,1%; ágar 1,5%) e incubados a 28° C por 24 horas. A partir deste tempo, os isolados foram submetidos a testes de coloração de Gram e catalase. Pode-se, assim, subdividir os isolados em grupos (Gram positivos e Gram negativos) para realização de testes específicos objetivando a identificação das espécies.

2.2.1 Identificação de bactérias Gram negativas

Estes isolados foram identificados através de Kits do Sistema Bac-Tray I, II e III (Difco). Inicialmente foi realizado o teste para detectar a presença da enzima oxidase utilizando teste comercial Bactident Oxidase- 1.13300 - (MERCK). O teste de oxidase consiste na confirmação ou não desta enzima nos microrganismos.

Isolados Gram e catalase negativos foram inoculados no sistema Bac-Tray I e II e os Gram negativos e oxidase positivos nos kits do sistema Bac-Tray III. Cada Kit Bac- Tray consistiu de dez diferentes substratos contidos em um suporte de poliestireno descartável. As provas do sistema Bac-Tray I consistem de hidrólise da β galactosidase, dehidrolação da arginina, descarboxilação da lisina, descarboxilação da ornitina, produção de H_2S , presença de urease, produção de acetoina (VP), desaminação da fenilalanina, produção de indol e utilização de citrato. As reações do sistema Bac Tray II foram: utilização do malonato, utilização de ramnose, adonitol, arabinose, inositol e sorbitol, sacarose, manitol e rafinose com produção de ácido.

Reações de tolerância a cetrimida, utilização de acetamida, elevação do pH por malonato citrato, utilização de maltose, hidrólise da esculina, controle de intensidade de cor para o teste de arginina, dehidrolação da arginina, hidrólise da uréia, metabolização do triptofano resultando em indol, estão presentes no sistema Bac Tray III.

Para inoculação nas galerias do suporte foi realizada uma suspensão da cultura bacteriana com 24 horas de incubação, em 3 ml de água destilada estéril, tomando-se o cuidado de inocular pouco material para evitar turvação do meio. As galerias do Bac-Tray foram incubadas por 18- 24 horas a uma temperatura de 28° C. Para os testes de produção de acetoina (VP), desaminação da fenilalanina e produção de indol foi necessária a adição de reagentes específicos após a incubação para desenvolvimento de cor.

A identificação das espécies foi realizada pela soma dos resultados positivos, conforme o manual do fabricante (DIFCO). Tendo-se o código, determina-se a espécie por meio da análise de um software.

2.2.2 Identificação de bactérias Gram positivas

Os isolados de bactérias Gram positivas foram submetidos a um tratamento térmico (80° C/ 10 min ou fervura por 1 minuto) para induzir a esporulação. Foram então preparadas lâminas e por exame microscópico foram separadas as bactérias formadoras de esporos das não formadoras.

Para a identificação das espécies, foram realizados testes bioquímicos e de motilidade de acordo com as recomendações propostas no "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" (Holt et al., 1994).

Bactérias Gram positivas esporuladas foram identificadas conforme os resultados obtidos nos testes de motilidade a 37° C; redução de nitrato a nitrito, oxidação-fermentação de glicose; produção de indol, liquefação da gelatina a 22° C; utilização de citrato de Simmons; reação de Voges Proskauer; degradação da uréia; desaminação de fenilalanina; fermentação de carboidratos (glicose, manitol, arabinose e xilose); crescimento em NaCl a 7,5 % e hidrólise de amido.

Bactérias Gram positivas não esporuladas foram identificadas segundo os resultados dos testes de hemólise em ágar sangue a 5%; oxidação-fermentação de glicose; redução de nitrato a nitrito; motilidade a 22°C; fermentação de carboidratos (glicose, lactose, sacarose, maltose, salicina, manitol, trealose e xilose); reação de Voges- Proskauer; liquefação da gelatina a 22° C; degradação da uréia; arginina dehidrolase e produção de H₂S.

Todos os isolados foram inoculados nos meios específicos a partir de repiques com 24 horas de incubação.

2.3 Identificação de fungos leveduriformes

Os fungos leveduriformes foram identificados com base em testes bioquímicos e chaves dicotômicas propostas por Kurtzman e Fell (1998).

As colônias de leveduras repicadas em meio YW (extrato de levedura 0,3%; extrato de malte 0,3%; peptona de soja 0,5%; glicose 1%; ágar 1,3%, água destilada 100 ml - pH 3.5) e incubadas a 28°C, por 24 horas, foram transferidas para tubos "eppendorf" com água destilada estéril para esgotamento das reservas energéticas das células leveduriformes.

Estas suspensões, após 24 horas, foram transferidas para uma placa de mármore estéril com 20 perfurações. Com um sistema de "carimbo", as colônias foram inoculadas em placas com meios para testes de assimilação de carboidratos (glicose, galactose, sacarose, maltose, celobiose, trealose, lactose, melibiose, rafinose, melicitose, inulina, amido solúvel, xilose, L e D arabinose, D- ribose, L- rarnnose, glicerol, eritritol, ribitol, galactitol, manitol, glucitol, salicina, L-K-d- glucanal, succinato de sódio, citrato de sódio, inositol, metanol) e nitrogênio (nitrato de potássio, lisina), etilamina, resistência a cicloheximida, crescimento em meio sem vitamina e teste de osmolaridade. Testes de fermentação em meio líquido com glicose, sacarose, maltose e galactose e crescimento a 35 e 37° C, em tubos de ensaio, também foram realizados.

As placas com meio de cultura para os testes de assimilação foram incubadas à temperatura de 28° C e a leitura dos resultados foi realizada em intervalos de 7 a 21 dias. Os resultados foram analisados comparando-se o crescimento das colônias com controle positivo e negativo. Valores numéricos foram atribuídos ao crescimento microbiano, sendo 0 colônia igual ao controle negativo; 1 colônia igual ao controle positivo; 2 colônia o dobro do tamanho da colônia no controle positivo e 3 o triplo ou maior que o tamanho da colônia comparado ao controle positivo.

As leituras dos testes de fermentação de carboidratos em meio líquido e

crescimento a 35 e 37° C foram realizadas após 24, 48 e 72 horas e após 7, 14 e 21 dias de incubação. Os dados obtidos da fermentação de carboidratos referiam-se à produção de ácido e quantificação da produção de CO₂ (pelo deslocamento do meio líquido nos tubos de Dühran). A quantificação do crescimento nas duas temperaturas de incubação foi realizado comparando-se a turvação dos tubos inoculados com um controle (sem inoculação).

2.4 Identificação de fungos filamentosos

Para identificação dos gêneros de fungos filamentosos foram comparadas características em microscopia e morfologia de colônias segundo Booth (1971), Nelson, Toussoun e Marasas, (1983), Barnett e Hunter (1987), Pitt e Hocking (1997).

2.4.1 Identificação de fungos filamentosos do gênero *Penicillium* Link

Para identificação de colônias do gênero *Penicillium*, foram preparadas lâminas coradas simples procurando a identificação da estrutura característica conhecida como penicílios. Confirmado o gênero, as colônias foram inoculadas nos meios G25N (K₂HPO₄ 0,75% g/ 100ml; concentrado Czapek (NaNO₃ 3%; KCl 0,5 %; MgSO₄.7H₂O 0,5%; FeSO₄.7H₂O 0,01%; água 100 ml) 0,25%; extrato de levedura 0,37%; glicerol 25%, ágar 1,2%), MEA (extrato de malte 2%; peptona 0,1%, glicose 2%; ágar 2% - pH 5,6) e CYA (NaNO₃ 0,3%; K₂HPO₄ 0,1%; KCl 0,05%; MgSO₄.7H₂O 0,001%; extrato de levedura 0,5%; sacarose 3% ágar 2% - pH 6- 6,5) e CSN (concentrado de creatina- sacarose 1%; sacarose 1%; creatina 0,5%; KH₂PO₄ 0,1%; púrpura de bromocresol 0,005%; ágar 1,5%), segundo as recomendações de Pitt e Hocking (1997).

Os repiques para identificação da espécie foram realizados com palitos

de madeira estéreis em três pontos da placa de Petri, retirando-se da colônia de origem somente esporos. A inoculação foi feita com a placa invertida, evitando-se assim a germinação de esporos fora dos pontos de inoculação. As placas foram incubadas por 7 dias a 28° C. Após este período, foram observados os diâmetros das colônias, presença ou não de exsudatos, aparência da colônia (rala, pregueada, alta, etc), coloração (frente e reverso da placa).

A análise microscópica foi realizada pelo preparo de lâminas coradas simples das porções centrais e periféricas das colônias. Para o preparo, foi tomada uma porção da colônia com ágar, e esta lavada com gotas de álcool a fim de se eliminar excesso de esporos e diminuir a tensão superficial dos mesmos.

Nas colônias crescidas no meio de cultura G25N, observou-se microscopicamente a ramificação dos penicílios, se mono, bi ou triverticilados. Para cada grupo com estas características, foi utilizada uma chave dicotômica diferente como recomendado por Pitt e Hocking (1998).

No meio CSN foi observado o crescimento das colônias repicadas além da produção ou não de substâncias alcalinas, neutras ou ácidas de acordo com a cor apresentada ao redor e verso das colônias.

Nos meios de cultura MEA e CYA foram observadas características microscópicas como forma e rugosidade dos esporos, rugosidade das estipes, e tamanho dos esporos, quando possível.

2.4.2 Identificação de fungos filamentosos do gênero *Fusarium* Link

Para identificação de isolados pertencentes ao gênero *Fusarium* fizeram-se lâminas coradas simples procurando a identificação de conídios em forma de barcas. Confirmado o gênero, as colônias foram inoculadas nos meios de cultura OA (aveia 3%; ágar 1,5%) e SNA (KH₂PO₄ 0,1%; KNO₃ 0,1%; MgSO₄. 7H₂O 0,05%; KCl 0,05%; glicose 0,05%; sacarose 0,05%; ágar 1,5%), como proposto

por Nelson, Toussoun e Marasas, (1983).

Nas placas de OA e SNA colocaram-se, aderido ao meio, pedaços de papel de filtro estéril (2x2 cm). O repique das culturas foi realizado em linha reta junto ao papel de filtro, e estas foram incubadas à temperatura ambiente para placas com AO e em 20 ° C, em fotoperíodo de 12/ 12 horas, sob luz negra, para placas com SNA.

No meio OA foi observada a coloração da colônia, presença ou não de micélio aéreo, presença ou não de esporodóquios e crescimento. Nas placas com meio de cultura SNA, os dados analisados microscopicamente referem-se ao tamanho dos macroconídios e microconídios (quando presentes), origem dos macroconídios e microconídios (quando presentes), origem dos macroconídios, mono ou polifiálides, célula basal e apical dos macroconídios e arranjo dos microconídios.

Para a identificação das espécies foi utilizada a chave sinóptica proposta por Nelson , Toussoun e Marasas (1983) e/ou chave dicotômica proposta por Booth (1971).

2.4.3 Identificação de fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* Fr.:Fr.

A identificação do gênero *Aspergillus* foi realizada mediante o preparo de lâminas coradas simples e observadas ao microscópio. Confirmado o gênero, observaram-se características como coloração da colônia, crescimento e vesículas, conforme o proposto por Pitt e Hocking (1997) para identificação da espécie.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um total de 754 microrganismos foram isolados, incluindo bactérias, leveduras e fungos filamentosos. Todos os isolados foram agrupados em bactérias Gram negativas (164), bactérias Gram positivas (191), leveduras (107) e fungos filamentosos (292). Todos estes isolados foram submetidos aos testes para identificação, mas alguns não puderam ser cultivados facilmente (por exemplo, lactobacilli em meio PCA) e alguns outros não puderam ser prontamente identificados. Um total de 612 isolados de bactéria, leveduras e fungos filamentosos foram identificados quanto ao gênero.

Nos trabalhos de Pederson e Breed (1946) com cafés mexicanos e colombianos e de Roussos et al. (1995), a proporção de isolamentos de bactérias também foi maior que a de fungos leveduriformes e filamentosos. Opondo-se a estes resultados, Agate e Bhat (1966) obtiveram, dos isolamentos da superfície de grãos de café robusta na Índia, maior incidência de leveduras que bactérias.

A maior incidência de isolamentos bacterianos na superfícies dos grãos pode ser atribuída ao contato com o ar. Agate e Bhat (1966) observaram que a flora bacteriana que fermentava os grãos em contato com o ar era maior, enquanto nos grãos fermentados asépticamente decrescia a incidência de bactérias.

A oscilação da ocorrência da flora microbiana também pode ser associada à oscilação do pH durante a fermentação da mucilagem, por via úmida. Com o aumento de acidez, ocorre o decréscimo de bactérias e aumento de leveduras (Agate e Bhat, 1966). Silva et al. (2000) (dados não publicados) também observaram, em grãos de café processados por via seca, predomínio da flora bacteriana no início da secagem, com decréscimo durante a seca e incremento da flora leveduriforme. Assim, leveduras atuam na degradação da

mucilagem na ausência ou decréscimo da flora bacteriana (Agate e Bhat, 1966).

3.1 Espécies bacterianas Gram negativas

Dos 254 isolados bacterianos em estudo de identificação, 113 foram Gram negativos (44,5%), 23 Gram positivos esporulados (9%) e 118 Gram positivos não esporulantes (46,5%). Dos isolados bacterianos com coloração de Gram negativos, obtiveram-se 15 gêneros, listados na Tabela 1, e 25 espécies.

TABELA 1 Número de isolados dos gêneros de bactérias Gram negativos isolados da superfície de grãos de café da região Sul de Minas Gerais. Porcentagem entre parênteses.

GÊNERO	Número	GÊNERO	Número
<i>Aeromonas</i>	30 (26,7)	<i>Chromobacterium</i>	2 (1,74)
<i>Enterobacter</i>	24 (20,9)	<i>Pasteurella</i>	2 (1,74)
<i>Pseudomonas</i>	22 (20)	<i>Salmonella enterica</i> var. <i>arizonae</i>	2 (1,74)
<i>Serratia</i>	8 (7)	CDC grupo II k	2 (1,74)
<i>Tatumella</i>	4 (3,5)	<i>Cedecea sp 5</i>	1 (0,9)
<i>Hafnia</i>	4 (3,5)	<i>Acinetobacter</i>	1 (0,9)
<i>Flavobacterium</i>	3 (2,6)	<i>Citrobacter</i>	1 (0,9)
<i>Klebsiella</i>	3 (2,6)	<i>Shigella</i>	1 (0,9)
<i>Salmonella</i>	2 (1,74)	CDC grupo IIk 2	1 (0,9)

Alguns gêneros representantes da família Enterobacteriaceae, *Klebsiella*, *Enterobacter cloacae*, *E. aerogenes*, *Hafnia* e *Flavobacterium*, também foram encontradas em cafés robusta por Van Pee e Castelein (1972), Agate e Bhat (1966), e Frank, Lum e Deal Cruz (1965) em cafés, no Havai, processados por via úmida.

Setenta e seis isolados incluídos no grupo de bactérias Gram negativas pertenceram a somente três gêneros: *Aeromonas*, *Enterobacter* e *Pseudomonas*. *Aeromonas*, o gênero mais freqüente (30 isolados), não foi identificado até espécie pelos kits utilizados. O gênero *Enterobacter* apresentou as espécies *E. cloacae* (14), *E. aerogenes* (7), *E. sakasaki* (2) e *E. gergoviae* (1). O gênero *Pseudomonas* (22) apresentou o maior número de espécies identificadas, sendo: *P. paucimobilis*. (11), *P. pseudoalcaligenes* (6), *P. cepacia* (2), *P. vesiculares* (1), *P. fluorescens* (1) e *P. aeruginosa* (1). O quarto gênero mais freqüente, *Serratia* (8), foi representado por *S. liquefaciens* (5), *S. plymuthica* (2) e *S. marcescens* (1).

As demais espécies bacterianas Gram negativas identificadas foram *Klebsiella ozaenae* (1 isolado), *K. oxytoca* (2), *Hafnia alvei* (4), *Flavobacterium odoratum* (3), *Tatumella ptyseos* (4), *Salmonella paratyphi* (1), *S. choleraesuis* (1), *Shigella dysenteriae* (1), *Citrobacter freundii* (1), *Pasteurella haemolytica* (2), *Chromobacterium violaceum* (2), *Cedecea* sp 5 (1).

Dos 15 gêneros identificados, 10 (66,7%) são oxidase negativos e 5 oxidase positivos (33,3%).

Os quatro gêneros Gram negativos mais freqüentes e suas incidências nos quatro estádios de maturação e processamento dos grãos de café amostrados podem ser observados na Tabela 2.

Foi observada uma maior incidência nos estádios seco no pé e seco em terreiro para os gêneros *Aeromonas*, *Enterobacter* e *Pseudomonas*, e, em *Serratia*, maior incidência no início da maturação e processamento.

As bactérias encontradas neste trabalho representam uma grande variedade de gêneros e espécies. Para o grupo das Gram negativas, em particular, a maioria das publicações referem-se a aspectos clínicos, enquanto a sua participação no meio ambiente ou ecologia não está ainda bem estabelecida (Ballows et al., 1992). *Aeromonas* pode ser amplamente encontrada na natureza, incluindo em materiais vegetais e em decomposição. *Enterobacter* também facilmente encontrada em solos, água e esgoto, e é fenotipicamente similar a *Erwinia*, mas não secreta pectinases. *Pseudomonas* é fitopatogênica e vastamente encontrada em plantas, principalmente em folhas e rizostera. *Serratia* pode ser encontrada em solos, água e plantas, e frequentemente está associada com pequenos mamíferos e insetos. Alguns isolados foram identificados como *Shigella* e *Salmonella*, que são patógenos humanos. Outras bactérias, como pertencentes a *Tatumella*, *Cedecea* e grupos CDC III, foram somente isoladas, até o presente, de seres humanos. Isto sugere um alto índice de

GÊNEROS	ESTÁDIOS DE MADURAÇÃO E PROCESSAMENTO			
	Cereja	Passa	Seco no pé	Seco terreno
<i>Aeromonas</i>	3 (10)	4 (13,3)	12 (40)	11 (36,7)
<i>Enterobacter</i>	1 (4,1)	4 (16,7)	7 (29,2)	12 (50)
<i>Pseudomonas</i>	3 (13,6)	2 (9,1)	9 (40,9)	8 (36,4)
<i>Serratia</i>	3 (37,5)	4 (50)	1 (12,5)	0

TABELA 2 Número de isolados bacterianos Gram negativos nos quatro estádios de maturação e processamento amostrados. Porcentagem entre parênteses

contaminação pelos trabalhadores da fazenda ou que o café representa um ambiente natural de patógenos oportunistas.

3.2 Espécies bacterianas Gram positivas

Dos 23 isolados bacterianos Gram positivos esporulantes (gênero *Bacillus*), foi possível identificar à espécie de apenas 47,8% (11). Foram encontrados *Bacillus subtilis* (3 isolados), *B. cereus* (2), *B. anthracis* (2), *B. megaterium* (2), *B. stearothermophilus* (1) and *B. laterosporus* (1). Vaughn et al. (1958) demonstraram a atividade pectinolítica de *Bacillus*, porém enfatizam a ação de bactérias Gram negativas na degradação da mucilagem dos grãos de café.

A ocorrência do gênero *Bacillus* foi predominante nos estádios finais da maturação e processamento, ou seja, nos estádios seco no pé e em terreiro. As espécies *B. cereus* e *B. laterosporus* foram as únicas com ocorrência no estágio cereja, 50 e 100 %, respectivamente, e *B. stearothermophilus* no estágio passa (100%).

Espécies do gênero *Bacillus* são encontrados tipicamente em amostras de solo. Estas bactérias podem secretar uma ampla variedade de enzimas degradativas, algumas das quais são celulases, amilases e proteases, podendo ser importantes no processo de fermentação.

Para a identificação dos isolados bacterianos Gram positivos não esporulados, os testes não se mostraram satisfatórios, pois a metodologia usada visa a identificação de bactérias do ácido láctico (BAL), principalmente *Lactobacillus*. Os 118 isolados de bactéria Gram positivas não esporuladas incluíram: *Cellulomonas* (64 isolados), *Arthrobacter* (13), *Microbacterium* (6), *Brochothrix* (5), *Dermabacter* (4), *Lactobacillus* (2) e 24 isolados não foram identificados. Perderson e Breed (1946) identificaram BAL, destacando

Lactobacillus plantarum, *L. brevis*, *Leuconostoc mesenteroides* e *Streptococcus faecalis* em cafés mexicanos e colombianos, nos quais o processamento dos grãos é feito por via úmida.

A presença do gênero *Lactobacillus* foi confirmada em apenas 1,7% dos isolados Gram positivos não esporulados identificados e à de *Microbacterium*, em 5,1% dos isolados. A ocorrência de *Lactobacillus* é a menor, se comparada aos demais gêneros prováveis. Assim, estes microrganismos não devem ser responsáveis por mudanças químico-físicas dos grãos, já que quando abundantes não se demonstraram auto suficientes no desprendimento da mucilagem (Pederson e Breed, 1946).

As bactérias Gram positivas identificadas podem ser encontradas em vários ambientes. *Cellulomonas*, a mais abundante deste grupo, pode ser encontrada amplamente no solo e em plantação de cana de açúcar, sendo capaz de degradar a celulose. *Arthrobacter*, normalmente encontrada em solos ácidos (como nesta região que foi amostrada), é encontrada em superfície de folhas. Este gênero de bactéria utiliza uma grande variedade de carboidratos, mas tem sido caracterizada como psicrófila. *Microbacterium* e *Brochothrix* são bactérias similares e, por fermentação, produzem ácido láctico. Em recente trabalho publicado por Blandón-Castaño, Rodríguez-Valencia e Dávial-Arias (1998) sobre compostagem, utilizando resíduo da polpa de café, foi encontrada uma grande variedade de gêneros de bactérias, incluindo muitos patógenos oportunistas.

3.3 Espécies de fungos leveduriformes

Dos 107 isolados leveduriformes, 90 foram identificadas em 23 espécies, sendo os gêneros mais incidentes *Pichia* (38,9%), *Candida* (22,2%), *Arxula* (18,9%) e *Saccharomycopsis* (6,7%).

As espécies de todos os isolados de leveduras identificados foram: *Pichia ojsuensis* (16 isolados), *P. sydowiorum* (2), *P. anomala* (3), *P. jadinii* (2), *P. lyngbyi* (4), *P. ciferrii* (3), *P. acaciae* (1), *Pichia* sp (4), *Arxula adeniniworans* (17), *Candida incommunis* (3), *C. schajarii* (1), *C. auringsensis* (1), *C. patidigena* (2), *C. glucosophyla* (1), *C. varivovarae* (2), *Candida* sp (10), *Saccharomyces fibuligera* (3), *Saccharomyces fermentans* (3), *Sporopachydermia cereana* (1), *Williopsis saturnus* var. *saturnus* (1), *Blasibobotrys proliferans* (1), *Trichosporonoides oedocephalis* (1), *Geotrichum fermentans* (1), *Citeromyces matritensis* (1), *Saccharomyces cerevisiae* (4),

GÊNEROS	ESTÁDIOS DE MADURAÇÃO E PROCESSAMENTO			
	Cereja	Passa	Seco pé	Seco terreno
<i>Pichia</i>	7 (20)	7 (20)	4 (11,4)	17 (48,6)
<i>Candida</i>	3 (15)	4 (20)	4 (20)	9 (45)
<i>Arxula</i>	1 (5,9)	3 (17,6)	6 (35,3)	7 (41,2)
<i>Saccharomyces</i>	3 (50)	2 (33,3)	0	1 (16,7)

TABELA 3 Número de isolados dos quatro gêneros de leveduras mais incidentes nos quatro estádios de maturação e processamento dos grãos de café. Porcentagem entre parênteses.

A incidência dos gêneros *Pichia*, *Candida*, *Arxula* e *Saccharomyces* nos quatro estádios de maturação e processamento encontra-se na Tabela 3. A ocorrência destes quatro gêneros de leveduras não apresenta correlação com os estádios de maturação e processamento.

Schizosaccharomyces sp (3).

Van Pee e Castelein (1971), em cafés robustas, isolaram e identificaram, da superfície dos grãos, *Candida guilliermondii* (*Pichia guilliermondii*), *Candida parapsilosis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulopsis famata* (*Debaryomyces hansenii* (Zopf) Lodder e Kreger van Rij. Var. *hansenii* (1985)), *Saccharomyces marxianus* (*Kluyveromyces marxianus* (E.C. Hansen) van der Walt (1971)).

Quase todas as espécies de leveduras identificadas já foram isoladas de solos, frutos, plantas e dejetos de insetos (Kurtzman e Fell, 1998), podendo ser, portanto, encontradas também em processamento de café. Alguns isolados identificados não são comuns ou ainda não foram encontrados em muitos ambientes. Um resultado surpreendente deste trabalho foi a detecção, isolamento e identificação de *Arxula adenivorans* em 8 das 15 fazendas amostradas. Esta levedura é relativamente rara e descrita anteriormente como participante da microbiota do solo e de silagem (Kurtzman e Fell, 1998). Esta levedura pode crescer em temperaturas elevadas como, por exemplo, 45° C e pode secretar enzimas incluindo pectinases, celobiasas 1 e 2, xilosidades, fosfatase ácida, Rnases e algumas proteases (Kunze e Kunze, 1996).

3.4 Espécies de fungos filamentosos

Duzentos e sessenta e oito isolados de fungos filamentosos foram identificados quanto ao gênero (Tabela 4) e 61 foram identificados quanto à espécie (Tabela 5).

Dos 268 isolados de fungos filamentosos, 45,9% pertenceram ao gênero *Cladosporium*, 38,8% a *Fusarium*, 13,1% a *Penicillium* e 2,2% a *Aspergillus*, sendo estes gêneros já registrados em café por Alves (1996), Roussos et al. (1995), Abdel- Hafez e El- Magharaby (1992), Carvalho, Chalfoun e Chagas (1989), Daivasikamani e Kannan (1986), Mislivec, Bruce e Gibson (1983).

Em grãos verdes, Mislivec, Bruce e Gibson (1983) justificaram que a menor incidência de *Penicillium* e *Fusarium* se dá porque altas temperaturas encontradas nas regiões do trópicos limita o crescimento destes fungos. *Aspergillus*, com menor ocorrência, neste trabalho, em grãos verdes, apresentaram maiores incidências no citado trabalho. Segundo Pitt e Hocking (1997) *Aspergillus* compete por substrato com *Fusarium* e *Penicillium* e só tem sua incidência incrementada em ambientes com altas temperaturas e baixa atividade de água.

A predominância de grupos, gêneros e espécies microbianas, em diferentes estádios de maturação e processamento, reforça a idéia de sucessão ecológica em grãos de café segundo a variação ambiental, sazonal e substrato disponível.

Não se fez a identificação da(s) espécie(s) dos 29 isolados selecionados de *Cladosporium*. Espécies de *Penicillium*, *Fusarium* e *Aspergillus* encontram-se na Tabela 5.

TABELA 4 Incidência dos gêneros de fungos filamentosos isolados de grãos de café em 11 fazendas amostradas na região Sul de Minas Gerais.

Fazendas	Gêneros identificados			
	<i>Aspergillus</i>	<i>Cladosporium</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Penicillium</i>
1	2	22	26	6
2	1	12	5	4
3	1	7	11	5
4	0	6	10	3
5	0	11	7	0
6	0	16	7	0
11	0	10	6	1
12	0	15	9	0
13	2	8	7	3
14	0	6	11	4
15	0	10	5	9

TABELA 5 Ocorrência das espécies de *Penicillium*, *Fusarium* e *Aspergillus* isoladas das superfícies dos grãos de café da região Sul de Minas Gerais.

ESPÉCIES	%
<i>Penicillium</i>	
<i>crustosum</i>	66,8
<i>restrictum</i>	14,3
<i>implicatum</i>	9,5
<i>citrinum</i>	4,7
Não identificado	4,7
TOTAL	100
<i>Fusarium</i>	
<i>stilboides</i>	80
<i>semitectum</i>	20
TOTAL	100
<i>Aspergillus niger</i>	100

Quinze isolados fúngicos não foram identificados. Outros gêneros encontrados em menor frequência, mas já isolados de café, também foram identificados, como *Monilia* (fazenda 5 e 15), *Beauveria* (fazenda 4) e *Arthrobotrys* (fazenda 14).

Das espécies identificadas neste trabalho, *Penicillium citrinum* foi identificado por Mislivec, Bruce e Gibson (1983) em 0,7% dos isolados de cafés brasileiros, verificando-se, portanto, baixa ocorrência nos dois trabalhos. *Fusarium semitectum* e *F. stilboides* já foram identificados e citados por Booth (1971) e Gordon (1960) em cafés arábicas e robustas.

No meio de cultura G25N, *Penicillium crustosum* Thom apresentou-se triverticilado, *P. restrictum* J.C. Gilman & E.V. Abbott e *P. implicatum* Biourge monoverticilados e, *P. citrinum* Thom mono e biverticilados. Em meio de cultura CSN, somente *Penicillium restrictum* não produziu compostos que provocassem a mudança da cor azul para amarela.

As características diagnósticas nos meios MEA e CYA de *Penicillium crustosum*, *Penicillium restrictum*, *P. implicatum* e *P. citrinum* encontram-se na Tabela 6.

Características diagnósticas de *Fusarium stilboides* Wollenw e *F. semitectum* Berk. & Rav. encontram-se na Tabela 7.

A identificação da espécie de *Aspergillus* foi confirmada pela presença de conídios esféricos pretos, vesículas nascendo de métulas e fiáldes e crescimento vigoroso em CYA.

A ocorrência das espécies de fungos filamentosos e os estádios de maturação e processamento dos grãos de café encontram-se na Tabela 8.

Cladosporium (dados não mostrados) foi o gênero com maior incidência nos primeiros estádios de maturação. Bitancourt (1957) relata que a colonização dos frutos por este fungo se faz quando os frutos ainda estão presentes na planta, o que também foi observado neste trabalho. Isso pode ser explicado pela resistência dos conídios à luz solar (Pitt e Hocking, 1997).

TABELA 6 Características diagnósticas de espécies de *Penicillium* isoladas de grãos de café da região Sul de Minas Gerais.

Características	<i>P. crustosum</i>		<i>P. restrictum</i>		<i>P. implicatum</i>		<i>P. citrinum</i>	
	MEA	CYA	MEA	CYA	MEA	CYA	MEA	CYA
Diâmetro médio (mm)	35	34,6	19,4	27	25	27	19,7	27
Coloração micélio	VAC ¹	AM	VO ⁴	AC ⁶	VAC	AC	CEE ⁸	Acl ⁹
Coloração reverso	AM ²	Vam ³	C ⁵	Amr ⁷	AM	AM	C	Am
Exsudato	Ausente	Presente	Ausente	Presente	Ausente	Presente	Ausente	Presente
Esporos	Esféricos lisos	-	Esféricos lisos	-	Esféricos lisos	-	Esféricos lisos	-
Estipe	Rugosa	-	Rugosa	-	Pouco Rugosa	-	Rugosa	-

¹VAC= verde azul claro; ² AM= amarelo; ³ Vam= verde com amarelo; ⁴ VO= verde oliva; ⁵C= cinza; ⁶ AC= azul acinzentado; ⁷ Amr= amarelo e marrom; ⁸ CEE= cinza esverdeado escuro; ⁹ Acl= azul claro.

TABELA 7 Características diagnósticas de espécies de *Fusarium* isoladas de grãos de café da região Sul de Minas Gerais.

Características	<i>Fusarium semitectum</i>	<i>Fusarium stilboides</i>
Micélio aéreo	Presente	Presente
Cor do micélio aéreo	“bronzado”	Vermelho carmim
Microconídios	Poucos a ausente	Ausente
Macroconídios (forma)	Ligeiramente curvados	Fusiforme
Clamidósporos	Presente	Presente
Esporodóquio	Ausente	Presente
Conidióforos	Polifiálides	Polifiálides

Penicillium citrinum responde com 100% de ocorrência no estado cereja, porém representa somente um isolado. *P. restrictum* e *P. implicatum* somam 3 e 2 isolados, respectivamente. A presença de *Penicillium citrinum* em grãos cereja talvez possa ser explicada pela necessidade de alta atividade de água para crescimento, opondo-se a *P. implicatum*, o mais xerófilo dos isolados de *Penicillium*, com capacidade germinativa a a_w 0,78 (Pitt e Hocking, 1997) e encontrado no estágio mais seco dos grãos.

ESPECIES	ESTÁDIOS DE MADURAÇÃO E PROCESSAMENTO			
	Cereja	Passa	Seco pé	Seco terreno
<i>Penicillium</i>				
<i>crustosum</i>	14 (58,3)	2 (8,4)	3 (12,5)	5 (20,8)
<i>restrictum</i>	0	0	3 (100)	0
<i>implicatum</i>	0	0	0	2 (100)
<i>citrinum</i>	1 (100)	0	0	0
<i>Fusarium</i>				
<i>stilboides</i>	1 (5)	5 (25)	9 (45)	5 (25)
<i>semitectum</i>	0	1 (20)	3 (60)	1 (20)
<i>Aspergillus niger</i>	0	2 (33,3)	2 (33,3)	2 (33,3)

TABELA 8 Ocorrência das espécies de *Penicillium*, *Fusarium* e *Aspergillus* nos quatro estádios de maturação e processamento dos grãos de café. Porcentagem entre parênteses.

Fusarium stilboides e *F. semitectum* apresentaram a mesma tendência, ou seja, ocorrência em todos os estádios, com maior incidência nos estádios seco no pé e seco em terreiro. Em sua tese, Meirelles (1990) também registrou a incidência de *Fusarium* em todos os estádios de maturação e processamento, com exceção do estádio verde, no qual a presença de tanino e lignina limitam o crescimento fúngico. A alta incidência de *Fusarium* pode ser justificada pela alta capacidade de penetração e colonização destes fungos (Krug, 1947).

Seis isolados de *Aspergillus niger* foram encontrados nos estádios passa, seco no pé e seco em terreiro. *Aspergillus niger* é facilmente isolado de alimentos e alimentos secos no sol devido à resistência dos esporos negros à luz solar e UV (Pitt e Hocking, 1997).

Pitt e Hocking (1997) relataram a competição entre *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*. O desenvolvimento de *Aspergillus* se faz predominantemente em ambientes com altas temperaturas e baixa atividade de água, condições ideais encontradas nos finais de processamentos e beneficiamento e em locais de armazenamento.

A ocorrência destes gêneros de fungos filamentosos em grãos de café pode deteriorar a qualidade da bebida produzida, exceto a presença de *Cladosporium*, cuja análise sensorial de grãos por eles colonizados, revelaram bebidas de boa qualidade (Alves e Castro, 1998; Carvalho, Chalfoun e Chagas, 1989; Bitancourt, 1957 e Krug, 1940)

A ocorrência de fungos filamentosos deve ser cada vez mais relevante quanto à segurança do produto para o consumidor. Dos fungos isolados e identificados neste trabalho, são relatados como toxigênicos as espécies *Fusarium semitectum* (Pitt e Hocking, 1997; Nelson, Toussoun e Marasas, 1983); *Aspergillus niger* (Pitt e Hocking, 1997), *Penicillium crustosum* (Pitt e Hocking, 1997) e *Penicillium citrinum* (Pitt e Hocking, 1997).

4 CONCLUSÕES

A partir dos isolamentos e identificações dos gêneros e espécies da microbiota da superfície dos grãos de café, conclui-se:

- ✓ Do total de 754 microrganismos isolados da superfície dos grãos de café, 612 foram identificados quanto ao gênero e/ou quanto à espécie.
- ✓ A diversidade microbiana encontrada compreendeu 22 gêneros e 31 espécies de bactérias, 12 gêneros e 23 espécies de leveduras e 7 gêneros e 7 espécies de fungos filamentosos.
- ✓ A população de bactérias Gram negativas apresentou maior diversidade em número de espécies do que as Gram positivas.
- ✓ A maioria dos isolados bacterianos e leveduriformes foram fermentativas, algumas bactérias isoladas produzem celulases e espécies de leveduras e fungos filamentosos podem apresentar atividade pectinolítica.
- ✓ Foi observada uma aparente sucessão ecológica entre bactérias e leveduras e entre gêneros de fungos filamentosos.



5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-HAFEZ, A.I.I.; EL- MAGHRABY, O.M.O. Fungal flora and aflatoxin associated with cocoa, roasted coffee and tea powders in Egypt. **Cryptogamic, Mycology**, Paris, v.13, n. 1, p.31-45, 1992.
- AGATE, A.D.; BHAT, J.V. Role of pectinolytic yeasts in the degradation of mucilage layer of coffee robusta cherries. **Applied Microbiology**, New York, v. 14, p. 256-260, 1966.
- ALVES, E. **População fúngica associada ao café (*Coffea arabica* L.) beneficiado e as fases pré e pós colheita- relação com a bebida e local de cultivo**. Lavras: UFPA, 1996. 48 p. (Dissertação- Mestrado em Fitopatologia).
- ALVES, E.; CASTRO, H.A. de Fungos associados ao café (*Coffea arabica* L.) nas fases pré e pós- colheita em lavouras da região de Lavras. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 24, n.1, p. 4-7, Jan./mar. 1998.
- BALOWS, A.; TRUPER, H.G.; DWORKIN, M.; SCHLEIFER, K.H. (eds). **The prokaryotes**, Berlin: Springer verlag, 1992. 4126p.
- BARNETT, H.L.; HUNTER, B.B. **Illustrated genera of imperfect fungi**, 4 ed. New York: Library Macmillan Company, 1987. 218 p.
- BITANCOURT, A.A. As fermentações e podridões da cereja de café. **Boletim da Superintendência dos Serviços do Café**, São Paulo, v. 32, p. 7-14, jan. 1957.
- BLANDÓN- CASTANO, G.; RODRÍGUEZ- VALENCIA, N.; DÁVILA-

ARIAS, M.T. Caracterización microbiológica y fisico-química de los productos del beneficio del café en proceso de compostaje. **Cenicafé**, Chinchiná, v.49, n.3, p. 169-185, jul./set.1998.

BOOTH, C. **The genus *Fusarium*** Surrey: Commonwealth mycological Institute, 1971. p.237.

CARVALHO, V.D.; CHALFOUN, S.M.; CHAGAS, S.J.DE R. Relação entre classificação de café pela bebida e composição físico-química, química e microflora do grão beneficiado. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEIRAS 15.**, 1989, Maringá. **Resumos ...** Rio de Janeiro: MIC/IBC, 1989. p.25-26.

DAIVASIKAMANI, S.; KANNAN, N. Studies on Post- Harvest Mycoflora Of Coffee Cherry Os Robusta. Brief note. **Journal Coffee Research**, Balehonnur, v.16, n. 3/ 4, p.102-106, 1986.

ELIAS, L.G. Composición química de la pulpa de café y otros subproductos. In: BRAHAM, J.E.; BRESSAN, R. (ed). **Pulpa de café: [Composición, tecnología y utilización]**. Panamá: INCAP, 1978. p.19-29.

FRANK, H.A.; LUM, N.A.; DELA CRUZ, A.S. Bacteria responsible for mucilage layer decomposition in Kona coffee cherries. **Applied Microbiology**, New York, v. 13, p. 201-207, 1965.

GORDON, W.L. The taxonomic and habitats of *Fusarium* species from Tropical and Temperate regions. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 38, n.3, p. 643-659, Mar.1960.

HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; STALEY, J.T.; WILLIAMS, S.T. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**, 9. ed. Baltimore: Williams S Wilkins, Baltimore, 1994. 787 p.

KRUG, H.P. Cafés duros. **Revista do Instituto do Café**, São Paulo, v.25, n.159, p. 636-638, maio 1940.

KRUG, H.P. Origem dos cafés duros. **Boletim da Agricultura**, São Paulo, v. 46, p. 397-406, 1947.

KUNZE, G.; KUNZE, I. *Arxula adenivorans*. In: WOLF, K. (ed). **Nonconventional yeasts in Biotechnology: A handbook**, Berlin: Spring Verlag, 1996. p. 389-409.

KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W. (ed). **The Yeasts- A taxonomic Study**. 4. ed. Amsterdam: Elsevier, 1998. 1055 p.

MEIRELLES, A.M.A. **Ocorrência e controle da microflora associada aos frutos de café (*Coffea arabica* L.) provenientes de diferentes localidades do estado de Minas Gerais**. Lavras: UFLA, 1990. 71p. (Dissertação - Mestrado em Fitotecnia).

MISLIVEC, P.B.; BRUCE, V.R.; GIBSON, R. Incidence of Toxigenic and other Molds in Green Coffee Beans. **Journal of Food Protection**. Des Moines, v.46, n. 11, p. 969-973, Nov. 1983.

NAKAMURA, H. Aflatoxina. **Boletim do Centro Tropical de Pesquisa e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.15, p. 17-31, 1968.

NELSON, P.E.; TOUSSOUN, T.A.; MARASAS, W.F.O. *Fusarium* species- An Illustrated Manual for Identification, EUA, 1983, 193 p.

PERDERSON, C.S.; BREED, R.S. Fermentation of coffee. **Food Research**, , Oxford, v.11, n.2, p. 99, Jan./Feb. 1946.

PITT, J.I.; HOCKING, A.D. **Fungi and food Spoilage**, 2. ed. Cambridge: Chapman & Hall, 1997. 593 p.

- ROUSSOS , S.; ANGELES AQUIÁHUATL, M.; TREJO-HERNÁNDEZ, M. R.; GAIME PERRAUD, I.; FAVELA, E.; RAMAKRISHNA, M.; RAIMBAULT, M.; VINIEGRA-GONZÁLEZ, G. Biotechnological management of coffee pulp- isolation, screening, characterization, selection of caffeine-degrading fungi and natural microflora present in coffee pulp and husk. *Applied Microbiology Biotechnology*, Berlin, v.42, p.756-762, 1995.
- VAN PEE, W.; CASTELEIN, J.M. Study of the pectinolytic microflora, particularly the Enterobacteriaceae, from fermenting coffee in the Congo. *Journal of Food Science*, Chicago, v. 37, n.2, p. :171-174, Mar./Apr. 1972.
- VAN PEE, W.; CASTELEIN, J.M The yeasts flora of fermenting robusta coffee. *East african Agricultural and Forestry Journal*, Nairobi, v.26, n.3, p. 308-310, jan. 1971.
- VAUGHN, R.H.; CAMARGO, R. DE; FALLANGE, H.; MELLO AYRES, G.; SERGEDELLO, A. Observations on the microbiology of the coffee fermentation in Brazil. *Food Technology*, Chicago, v.12, p. 12-57, 1958. Supplement.

ANEXOS

ANEXO A	Página
TABELA 1A Equivalência dos grãos de café imperfeitos e impurezas e o número de defeitos.....	104
TABELA 2A Tipos da bebida de café e o número de defeitos correspondente.....	104
TABELA 3A Índice de chuva (mm) da cidade de Lavras- MG ocorrido durante o período de coleta das amostras de grãos de café nos anos de 1997 e 1998.....	105

TABELA 1A Equivalência dos grãos de café imperfeitos e impurezas e o número de defeitos

Grãos	Defeitos
1 grão preto	1 defeito
1 pedra ou pau ou torrão grande	5 defeitos
1 pedra ou pau ou torrão regular	2 defeitos
1 pedra ou pau ou torrão pequeno	1 defeito
1 côco	1 defeito
1 casca grande	1 defeito
2 ardidos	1 defeito
2 marinheiros	1 defeito
2 a 3 cascas pequenas	1 defeito
2 a 5 brocados	1 defeito
3 conchas	1 defeito
5 verdes	1 defeito
5 quebrados	1 defeito
5 chochos ou mal granados	1 defeito

Fonte: Cultura de café- Instituto Campineiro de Ensino Agrícola. 1987.

TABELA 2A Tipos da bebida de café e o número de defeitos correspondente.

Tipo	Defeitos
Tipo 1	0 defeitos
Tipo 2	4 defeitos
Tipo 3	12 defeitos
Tipo 4	26 defeitos
Tipo 5	46 defeitos
Tipo 6	86 defeitos
Tipo 7	160 defeitos
Tipo 8	360 defeitos

Fonte: Cultura de café- Instituto Campineiro de Ensino Agrícola. 1987.

TABELA 3A Índice de chuva (mm) da cidade de Lavras- MG ocorrido durante o período de coleta das amostras de grãos de café nos anos de 1997 e 1998.

Mês de coleta	1997	1998
Junho	51,8	-
Julho	5,6	0,4
Setembro	-	16,5
TOTAL	57,4	16,9

Fonte: Estação meteorológica da Universidade Federal de Lavras