



SABRINA ALVES DA SILVA

Hypothenemus hampei: (Coleoptera: Scolytidae):
**IMPACTO SOBRE A QUALIDADE DOS GRÃOS
DE CAFÉ**

**LAVRAS – MG
2019**

SABRINA ALVES DA SILVA

Hypothenemus hampei: (Coleoptera: Scolytidae): **IMPACTO SOBRE A
QUALIDADE DOS GRÃOS DE CAFÉ**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, para a obtenção do título de Doutor.

Orientador

Dra. Rosemary Gualberto Fonseca Alvarenga Pereira

Coorientadores

Dr. Luís Roberto Batista

Dra. Sara Maria Chalfoun de Souza

**LAVRAS – MG
2019**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha
Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados
informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Silva, Sabrina Alves da.

Hypothenemus hampei: (Coleoptera: Scolytidae): impacto sobre a
qualidade dos grãos de café / Sabrina Alves da Silva. - 2019.

70 p.

Orientador(a): Rosemary Gualberto Fonseca Alvarenga Pereira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2019.

Bibliografia.

1. Café. 2. Broca-do-café. 3. Qualidade. I. Pereira, Rosemary
Gualberto Fonseca Alvarenga. II. Título.

SABRINA ALVES DA SILVA

***Hypothenemus hampei*: (Coleoptera: Scolytidae): IMPACTO SOBRE A
QUALIDADE DOS GRÃOS DE CAFÉ**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 27 de fevereiro de 2019.

Dr. Luís Roberto Batista	UFLA
Dr. Roney Alves Rocha	UFLA
Dr. Marcelo Ribeiro Malta	EPAMIG
Dra. Fabiana Reinis Franca Passamani	UFLA

Dra. Rosemary Gualberto Fonseca Alvarenga Pereira
Orientadora

**LAVRAS – MG
2019**

CORAGEM, CORAGEM

SE O QUE VOCÊ QUER É AQUILO QUE PENSA E FAZ...

CORAGEM, CORAGEM

EU SEI QUE VOCÊ PODE MAIS!

Raul Seixas

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, por ter guiado e iluminado cada passo meu, e por ter me dado tanta força e perseverança para que eu pudesse realizar esse sonho.

Agradeço a meus pais, Airton e Nilma, por todo incentivo, financeiro e emocional, e por todo apoio, carinho e amor que dedicaram a mim desde sempre. Palavras são muito singelas para expressar todo amor e gratidão que sinto por vocês. Agradeço a meus irmãos, Alex e Max, por todo apoio e incentivo. Se hoje estou aqui é porque quero ter um pouco do brilhantismo que vocês têm!

Agradeço à Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade e à minha orientadora, Rose e coorientadores, Luís e Sara, pela confiança ao designarem a mim esta pesquisa, e por todo suporte, paciência, ensinamentos e profissionalismo que tiveram para comigo ao longo desses anos.

Agradeço imensamente a Nathasha e Marileide, que são a prova de que existem pessoas em nossas vidas com a função de “anjos”. Agradeço às minhas amigas Helena, Fabi, Gi, Ana e Mayara, pela maravilhosa amizade que tornou meus dias em Lavras mais leves e alegres.

Agradeço a todos da equipe QICafé, núcleo do qual tive a belíssima oportunidade de participar e que me ofereceu tanto conhecimento, amizade e alegrias. Aos técnicos de laboratório Alexandre e Vicentina, que muito me ajudaram nas análises desta pesquisa e aos demais professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, pelas orientações e ensinamentos.

Por fim, gostaria de agradecer à minha avó, Altiva, maior exemplo de perseverança, força de vontade, positividade e empenho. Jamais me esquecerei de suas palavras: “Enfrenta Sabrina, você é capaz!”

RESUMO

A broca-do-café, *Hypothenemus hampei*, é a principal praga da cultura do café. Seus danos se iniciam quando a fêmea perfura os frutos ainda na planta. Os furos podem comprometer a qualidade microbiológica e os atributos físicos e químicos dos grãos, os quais têm relação com a qualidade sensorial da bebida e o valor de mercado da commodity. O objetivo, neste estudo, foi identificar fungos associados a grãos brocados, quantificar ocratoxina A e analisar física e quimicamente grãos com diferentes níveis de infestação da broca-do-café. Cafés de duas regiões (Cerrado Mineiro e Sul de Minas) foram coletados e os grãos brocados presentes nas amostras foram classificados quanto ao nível de infestação. Existe relação direta entre o nível de infestação e o aumento do percentual de contaminação por fungos. Foram identificadas 20 espécies de fungos, tendo os gêneros *Fusarium* e *Aspergillus* sido os encontrados em maior frequência. Quatro das 20 espécies isoladas apresentaram potencial para a produção de OTA e sua presença foi observada nos níveis de infestação “Sujo I e II” de apenas uma região. Para os parâmetros físico-químicos, o nível “Sujo II” apresentou menor densidade e menores concentrações de açúcares, compostos lipídicos e sólidos solúveis, e maiores valores de cinzas, acidez titulável total, condutividade elétrica, lixiviação de potássio, ácido succínico e acético. As cores dos níveis de infestação “Limpo” e “Sujo II” são diferentes entre si e diferentes dos demais níveis. Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que existe uma associação entre a broca-do-café e o aumento do percentual de contaminação por fungos; que os danos físicos aos grãos são expressivos, especialmente do ponto de vista econômico e que as alterações na composição química dos grãos pode ser prejudicial à qualidade da bebida, quando os grãos são submetidos à torração.

Palavras-chave: Café. Broca-do-café. Qualidade. Ocratoxina A. potencial toxigênico. Fungos.

ABSTRACT

The coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*, is the main pest of the coffee culture. The damage begins when the female beetles bore the fruits when they are still in the plant. The holes can compromise the microbiological quality and the physical and chemical attributes of the beans, which are related to the sensorial quality of the beverage and commodity market value. The aim of this study was to identify fungi associated with insect damage beans, to quantify ochratoxin A and to analyze physically and chemically beans with different levels of coffee borer infestation. Coffees from two regions (Cerrado Mineiro and South of Minas) were collected and the insect damage beans present in the samples were classified when at the infestation level. There is a direct relationship between the level of infestation and the increase of the percent of fungus contamination. Twenty species of fungi were identified, with the genera *Fusarium* and *Aspergillus* being found at higher frequency. Four of the twenty isolated species presented potential for OTA production and their presence was observed in the levels of "Dirty I and Dirty II" infestation of only one region. For the physico-chemical parameters, the level "Dirty II" presented lower density and lower concentrations of sugars, lipids and soluble solids; and higher ash values, total titratable acidity, electrical conductivity, potassium leaching, succinic and acetic acid. The color of the "Clean" and "Dirty II" infestation levels are different from each other and different from the other levels. The results of this work show that there is an association between coffee berry borer and increased percentage of fungus contamination; the physical damages to the beans are expressive, especially from the economic point of view; and changes in the chemical composition of the beans may be detrimental to the cup quality, when the beans are subjected to roasting.

Keywords: Coffee. Coffee berry borer. Quality. Ochratoxin A. Toxigenic potential. Fungi.

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	9
INTRODUÇÃO GERAL	9
1 INTRODUÇÃO	9
2 REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1 Histórico do café no Brasil	12
2.2 Broca-do-café	13
2.3 Fungos associados à broca-do-café.....	16
2.4 Ocratoxina A	18
2.5 Legislação para cafés	20
REFERÊNCIAS	22
SEGUNDA PARTE - ARTIGOS	27
ARTIGO 1 - Fungos associados a grãos infestados pela broca-do-café e o risco de ocratoxina A	27
ARTIGO 2 - Influência da infestação de <i>Hypothenemus hampei</i> sobre a qualidade dos grãos de café	50

PRIMEIRA PARTE

INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de produtos agrícolas e o café destaca-se como a segunda cultura de maior importância nacional. As exportações de café, de janeiro a novembro de 2018, movimentaram, aproximadamente, 4,55 bilhões de dólares, demonstrando a importância dessa cultura para a economia nacional (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2018). O consumo nacional de café também teve um grande aumento, tendo, segundo dados da Associação Brasileira das Indústrias de Café (ABIC), dobrado, nos últimos 25 anos, no mercado interno. No ano de 2018, o aumento foi de 4,80%, em relação ao ano de 2017. Além disso, o Brasil é o segundo maior consumidor mundial de café, ficando atrás somente dos Estados Unidos. A média de consumo nacional, no ano de 2018, foi de 6,02 kg de café torrado/habitante/ano, o que equivale a, aproximadamente, 21 milhões de sacas (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE CAFÉ - ABIC, 2018).

No ano de 2018, foram produzidas, no Brasil, 61,57 milhões de sacas de 60 kg (arábica e conilon). Para o ano de 2019 a previsão é de 50,48 a 54,48 milhões de sacas produzidas, uma redução prevista de 11% a 18%, devido ao efeito da bionalidade negativa da safra cafeeira (CONAB, 2018, 2019). As safras dos anos de 2018 e 2019 foram os maiores volumes produzidos e previstos em toda a história da cafeicultura brasileira. No entanto, há algumas décadas e, mais severamente, nos últimos seis anos, uma praga vem assolando as cafeiculturas, por ocasionar perdas em rendimento e em qualidade e ser de difícil controle no campo, a broca-do-café.

A broca-do-café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) é originária da África (PÉREZ; INFANTE; VEGA, 2015) e foi introduzida no Brasil no ano de 1913, no estado de São Paulo, junto com sementes importadas da África e de Java (LAURENTINO; COSTA, 2004). A espécie apresenta um ciclo evolutivo bastante variável, dependente de fatores bióticos e abióticos. Seu comportamento é diferente do das pragas comuns na cultura do café, uma vez que vive a maior parte do seu ciclo de vida dentro do fruto do cafeeiro, desde a postura dos ovos até o surgimento do inseto adulto. Os danos causados ao grão se iniciam quando a broca-do-café perfura os frutos, ainda imaturos, com, aproximadamente, 20% de matéria-seca. Os furos, geralmente, ocorrem na região da coroa do fruto, abrindo um orifício até as sementes. Nas sementes, ela deposita seus ovos que, após um tempo, irão eclodir e as larvas se alimentarão das sementes dos frutos de café (DIAS et al., 2008; LAURENTINO; COSTA, 2004; OLIVEIRA et al., 2018).

O controle químico desta praga era feito eficientemente com o ingrediente ativo endossulfan. No entanto, restrições ao uso desse composto em lavouras cafeeiras foram estabelecidas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) devido ao alto risco toxicológico desse composto (BRASIL, 2010). Desde o ano de 2013 até os dias atuais, estudos foram realizados a fim de buscar o desenvolvimento de métodos eficientes para o controle da praga, no entanto, os agentes químicos atualmente disponíveis para este fim são de custo extremamente alto, impossibilitando que os cafeicultores os utilizem em suas lavouras. De acordo com dados do Projeto Campo Futuro (2018), o custo de controle químico dessa praga passou de R\$ 83,50/hectare, no ano de 2013, para R\$ 648,00/hectare, no ano de 2018. Esse significativo aumento nos últimos cinco anos está relacionado ao preço dos atuais produtos químicos disponíveis para o controle da broca-do-café.

Além dos prejuízos econômicos causados pela perda em peso dos grãos atacados e pelo aumento do custo para controle da praga, a alta incidência da broca-do-café em uma lavoura pode acarretar um aumento na queda natural de frutos, comprometendo a produtividade. Também, a classificação por tipo do café é depreciada, devido ao aumento do número de grãos brocados e à intensidade de infestação, diminuindo, assim, o valor a ser pago pela saca (ATTALAH; GÓMEZ; JARAMILLO, 2018; OLIVEIRA et al., 2013; SOUZA et al., 2013).

A qualidade da bebida pode ser intensamente afetada pela broca-do-café. O orifício aberto pelo inseto no fruto é porta de entrada para micro-organismos que depreciam a qualidade dos grãos e podem comprometer a segurança de consumo. Segundo Velmourougane, Bhat e Gopinandhan (2010), a broca-do-café é um vetor para a entrada de micro-organismos, mais especificamente fungos produtores de micotoxinas, como a ocratoxina A. A ingestão dessa toxina pode ocasionar danos à saúde humana com efeitos nefrotóxicos, hepatotóxicos, teratogênicos e mutagênicos (CABAÑES; BRAGULAT, 2018; HA, 2015; JO et al., 2016).

Diante da importância do café no cenário brasileiro e dos efeitos maléficos que a broca-do-café pode causar a esta cultura, este trabalho foi realizado com o objetivo de analisar aspectos físicos, químicos e micológicos de grãos de café brocados, em função do nível de infestação da praga.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Histórico do café no Brasil

O Brasil é um dos maiores países produtores agrícolas do mundo e, dentre as culturas, o café se destaca como a segunda de maior importância nacional. O país se também se destaca como maior produtor mundial de café e maior exportador, apresentando contínua evolução na produção de grãos ao longo dos anos (CONAB, 2018). A importância do café na economia nacional também teve um grande aumento nas últimas décadas. Segundo os dados da Associação Brasileira das Indústrias de Café (ABIC), o consumo de café dobrou nos últimos 25 anos e a média de consumo, no ano de 2018, foi de 6,02 kg de café torrado/habitante (ABIC, 2018).

Apesar de ser largamente cultivado no Brasil e bem adaptado às condições climáticas, o café não é uma planta nativa brasileira. É originário do continente africano e, segundo a lenda de Kaldi, foi descoberto nas terras áridas tropicais do nordeste da África, na Abssínia, hoje Etiópia. O processamento dos frutos iniciou-se a partir da fervura dos frutos e, alguns anos depois, por meio do processo de torração das sementes dos frutos, técnica desenvolvida pelos árabes. Essa civilização também foi responsável pela popularização da bebida em sua região e no ocidente do continente, através das rotas marítimas e do comércio de especiarias do oriente (MARTINS, 2012).

No Brasil, as primeiras sementes de café chegaram ao estado do Pará no ano de 1727, trazidas da Guiana Francesa pelo sargento-mor Francisco de Melo Palheta. As primeiras mudas foram plantadas nos estados do Pará e Maranhão, mas tiveram pouca adaptação ao clima e aos solos dessas regiões. A partir disso, o cultivo do café se alastrou para as demais regiões do norte e nordeste, onde também pouco se adaptou ao clima. Em 1830, as primeiras plantas de café

chegaram aos estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro, Espírito Santo, São Paulo e Santa Catarina. Extensas fazendas cafeeiras se estabeleceram nesses estados e iniciaram uma larga produção, principalmente dos estados do sudeste, com a utilização, inicialmente, de mão de obra escrava e, posteriormente, de imigrantes assalariados (MARTINS, 2012; NEVES, 1939).

Atualmente, dentre os estados brasileiros produtores de café, destacam-se Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Bahia, Rondônia, Espírito Santo e Minas Gerais. Minas Gerais se consagra como responsável por mais da metade da produção de café arábica do país, enquanto o estado do Espírito Santo, por quase toda a produção de café robusta. Segundo os dados da CONAB (2018), no ano de 2018 o país produziu 61 milhões de sacas de 60 kg de café (arábica e conilon), e a estimativa para a produtividade, para o ano de 2019, é de 50 a 54 milhões de sacas.

2.2 Broca-do-café

A broca-do-café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae), é originária da África (PÉREZ; INFANTE; VEGA, 2015) e foi introduzida no Brasil no ano de 1913, no estado de São Paulo, junto com sementes importadas da África (LAURENTINO; COSTA, 2004).

O inseto adulto tem 2 mm de comprimento, coloração preta e corpo ligeiramente cilíndrico e recurvado (FIGURA 1). Apresenta ciclo evolutivo bastante variável, dependendo de fatores bióticos e abióticos, podendo descender até sete gerações por ano. A temperatura é o principal fator que influencia o ciclo evolutivo desse inseto que tem tolerância térmica de 20 a 30 °C. Apresenta comportamento diferente do de outras pragas comuns na cultura do café, pois vive a maior parte do seu ciclo de vida dentro do fruto do cafeeiro, desde a postura dos ovos até o surgimento do inseto adulto. O inseto macho é áptero e, por isso, passa

todo o seu ciclo evolutivo no interior dos frutos do cafeeiro, que pode variar de 20 a 87 dias. A fêmea pode viver, em média, 157 dias, tem dois pares de asas que lhe permitem atacar até vários frutos por dia, e pode fazer postura de 31 a 119 ovos por fruto. A população larval tem proporção sexual fêmea:macho de 10:1, sendo os machos aqueles que atingem primeiro a maturidade sexual, podendo acasalam-se com até 30 fêmeas dentro de um único fruto. As fêmeas, quando atingem maturidade sexual, acasalam-se com os machos e abandonam os frutos de origem para colonizar frutos diferentes. Durante a fase de entressafra, fêmeas do inseto permanecem inativas em frutos remanescentes no cafeeiro ou no chão, até o surgimento das primeiras chuvas. O aumento da umidade favorece os insetos a emergirem e um novo ciclo se inicia. O período de trânsito deste inseto se inicia, aproximadamente, três meses após a primeira florada do cafeeiro, época na qual o monitoramento da população deve ser constante. O controle deve ser realizado quando os níveis de infestação na lavoura estiverem entre 3% e 5% por talhão (DAMON, 2000; DIAS et al., 2008; FERNANDES et al., 2014; JARAMILLO et al., 2009; LAURENTINO; COSTA, 2004).

Figura 1 - Broca-do-café - *Hypothenemus hampei* (Ferrari) Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae.



Fonte: Da autora (2018).

O controle dessa praga é de difícil condução, pois, como já indicado, o inseto passa a maior parte de seu ciclo de vida no interior dos frutos do cafeeiro, diminuindo a eficácia de métodos de controle por contato (VEGA et al., 2009). O controle químico mais comum e eficaz foi feito, até o ano de 2013, com o inseticida organoclorado endossulfan (desenvolvido pela atual Bayer CropScience), no entanto, seu uso foi proibido devido a impactos negativos à saúde humana (UNITED STATES, 2010). Nos dias atuais, o controle dessa praga é feito por inseticidas novos introduzidos no mercado, alguns ainda em fases de experimentação, e por controle biológico, utilizando fungos entomopatogênicos e parasitoides, e insetos predadores, tais como *Beauveria bassiana* e a vespa africana, respectivamente. Outro método de controle desta praga é feito por boas práticas agrícolas culturais, como a completa colheita de frutos das plantas e o recolhimento de frutos remanescentes do chão, operações que resultam em um decréscimo significativo dos níveis populacionais da broca no ano seguinte (FERNANDES et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2013; ORTIZ et al., 2004).

Os danos causados pela broca-do-café ao grão de café iniciam-se quando a fêmea do inseto perfura os frutos do cafeeiro, abrindo um orifício através do exocarpo, do mesocarpo e do endocarpo, até alcançar o endosperma do fruto. Este inseto infesta frutos em todos os estádios de maturação, desde aqueles imaturos, com, aproximadamente, 20% de matéria-seca, até grãos em estádios mais avançados de maturação. A perfuração ocorre, preferencialmente, na região da coroa, entretanto, dependendo do estádio de maturação do fruto, a perfuração por ocorrer em qualquer região. No interior do fruto, a fêmea ovíparosita e as larvas originadas irão se alimentar do endosperma dos frutos de café até seu completo desenvolvimento (INFANTE; PÉREZ; VEGA, 2014; JARAMILLO et al., 2009).

No Brasil, todos os estados produtores de café têm observado a presença desta praga, no entanto, em algumas regiões, verificam-se maiores infestações devido a fatores climáticos, de localização e característicos da lavoura, como a

região do Cerrado Mineiro, no estado de Minas Gerais. De acordo com Jaramillo et al. (2011) e Laurentino e Costa (2004), vários fatores podem interferir na infestação da broca-do-café, como temperatura, precipitação, umidade relativa do ar, altitude, sombreamento e espaçamento das lavouras. De modo geral, a ocorrência desta praga é maior quando há menor precipitação durante os estádios de frutificação e maturação dos frutos, quando as temperaturas são mais elevadas (entre 23 e 30 °C), quando a umidade relativa do ar é maior durante o período de inverno e quando a lavoura se encontra em regiões de menores altitudes, com um tipo de plantio adensado e sob sombreamento.

Os danos causados pelas larvas e pelo inseto adulto causam redução de rendimentos devido à perda de peso dos grãos, à redução da qualidade física e sensorial e, em casos mais severos, pode causar a abscisão (queda) dos frutos (VEGA et al., 2009). Somente no ano de 2013 essa praga ocasionou perdas estimadas em U\$ 215 e 358 milhões para produtores de cafés do Brasil (OLIVEIRA et al., 2013). Além disso, o orifício aberto pela broca-do-café é porta de entrada para outros micro-organismos que depreciam a qualidade dos grãos e podem comprometer a segurança do seu consumo.

2.3 Fungos associados à broca-do-café

Os frutos do cafeeiro estão expostos a uma diversidade de micro-organismos, desde a lavoura até o beneficiamento, e a incidência de alguns deles, principalmente nas fases pré e pós-colheita, está relacionada à qualidade dos grãos. No entanto, a própria morfologia do fruto do cafeeiro oferece à semente (grão) uma proteção contra a contaminação por fungos, sendo o exocarpo, o mesocarpo e o endocarpo barreiras físicas de proteção contra a penetração de micro-organismos (CASTRO; MARRACCINI, 2006; PATERSON; LIMA, 2010).

A broca-do-café é uma praga que, além de provocar a perda de peso, ainda pode comprometer a qualidade dos grãos, já que os danos que ela causa são porta de entrada de micro-organismos. Quando o inseto inicia a perfuração dos grãos, abrindo um orifício do exocarpo ao endosperma, a parte interna do grão passa a ter contato direto com o ambiente e fica susceptível a toda microbiota e esporos presentes no ar. Somado a isso, o inseto em si é um agente facilitador da contaminação dos grãos, já que vários tipos de micro-organismos podem estar presentes em suas fezes, mandíbula, patas, cutícula e demais partes de seu corpo. No interior dos grãos, esses micro-organismos encontram ambiente propício para seu desenvolvimento e multiplicação, com disponibilidade de água e substrato para nutrição (AMÉZQUETA et al., 2009; PATERSON; LIMA, 2010; TANIWAKI et al., 2003).

Esporos de fungos das espécies *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium chrysogenum* e *Verticillium s. lat. sp* foram isolados de fêmeas adultas da broca-do-café, por Vega et al. (2009). Em outro trabalho, realizado por Pérez et al. (2003), analisou-se a microbiota associada a partes do corpo do inseto. Na cutícula estava presente o maior percentual de contaminação e foi isolada a maior diversidade de micro-organismos, quando comparado ao de outras partes do corpo do inseto. Além disso, da cutícula do inseto foram isolados micro-organismos potencialmente produtores de ocratoxina A, como *Aspergillus ochraceus*.

Segundo Velmourougane, Bhat e Gopinandhan (2010), a broca-do-café é, comprovadamente, um vetor para contaminação de micro-organismos em frutos do cafeeiro. Nesse trabalho foram isolados e identificados fungos de três regiões de frutos atacados pela broca do café, quais sejam, parte externa do fruto, orifício de entrada da broca e parte interna do fruto. Nos resultados foi possível observar que, no orifício de entrada da broca, de 2% a 4% da população fúngica presente era de *Aspergillus ochraceus* e que de 7% a 12% da população fúngica total em frutos atacados eram de *Aspergillus ochraceus*, embora a população dominante

fosse de *Aspergillus niger* e *Aspergillus terreus*, micro-organismos também potencialmente produtores de ocratoxina A. Com relação à presença de ocratoxina A nos frutos analisados nesse trabalho, frutos remanescentes da colheita, presentes no chão e na planta, continham a micotoxina em valores superiores ao permitido pela legislação brasileira (10 µg/kg). Nos frutos colhidos maduros, os valores de ocratoxina A em grãos atacados pela broca do café variaram de 1,28 a 3,25 µg/kg.

2.4 Ocratoxina A

A ocratoxina A (OTA) é um composto do metabolismo secundário de fungos, principalmente daqueles pertencentes ao gênero *Aspergillus* e *Penicillium*. Essa micotoxina se destaca, em um grupo de mais de 400 micotoxinas, por apresentar efeitos nefrotóxicos, imunotóxicos e teratogênicos, e um longo tempo de meia vida dentro do organismo humano. A Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC) classificou esse composto como pertencente ao Grupo 2 B - substância possivelmente cancerígena para humanos. Uma variedade de alimentos pode estar propensa à contaminação por fungos produtores de OTA, especialmente os cereais, a uva e seus derivados, e o café (CABAÑES; BRAGULAT, 2018; HA, 2015; JO et al., 2016).

O café é a segunda bebida mais consumida no mundo e um substrato propenso à contaminação por fungos ocratoxigênicos. A constituição do fruto/grão de café favorece o desenvolvimento de fungos pela disponibilidade de água e substrato para nutrição. Além disso, as condições ambientais, como alta temperatura e umidade, tanto nas lavouras como dos frutos/grãos, nas etapas de pré e pós-colheita, também podem favorecer o desenvolvimento de fungos e produção de OTA. Dessa forma, várias recomendações de boas práticas agrícolas culturais vêm sendo implementadas, a fim de se evitar/minimizar o desenvolvimento de fungos em frutos/grãos de café, que não só comprometem a

segurança do consumo, como também a qualidade da bebida (BARCELO; BARCELO, 2018; CHALFOUN; BATISTA, 2003; CODEX ALIMENTARIUS, 2009; PATERSON; LIMA; TANIWAKI, 2014; TANIWAKI et al., 2003).

A presença de OTA em café vem sendo investigada e monitorada por pesquisadores e agências de vigilância em todo o mundo, visando identificar regiões mais propensas à contaminação e pontos críticos de controle que podem favorecer a produção dessa micotoxina. Broissim-Vargas et al. (2017) avaliaram a população fúngica e a produção de OTA em grãos de café verdes armazenados em sacos de juta, pelo período de um ano. Nesse estudo foi possível observar que, a partir do sexto mês de armazenamento, a concentração da micotoxina era de 4,10 µg/kg, resultado de um acréscimo de temperatura e umidade ao longo do tempo de armazenamento. Geremew et al. (2016), analisando a concentração de ocratoxina A em cafés da Etiópia, obtiveram média de 1,53 µg/kg para cafés torrados comercializados localmente, e observaram que a localidade de origem de produção e o tipo de processamento pós-colheita e armazenamento influenciavam significativamente a concentração dessa micotoxina, nos cafés analisados. Taniwaki et al. (2014), investigando a relação entre grãos defeituosos de café e presença de OTA, observaram a presença da micotoxina em grãos defeituosos ardidos e pretos, nas concentrações de 11,3 e 25,7 µg/kg, respectivamente.

Como a técnica de análise de OTA em cafés é recente e de alta complexibilidade, várias pesquisas que objetivam avanços nessas tecnologias de determinação e quantificação de toxinas, sejam isoladas ou simultaneamente, em grãos de café torrados ou não, vêm sendo realizadas. Novas metodologias utilizando técnicas, como PCR quantitativa, quimioluminescência e espectroscopia de infravermelho, obtiveram resultados satisfatórios (HA, 2015; JO et al., 2016; POTIPUM et al., 2018).

2.5 Legislação para cafés

A classificação de cafés brasileira é feita seguindo a Instrução Normativa (IN) nº 8 de 2003. De acordo com essa norma, os cafés são classificados quanto ao seu aspecto físico e sensorial. A classificação física é composta de dois atributos, o tamanho e o formato dos grãos, de acordo com peneiras específicas para cafés, e por tipo, em que 300 g de um determinado lote de café são analisados para verificar-se a presença de defeitos. Os defeitos do café são divididos em dois grupos, defeitos extrínsecos (paus, pedras, torrões, cascas, etc.) e defeitos intrínsecos (grãos verdes ou imaturos, ardidos, pretos, brocados, etc.). Após a verificação da presença de defeitos do café, os grãos ou matérias defeituosas são classificados (de acordo com padrão descrito na IN) e quantificados. Cada defeito de café tem uma equivalência pré-estabelecida pela IN e, assim, o total de defeitos de uma determinada classificação (preto, verde ou brocado, por exemplo) é multiplicado pela sua equivalência e se obtém um valor numérico. Os valores obtidos a partir dessa fórmula, para cada tipo de defeito, serão somados e o valor final obtido será respectivo ao “tipo” do café, de acordo com tabela pré-estabelecida pela IN (BRASIL, 2003). A classificação por tipo é diretamente proporcional ao número de defeitos presentes na amostra e, sendo assim, quanto maior o número de defeitos, pior será a classificação por tipo do café.

Outro fator relevante é com relação ao preço de venda da saca. Quanto pior o tipo de café, menor será o preço de venda da saca (NOTÍCIAS AGRÍCOLAS, 2019). Uma classificação similar a esta também é feita para cafés especiais, os quais são classificados em especiais ou não, de acordo com a presença e o número de defeitos presentes na amostra analisada (SPECIALTY COFFEE ASSOCIATION OF AMERICA - SCAA, 2008).

A Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 7, de 18 de fevereiro de 2011 (BRASIL, 2011), estabelece os limites máximos de micotoxinas em

alimentos no Brasil. Para café torrado e moído e café solúvel, o limite máximo de ocratoxina A é de 10 µg/kg, que é superior ao limite máximo estabelecido por outros países importadores de café, como a União Europeia, que é de 5µg/kg (EUROPEAN UNION, 2010).

Em relação à presença de fragmentos de insetos em alimentos, a legislação brasileira permite até 60 fragmentos de insetos em 25 g de café torrado e moído, como estabelecido pela RDC nº 14, de 28 de março de 2014, que dispõe sobre as matérias estranhas macro e microscópicas em alimentos e bebidas (BRASIL, 2014).

No Brasil, alguns trabalhos foram realizados objetivando monitorar a presença de ocratoxina A em cafés torrados. No ano de 2000, Prado et al. (2000), analisando amostras de cafés torrados e moídos, encontraram concentração média de OTA de 1,75 µg/kg. Em 2003, o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz (INCQS/FIOCRUZ), analisando cafés torrados comercializados em todo o território nacional, encontrou de 0,65 a 5,7 µg/kg de OTA em 18 de 29 amostras analisadas. Em 2013, essa mesma Fundação encontrou de 0,34 a 3,1 µg/kg, em 37 das 37 amostras analisadas. No ano seguinte, 2014, as concentrações de OTA variaram de 0,54 a 11,97 µg/kg, em 41 das 56 amostras analisadas, sendo algumas comercializadas com concentrações dessa micotoxina superiores aos limites permitidos pela legislação, de 10 µg/kg (MEDINA, 2015).

REFERÊNCIAS

AMÉZQUETA, S. et al. Ochratoxin A descontamination: a review. **Food Control**, Guildford, v. 20, p. 326-333, 2009.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ. **Indicadores da indústria de café no Brasil - 2018**. Rio de Janeiro, 2018. Disponível em: <<http://abic.com.br/estatisticas/indicadores-da-industria/indicadores-da-industria-de-cafe-2018/>>. Acesso em: 1 fev. 2019.

ATTALAH, S. S.; GÓMEZ, M. I.; JARAMILLO, J. A bioeconomic model of ecosystem services provision: coffee berry borer and shade-grown coffee in Colombia. **Ecological Economics**, Amsterdam, v. 144, p. 129-138, 2018.

BARCELO, J. M.; BARCELO, R. C. Post-harvest practices linked with ochratoxin A contamination of coffee in three provinces of Cordillera Administrative Region, Philippines. **Food Additives & Contaminants**, Part A, London, v. 35, n. 2, p. 328-340, Feb. 2018.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 22 fev. 2011. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2011/res0007_18_02_2011_rep.html>. Acesso em: 10 dez. 2018.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 14, de 28 de março de 2014. Dispõe sobre matérias estranhas macroscópicas e microscópicas em alimentos e bebidas, seus limites de tolerância e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 14 mar. 2014. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2014/rdc0014_28_03_2014.pdf>. Acesso em: 10 dez. 2018.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 28, de 9 de agosto de 2010. Dispõe sobre o ingrediente ativo Endossulfam em decorrência da reavaliação toxicológica. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 9 ago. 2010. Disponível em: <http://www.adapar.pr.gov.br/arquivos/File/GSV/Agrotoxicos/lf_6_resolucao_RDC_28_de_2010.pdf>. Acesso em: 10 dez. 2018.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 8, de 11 de junho de 2003. Aprova o regulamento técnico de identidade e qualidade para a classificação do café beneficiado grão cru. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 3 jun. 2003. Disponível em: <http://www.codapar.pr.gov.br/arquivos/File/pdf/cafefenef008_03.pdf>. Acesso em: 10 dez. 2018.

BROISSIN-VARGAS, L. M. et al. Impact of storage conditions on fungal community composition of green coffee beans *Coffea arabica* L. stored in jute sacks during 1 year. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 124, p. 547-558, 2017.

CABAÑES, F. J.; BRAGULAT, M. R. Black aspergilli and ochratoxin A: producing species in foods. **Current Opinion in Food Science**, New York, v. 23, p. 1-10, 2018.

CASTRO, R. D.; MARRACCINI, P. Cytology, biochemistry and molecular changes during coffee fruit development. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Campos dos Goytacazes, v. 18, n. 1, p. 175-199, 2006.

CHALFOUN, S. M.; BATISTA, L. R. **Fungos associados a frutos e grãos do café: *Aspergillus e Penicilium***. Brasília, DF: EMBRAPA, 2003. 69 p.

CODEX ALIMENTARIUS. **Code of practice for the prevention and reduction of ochratoxin A in coffee: CAC/RCP 69-2009**. Rome: FAO, 2009. (Joint FAO/WHO Food Standards Program).

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira: café**, v. 5, n. 1, 2019. Rio de Janeiro, 2019. Disponível em: <<file:///C:/Users/Usuario/Downloads/BoletimZCafeZjaneiroZ2019.pdf>>. Acesso em: 11 fev. 2019.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira: café**, v. 5, n. 4, 2018. Rio de Janeiro, 2018. Disponível em: <<file:///C:/Users/Usuario/Downloads/BoletimZCafeZdezembroZ2018.pdf>>. Acesso em: 11 fev. 2019.

DAMON, A. A review of the biology and control of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). **Bulletin of Entomological Research**, Cambridge, v. 90, p. 453-465, 2000.

DIAS, B. A. et al. Cuticle-dregrading proteases produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in the presence of coffee berry borer cuticle. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 39, n. 2, p. 304-306, Apr./June 2008.

EUROPEAN UNION. Commission Regulation (EU) N° 105/2010, of 5 February 2010 amending Regulation (EC) N° 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards ochratoxin A. **Official Journal of the European Union**, Bruxelas, v. 35, p. 7-8, 2010.

FERNANDES, F. L. et al. Controle massal da broca-do-café com armadilhas de garrafa Pet vermelha em cafeeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 49, n. 8, p. 587-594, ago. 2014.

GEREMEW, T. et al. Occurrence of toxigenic fungi and ochratoxin A in Ethiopian coffee for local consumption. **Food Control**, Guildford, v. 69, p. 65-73, 2016.

HA, T. H. Recent advances for the detection of ochratoxin A. **Toxins**, Basel, v. 7, p. 5276-5300, 2015.

INFANTE, F.; PÉREZ, J.; VEGA, F. E. The coffee berry borer: the centenary of a biological invasion in Brazil. **Brazilian Journal Biology**, São Carlos, v. 74, n. 3, p. 125-126, 2014.

JARAMILLO, J. et al. Development of an improved laboratory production technique for the coffee berry borer *Hypothenemus hampei*, using fresh coffee berries. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Amsterdam, v. 130, p. 275-281, 2009.

JARAMILLO, J. et al. Some like it hot: the influence and implications of climate change on coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*) and coffee production in east Africa. **PLoS One**, San Francisco, v. 6, n. 9, p. 1-14, 2011.

JO, E. et al. Detection of ochratoxin A (OTA) in coffee using chemiluminescence resonance energy transfer (CRET) aptasensor. **Food Chemistry**, London, v. 194, p. 1102-1107, 2016.

LAURENTINO, E. L.; COSTA, J. N. M. **Descrição e caracterização biológica da broca-do-café (*Hypothenemus hampei*, Ferrari, 1967) no Estado de Rondônia**. Porto Velho: EMBRAPA Rondônia, 2004.

MARTINS, A. L. **História do café**. 2. ed. São Paulo: Contexto, 2012.

MEDINA, B. G. **Avaliação da contaminação por ocratoxina A em amostras de café torrado comercializadas no Brasil**. 2015. 43 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade)-Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2015.

NEVES, C. **História singela do café**. Rio de Janeiro: Departamento Nacional do Café, 1939.

NOTÍCIAS AGRÍCOLAS. **Cotação de preços: café**. Disponível em: <<https://www.noticiasagricolas.com.br/cotacoes/cafe>>. Acesso em: 10 mar. 2019.

OLIVEIRA, C. M. et al. Coffee berry borer in conilon coffee in the Brazilian Cerrado: na ancient pest in a new environment. **Bulletin of Entomological Research**, London, v. 108, p. 101-107, 2018.

OLIVEIRA, C. M. et al. Economic impact of exotic insect pests in Brazilian agriculture. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 137, n. 1/2, p. 1-15, 2013.

ORTIZ, A. et al. Volatile composition of coffee berries at different stages of ripeness and their possible attraction to the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 52, n. 16, p. 5914-5918, 2004.

PATERSON, R. R. M.; LIMA, N. How will climate change affect mycotoxins in food? **Food Research International**, Ottawa, v. 43, p. 1902-1914, 2010.

PATERSON, R. R. M.; LIMA, N.; TANIWAKI, M. H. Coffee, mycotoxins and climate change. **Food Research International**, Ottawa, v. 61, p. 1-15, 2014.

PERÉZ, J. et al. Microbiota associated with the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*) in México. **Mycological Research**, Cambridge, v. 107, n. 7, p. 879-887, 2003.

PÉREZ, J.; INFANTE, F.; VEGA, F. E. A coffee berry borer (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) Bibliography. **Journal of Insect Science**, Oxford, v. 15, p. 1-41, 2015.

POTIPUM, J. et al. Quantification of ochratoxin A: producing fungi in coffee products using quantitative PCR. **CMU Journal of Natural of Sciences**, Chiang Mai, v. 17, n. 1, p. 39-46, 2018.

PRADO, G. et al. Incidência de ocratoxina A em café torrado e moído e em café solúvel consumido na cidade de Belo Horizonte, MG. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 20, n. 2, p. 192-196, 2000.

PROJETO CAMPO FUTURO. Custos com o controle da broca-do-café tiveram aumento expressivo em 2018. **Negócio Café**, Lavras, n. 4, p. 12-13, out./dez. 2018.

SOUZA, J. C. et al. Controle químico da broca-do-café com cyantraniliprole. **Coffee Science**, Lavras, v. 8, n. 4, p. 404-410, 2013.

SPECIALTY COFFEE ASSOCIATION OF AMERICA. **Protocolo para classificação física de cafés**. Long Beach, 2008.

TANIWAKI, M. H. et al. Ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in defective coffee beans. **Food Research International**, Ottawa, v. 61, p. 161-166, 2014.

TANIWAKI, M. H. et al. The source of ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to processing methods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 82, p. 173-179, 2003.

UNITED STATES. Environmental Protection Agency. **Endosulfan phase out**. Washington, 2010. Disponível em: <<https://archive.epa.gov/pesticides/reregistration/web/html/endosulfan-agreement.html>>. Acesso em: 9 abr. 2018.

VEGA, F. E. et al. The coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae): a short review, with recente findings and the future research directions. **Terrestrial Arthropod Reviews**, Leiden, v. 2, p. 129-147, 2009.

VELMUROUGANE, K.; BHAT, R.; GOPINANDHAN, T. N. Coffee Berry Borer (*Hypothenemus hampei*): a vector for toxigenic molds and ochratoxin A contamination in coffee beans. **Foodborne Pathogens and Disease**, Larchmont, v. 7, n. 10, p. 1279-1284, 2010.

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

ARTIGO 1

Fungos associados a grãos infestados pela broca-do-café e o risco de ocratoxina A

Food Research International

(Versão Preliminar)

Resumo: A broca-do-café (*Hypothenemus hampei*) é a principal praga da cultura cafeeira. Seus danos iniciam-se quando o inseto perfura os frutos. Os furos podem comprometer a qualidade microbiológica e a segurança de consumo. O objetivo, neste estudo, foi identificar fungos, toxigênicos ou não, associados a grãos de café brocados e quantificar ocratoxina A. Cafés de duas regiões produtoras brasileiras foram coletados e os grãos brocados presentes nas amostras foram classificados quanto ao nível de infestação. Existe relação entre o nível de infestação da broca-do-café e o aumento do percentual de contaminação fúngica. Foram identificadas 20 espécies, tendo aquelas pertencentes aos gêneros *Fusarium* e *Aspergillus* sido encontradas em maiores proporções e em todos os níveis de infestação. Quatro das 20 espécies isoladas apresentaram potencial para a produção de OTA. A presença de OTA foi detectada apenas nas amostras da região “Cerrado”, sendo os níveis “Sujo I” e “Sujo II” aqueles com maiores concentrações da micotoxina. Palavras-chave: café, OTA, potencial toxigênico, contaminação fúngica, praga agrícola.

1 INTRODUÇÃO

A broca-do-café (*Hypothenemus hampei*) é a principal praga da cultura do café e tem causado prejuízos em todos os países produtores. Anualmente, cerca de US 500 milhões de dólares são contabilizados como prejuízo no setor cafeeiro, causado unicamente por este inseto (Vega et al, 2015; Vega et a, 2002). Seus danos se iniciam quando a fêmea do inseto perfura os frutos ainda na planta. No interior dos frutos, a fêmea deposita seus ovos e, quando as larvas eclodem, se alimentam do endosperma do fruto, originando várias galerias na semente (Rodriguez et al, 2017; Rodriguez et al, 2013; Vega et al, 2009).

Além do prejuízo direto de ordem econômica pela perda de peso dos grãos, os furos causados por este inseto também podem favorecer a contaminação por fungos. Quando o inseto perfura os frutos ainda no campo, as lesões formadas podem favorecer a infecção por micro-organismos do ambiente externo. Somado a isso, o próprio inseto pode ser um veículo de contaminação dos grãos com fungos toxigênicos (Paterson e Lima, 2010; Amézqueta et al, 2009).

Dentro dos frutos os micro-organismos encontram um ambiente propício para se desenvolverem, podendo causar várias alterações, como mudança da coloração dos grãos, principalmente no interior e nos arredores do furo, e comprometer a qualidade sensorial da bebida (Rezende et al, 2013; Vilela et al, 2010). Além disso, algumas espécies de fungos apresentam a capacidade de produzir metabólitos extracelulares tóxicos, como, por exemplo, as micotoxinas (Ramirez et al, 2018).

Dentre as micotoxinas que podem ocorrer frequentemente no café, a ocratoxina A, ou OTA, é a mais pesquisada e encontrada. Essa micotoxina é produzida por algumas espécies de fungos pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* (Rezende et al, 2013; Batista et al, 2009; Taniwaki et al, 2003) e tem capacidade nefrotóxica, genotóxica, hepatotóxica, imunossupressora e

cancerígena (Ha, 2015; Sorrenti et al, 2013). A Agência Internacional de Pesquisas sobre o Câncer (IARC) (1993) classificou essa micotoxina como um composto pertencente grupo 2B - substância provavelmente carcinogênica (Ostry et al, 2017). Devido ao seu alto risco para a saúde humana, entidades regulamentadoras estabeleceram limites máximos desse composto em alimentos propensos à contaminação, como, por exemplo, 5 µg/kg em café torrado, na União Europeia e 10 µg/kg, no Brasil (União Europeia, 2010; Brasil, 2011; Geremew et al, 2016).

Diante da alta infestação da broca-do-café nos últimos anos e da possibilidade de o inseto ser um facilitador para a contaminação de grãos por fungos produtores de toxinas, este estudo foi realizado com o objetivo de identificar fungos, toxigênicos ou não, associados a grãos de café brocados e quantificar OTA nesses grãos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta e preparo das amostras

As amostras de grãos de café utilizadas neste estudo foram coletadas em duas regiões produtoras do estado de Minas Gerais, Brasil, que têm alto índice de incidência da broca-do-café, que são o Cerrado e o Sul de Minas (Fundação Procafé, 2016). Foram coletados 60 kg de grãos de café beneficiados de cada região, os quais foram classificados manualmente para seleção e categorização dos grãos quanto ao nível de infestação da broca-do-café. A categorização foi realizada com base no número de furos contidos nos grãos e quanto à presença ou à ausência de coloração no interior dos furos, originando quatro categorias em cada região (Figura 1), sendo elas

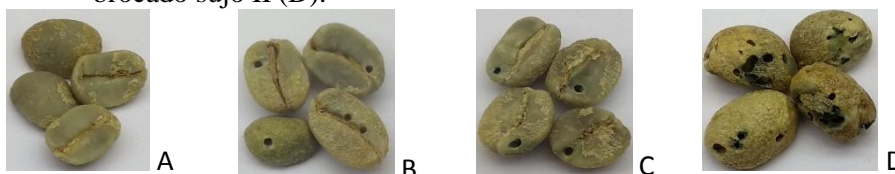
. controle: composta por grãos perfeitos, isentos de quaisquer tipos de defeitos;

. brocado limpo: composta por grãos contendo até duas furos, ausentes de alteração de coloração no interior dos furos;

. brocado sujo I: composta por grãos contendo até dois furos, com alteração de coloração no interior dos furos;

. brocado sujo II: composta por grãos contendo de três a seis furos, com alteração de coloração no interior dos furos.

Figura 1 - Categorização dos grãos de acordo com o número de furos e alteração de coloração: controle (A); brocado limpo (B); brocado sujo I (C) e brocado sujo II (D).



2.2 Avaliação do percentual de contaminação por fungos

A avaliação do percentual de contaminação por fungos foi realizada utilizando-se a técnica de plaqueamento direto (Samson et al, 2004). Para isso foram selecionados, aleatoriamente, 200 grãos de café de cada nível de infestação em cada uma das duas regiões. Desse material, 100 grãos foram plaqueados em pontos equidistantes, em meio de cultura dicloran rosa de bengala cloranfenicol (DRBC) (10,0 g de glicose; 5,0 g de peptona bacteriológica; 1,0 g de KH_2PO_4 ; 0,5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,5 mL de solução 5% de rosa de bengala; 1,0 mL de dicloran; 1.000 mL de água destilada; 15,0 g de ágar; 1 mg de cloranfenicol) para avaliação da contaminação por fungos em grãos sem desinfecção. Os 100 grãos restantes foram desinfetados superficialmente em álcool 70% (1 minuto) e hipoclorito de sódio 1% (30 segundos), lavados com água estéril por três vezes consecutivas e plaqueados em meio de cultura DRBC, para avaliação da contaminação por fungos presentes no interior dos grãos (Samson et al., 2000). As placas foram incubadas a 25, durante 7 dias e os resultados expressos em percentagem de grãos contaminados por fungos, conforme Pitt e Hocking (1997).

2.3 Isolamento e identificação dos fungos

O isolamento e a purificação dos fungos foram realizados utilizando-se a técnica de repicagem em meio malte ágar (MA) a partir de colônias presentes nas placas de DRBC e incubados, a 25 °C, por sete dias. Posteriormente, os isolados foram cultivados em meios de cultura específicos para a identificação de acordo com cada gênero e incubados, a 25 °C e 37 °C, por sete dias. Em seguida, foram avaliadas as características macro e microscópicas de cada colônia, de acordo com Klich (2002), Pitt (2000), Pitt & Hocking (1997), Samson et al. (2000) e outros.

2.4 Avaliação do potencial toxigênico dos fungos

A determinação do potencial toxigênico das espécies identificadas (*Aspergillus* seção *Nigri* e *Circumdati*) foi realizada utilizando-se cromatografia de camada delgada, conforme Filtenborg e Frisvad (1980). Para a detecção da produção de ocratoxina A, utilizou-se o meio de cultura *czapeck yeast agar* (CYA), para as espécies pertencentes ao gênero *Aspergillus* seção *Nigri* e meio *yeast extract sucrose agar* (YES) para aquelas pertencentes ao gênero *Aspergillus* seção *Circumdati* sendo incubadas, a 25 °C, por 10 dias. Foi utilizada fase móvel composta por tolueno, acetato de etila e ácido fórmico 90% - 60:30:10, solução padrão de ocratoxina A (Sigma-Aldrich) e placas de cromatografia de camada delgada (CCD) (Merk-Sílica Gel 60, 20x20). A leitura quanto à produção de ocratoxina A foi realizada em cromatovisor CAMAG (UF-BETRACHTER) sob luz ultravioleta com comprimento de onda de 366 nm. Os micro-organismos considerados produtores apresentaram fator de retenção (RF) e spot de fluorescência roxo, semelhantes ao do padrão de toxina.

2.5 Quantificação de ocratoxina A nos grãos de café

Para a análise de ocratoxina A em café, foram colocados 5 g de amostra moída em granulometria inferior a 40 mesh em um erlenmeyer de 250 mL junto a 100 mL de bicarbonato de sódio 1%. Esse material foi agitado, por 1 hora, em agitador mecânico e centrifugado, a 3.600 g, por 10 minutos, a 25 °C. Do sobrenadante, 15 mL foram retirados e combinados com 65 mL de tampão fosfato salino pH 7,4. A solução resultante foi filtrada em filtro de microfibras e 50 mL do filtrado foram utilizados para passagem na coluna de imunoafinidade. As colunas de imunoafinidade Ochratest (Vican, USA) foram utilizadas para purificação do extrato e concentração da micotoxina. Após a passagem do filtrado na coluna

seguiu-se a limpeza com 15 mL de água destilada e eluição da micotoxina ligada aos anticorpos com 3 mL de metanol. Da solução eluída, coletaram-se 2,7 mL para secagem total que, posteriormente, foram diluídos em 500 μ L de solução água: acetonitrila: ácido acético (49,5:49,5:1). Dessa solução, 50 μ L foram injetados no sistema de cromatografia constituído de bomba, misturador de solventes, desgaseificador, injetor automático, forno e detector de fluorescência da marca Shimadzu.

A separação cromatográfica foi realizada utilizando-se uma coluna cromatográfica C18 de 150 mm de comprimento por 4,6 mm de diâmetro interno (Synergi Fusion RP, Phenomenex, USA), mantida a 40 °C. A fase móvel foi mantida em sistema isocrático e constituída por água:acetonitrila:ácido acético (49,5: 49,5: 1) e bombeada à vazão de 1,0mL/min. A detecção da ocratoxina A foi realizada com detector de fluorescência configurado com um comprimento de onda de excitação de 333 nm e emissão de 443 nm. A quantificação foi realizada com padronização externa, construindo-se uma curva de calibração a partir de 6 diferentes concentrações do padrão de OTA (Sigma-Aldrich, USA).

O método utilizado foi checado para averiguação da taxa de recuperação da OTA e repetibilidade dos resultados. Para a avaliação da taxa de recuperação, amostras de café verde sem contaminação de ocratoxina A foram adicionadas de alíquotas de padrão de OTA para resultar em concentrações de 2,85 e 9,15 μ g.kg⁻¹. Três diferentes amostras para cada um destes níveis foram preparadas. A repetibilidade foi calculada utilizando-se os valores de concentração observados durante a avaliação da taxa de recuperação e expressos em termos de coeficiente de variação.

2.6 Microscopia eletrônica de varredura

Foram selecionados, aleatoriamente, 10 grãos de cada nível de infestação de cada região, os quais foram cortados horizontalmente em partes de 2 cm de largura. Os pedaços obtidos foram imersos em solução fixadora (Karnovsky's modificado), pH 7,2, por um período de 24 horas, lavados em tampão cacodilato de sódio 0,05 M e desidratados em gradiente de acetona (25%, 50%, 75%, 90% e 100%, por três vezes). Em seguida, o material foi levado ao aparelho de ponto crítico CPD 050 (Bal-Tec) para completar a secagem, montado em *stubs* e coberto com ouro em aparelho evaporador de ouro (Sputtering) – SCD 050 (BalTec) (Bozzola & Russell, 1998). As amostras foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura LEO EVO 40 XVP (Carl Zeiss).

2.7 Análises estatísticas

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com quatro tratamentos (níveis de infestação - controle, limpo, sujo I e sujo II) e três repetições para cada região (Cerrado e Sul de Minas). Os dados foram analisados por estatística descritiva e as médias dos valores de OTA foram analisadas pelo software SPEED stat 1.0, procedendo-se à análise de variância (ANOVA) e teste de médias Student Newman Keuls (SNK), a 5% de probabilidade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Percentual de contaminação por fungos

Nas análises de grãos sem desinfecção (SD), a localidade Cerrado apresentou alto percentual de contaminação por fungos, independente dos níveis de infestação da broca-do-café, variando entre 95% e 100% dos grãos infestados. Já para a localidade Sul de Minas houve uma variação maior, sendo o nível brocado limpo aquele com menor número de grãos contaminados, 54% a 70 %, enquanto os demais níveis variaram de 67% a 100 % de grãos infestados (TABELA 1). Nas análises de grãos com desinfecção (CD), para a localidade Cerrado, quanto mais severo o nível de infestação da broca do café, maior foi o percentual de grãos contaminados por fungos. Essa mesma relação foi encontrada para a localidade Sul de Minas, embora em menores proporções.

A microbiota presente em grãos de café é dependente de vários fatores, como clima, susceptibilidade do cafeeiro, manuseio pós-colheita, infestação por pragas, secagem, armazenamento, etc. O maior percentual de contaminação por fungos na localidade Cerrado pode estar associado ao fator clima, já que essas duas regiões apresentam diferenças quanto à temperatura média anual, à pluviosidade e à umidade. No entanto, tratamentos culturais de manejo, como controle de pragas e doenças, e boas práticas agrícolas, durante a pré e a pós-colheita, também são fatores determinantes para a contaminação dos grãos (Paterson et al, 2014).

3.2 Fungos identificados

Foram isolados, no total, 374 fungos (TABELA 2), sendo 239 do plaqueamento sem desinfecção, os quais eram oriundos de uma contaminação

interna e externa dos grãos, e 135 fungos do plaqueamento com desinfecção, oriundos de uma contaminação interna dos grãos. Os fungos isolados foram depositados na coleção de culturas de micro-organismos da Universidade Federal de Lavras (Laboratório de Taxonomia Polifásica de *Aspergillus* e *Penicillium* - LATAX – Departamento de Ciência de Alimentos/ UFLA). A maior quantidade de fungos isolados nos grãos foi daqueles pertencentes ao gênero *Aspergillus*, sendo estes amplamente distribuídos em todos os níveis de infestação, conforme na tabela 2.

Fungos pertencentes a este gênero foram isolados de grãos de café, torrados ou não, em vários outros estudos e são considerados os mais ocorrentes em café (Geremew et al, 2016; Iamanaka et al., 2014; Taniwaki et al, 2014; Vilela et al, 2010; Chalfoun & Batista, 2003). Outro micro-organismo amplamente isolado e distribuído em todos os níveis de infestação da broca-do-café foi *Fusarium stilboides*. Micro-organismos deste gênero são normalmente associados a grãos de café e algumas espécies podem causar uma doença na planta do cafeeiro denominada fusariose. Pérez et al (2003), isolando fungos associados às galerias formadas pelo inseto da broca-do-café nos grãos, encontraram duas espécies de *Fusarium*, que correspondiam a 64% de seus isolados neste ambiente.

A relação entre o nível de infestação da broca-do-café e o aumento do percentual de contaminação comprova que o inseto pode induzir a uma maior contaminação dos grãos. Pérez et al (2003), analisando a microbiota associada à broca-do-café de regiões produtoras do México, isolaram 187 fungos da cutícula, intestino e de fezes do inseto, sendo *Fusarium*, *Penicillium* e *Aspergillus* os gêneros mais abundantes encontrados e a maior presença de fungos presente na cutícula do inseto. No estudo em questão também foram isolados fungos potencialmente toxigênicos, como *Aspergillus niger* e *A. ochraceus*, da cutícula do inseto em duas regiões produtoras do México, demonstrando que ele pode carrear consigo fungos que oferecem risco à segurança do consumidor.

Tabela 1 - Variação de infecção (VI) (%) de fungos nas amostras do plaqueamento direto sem desinfecção (SD) e com desinfecção (CD).

VI	Limpo/Sul de Minas		Sujo I/ Sul de Minas		Sujo II/ Sul de Minas		Controle/ Sul de Minas		Limpo/ Cerrado		Sujo I/ Cerrado		Sujo II/ Cerrado		Controle / Cerrado	
	SD	CD	SD	CD	SD	CD	SD	CD	SD	CD	SD	CD	SD	CD	SD	CD
	54 - 70	6-10	98-100	3-11	83- 92	13-19	67 -100	0 - 4	99-100	19-28	95-100	56-62	95-100	41-77	99-100	7-18

Tabela 2 - Frequência de ocorrência* (%) e potencial toxigênico** (%) dos fungos isolados e identificados no plaqueamento direto sem desinfecção (SD) e com desinfecção (CD).

Espécie	Limpo/Sul de Minas		Sujo I/ Sul de Minas		Sujo II/ Sul de Minas		Controle/ Sul de Minas		Limpo/ Cerrado		Sujo I/ Cerrado		Sujo II/ Cerrado		Controle/ Cerrado		Potencial toxigênico
	SD	CD	SD	CD	SD	CD	SD	CD	SD	CD	SD	CD	SD	CD	SD	CD	
<i>A. brasiliensis</i>	2,8	-	-	-	-	-	-	-	3,5	-	-	-	-	-	-	-	NT
<i>A. flavus</i>	-	-	-	-	4,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NT
<i>A. lanosus</i>	-	-	-	-	-	-	5,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NT
<i>A. niger</i>	28,5	22,2	37	-	20,8	23	28,4	-	14,3	-	34	11,1	22,2	15,3	20,6	-	11,3
<i>A. ochraceus</i>	34,7	33,5	29,6	-	37,7	7,7	16,4	-	20,9	55	38	29,6	55,5	23	44,7	68,1	40
<i>A. oryzae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	3,4	-	-	-	-	-	-	-	NT
<i>A. ostianus</i>	-	-	-	-	-	-	6	-	-	-	-	-	-	11,5	-	-	100
<i>A. sulphureus</i>	-	-	-	-	-	-	2,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NT
<i>A. tamaritii</i>	-	-	-	-	4,1	-	-	-	-	-	-	-	3,7	-	3,4	-	NT
<i>A. tubingensis</i>	2,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NT
<i>Aspergillus</i> sp seção																	
<i>Circumdati</i>	-	11,1	11,1	-	-	23,1	-	-	34,3	15	20	25,9	7,5	19,2	10,3	-	38,5
<i>A. niger agregado</i>	11,4	-	14,9	-	16,6	-	-	-	16,6	-	4	-	-	-	7,1	9	-
<i>Chaetomium globosum</i>	-	-	-	25	-	-	-	-	-	10	-	7,4	-	-	3,4	9	NT
<i>Cladosporium cladosporioides</i> complexo	-	-	-	-	-	-	11,8	60	-	-	-	-	-	3,8	-	-	NT
<i>Eurotium amstelodami</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,9	-	3,8	-	-	-	4,6	NT
<i>F. stilboides</i>	-	27,7	-	75	4,3	23,2	-	40	3,4	10	-	7,4	3,7	15,6	3,7	4,8	NT
<i>P. brevicompactum</i>	14,2	-	-	-	12,4	15,4	23,5	-	3,6	5,1	-	11,1	-	4	6,8	-	NT
<i>P. citrinum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7,4	-	-	4,5	NT
<i>P. commune</i>	2,8	-	7,4	-	-	-	-	-	-	-	4	3,7	-	7,6	-	-	NT
<i>P. italicum</i>	2,8	5,5	-	-	-	7,6	5,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NT

*Frequência de ocorrência: número de isolados da espécie/total de espécies isoladas na amostra; **Potencial toxigênico: número de isolados produtores de toxina/total de isolados da espécie; NT: não testado.

3.3 Potencial toxigênico dos fungos identificados

Dentre os fungos isolados, quatro espécies apresentavam potencial toxigênico para a produção da ocratoxina A. São elas *A. niger*, em que 11,3% eram produtores de ocratoxina A; *A. ochraceus*, 40%; *Aspergillus* seção *Circumdati*, 38,5% e *A. ostianus*, 100% (TABELA 2).

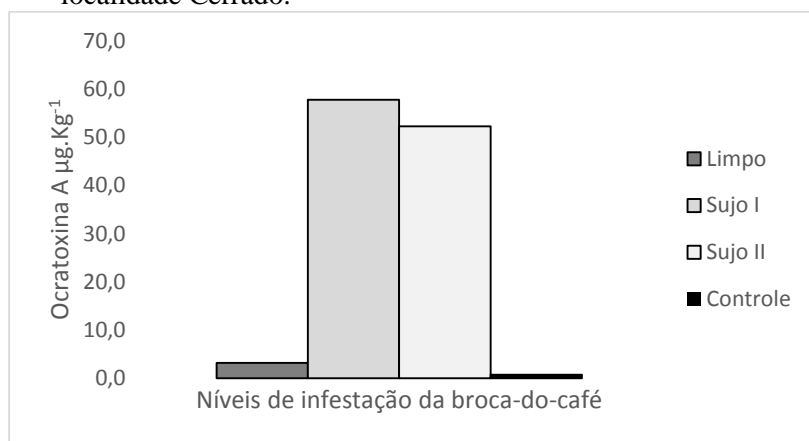
Velmourougane et al (2010), analisando a microbiota associada a frutos atacados e não atacados pela broca-do-café, observaram que o maior percentual de contaminação por fungos estava presente nos frutos atacados pelo inseto, com significativa presença de fungos potencialmente toxigênicos, como *Aspergillus niger* e *Aspergillus ochraceus*. Foi observado também que, dentre os frutos atacados, os oriundos do chão e aqueles remanescentes na planta após a colheita apresentavam teores de ocratoxina A maiores do que os frutos atacados colhidos adequadamente.

3.4 Quantificação de ocratoxina A

O método analítico para a determinação de ocratoxina A apresentou um limite de detecção de $0,6 \mu\text{g.kg}^{-1}$ e limite de quantificação de $1,0 \mu\text{g.kg}^{-1}$. A taxa de recuperação média variou de 86,9% a 90,4%, com coeficiente de variação de 2,6% a 16,3%.

Para a localidade Sul de Minas não foi detectada a presença de ocratoxina A nos grãos, independentemente do nível de infestação da broca-do-café. Já para a localidade Cerrado, teores de ocratoxina A foram detectados em todos os níveis, sendo os níveis de infestação sujo I e sujo II aqueles com maiores teores, com médias de $57,8 \mu\text{g.kg}^{-1}$ e $52,3 \mu\text{g.kg}^{-1}$, respectivamente (FIGURA 2).

Figura 2 - Médias dos teores de ocratoxina A ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) presentes em grãos de cafés com diferentes níveis de infestação da broca do café, oriundos da localidade Cerrado.



Sendo o Cerrado a localidade que apresentou maior incidência de fungos toxigênicos, conforme demonstrado na Tabela 2, os resultados da concentração de ocratoxina A corroboram a presença dos fungos, já que, na localidade Sul de Minas, houve baixa incidência desses fungos, assim como na concentração de toxina. De acordo com Pitt & Hocking (1997) e Serra et al (2006), as espécies de *Penicillium* são frequentemente encontradas em climas temperados a frios, enquanto as espécies de *Aspergillus* são associadas a regiões de clima tropical e quente. As duas regiões em que foram coletadas amostras de café para este estudo apresentam diferenças entre climas, sendo o Cerrado caracterizado por um clima mais quente e seco, enquanto o Sul de Minas é uma região de temperaturas mais amenas e com maior pluviosidade. No entanto, a produção de ocratoxina por um fungo não depende apenas da sua capacidade de produzir ou não a ocratoxina. Fatores externos e ambientais, como temperatura, umidade, disponibilidade de nutrientes e competitividade entre espécies, podem influenciar a expressão do gene responsável pela produção da toxina pelo micro-organismo (Dijksterhuis & Samson, 2007).

A legislação brasileira (Brasil, 2011) não define limites máximos para a presença de ocratoxina A em grãos de café verdes ou crus, mas, para café torrado, há um limite de $10 \mu\text{g.kg}^{-1}$. Levando em consideração que a ocratoxina A é um composto químico de relativa estabilidade térmica, processamentos posteriores, como torrações brandas ou claras, não diminuem a quantidade desse composto nesses grãos de café, colocando em risco a saúde do consumidor (Paterson et al, 2014; Oliveira et al, 2013; Castellanos-Onorio et al, 2011).

3.5 Micrografias de microscopia eletrônica de varredura

As imagens de micrografias eletrônicas de varredura foram realizadas com o objetivo de analisar a estrutura celular interna dos grãos de café, especialmente próximo aos orifícios causados pela broca-do-café durante a infestação aos frutos. Nas imagens de micrografias é possível comparar as estruturas celulares de grãos de café com diferentes níveis de infestação da broca-do-café.

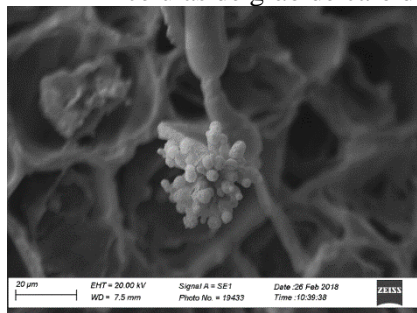
Na figura 3A é possível observar a estrutura reprodutiva de um fungo. Nas figuras 3C e 3E mostram-se as células de grãos de café do tratamento controle das localidades Cerrado e Sul de Minas, respectivamente. Nas figuras 3D e 3F são mostradas as células de grãos de café do tratamento Sujo II da localidade Cerrado e do tratamento Limpo da localidade Sul de Minas, respectivamente. Comparando-se as micrografias dos tratamentos controle (Figuras 3C e 3E) com as dos demais tratamentos (Figuras 3D e 3F) é possível observar uma significativa desorganização celular nos grãos infestados, tal como a presença de hifas e outras estruturas microbianas, indicando que os grãos atacados pela broca-do-café apresentam contaminação por micro-organismos.

Outro fator importante observado durante a análise por imagem dos grãos é a presença de um inseto da broca-do-café no interior de um orifício do grão do

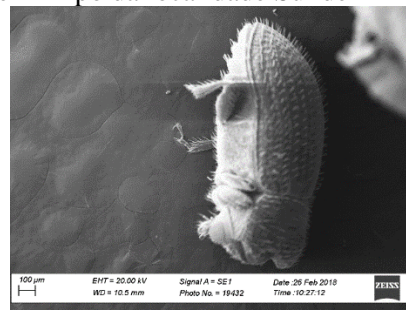
nível de infestação Sujo I da localidade Cerrado (Figura 3 B). A broca-do-café, além de ser um veículo de contaminação dos grãos, pode morrer dentro das galerias após procedimentos agrônômicos de controle da praga, permanecendo no interior dos grãos durante todo o processo de beneficiamento. Ainda não existem estudos que comprovem o potencial tóxico deste inseto à saúde humana. No entanto, o inseto, como veículo contaminador dos grãos, pode carrear consigo, especialmente em sua cutícula, fungos produtores de toxinas que oferecem risco à saúde humana (Pérez et al, 2003).

De acordo com a legislação brasileira (Brasil, 2014), são admitidos até 60 fragmentos de insetos, oriundos de falhas de boas práticas agrícolas e industriais, em 25 g de café torrado e moído. No caso da broca-do-café, a tolerância alta para esse número de fragmentos pode levar ao aceite de grãos muito contaminados, que podem conter significativas concentrações de ocratoxina A. Vale ressaltar que o aspecto visual do grão não é indicativo da presença de micotoxinas, já que este estudo mostra que a maior concentração de ocratoxina A foi encontrada em grãos visualmente não muito danificados, como ilustrado na Figura 1C.

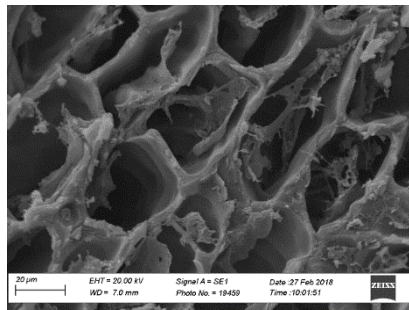
Figura 3 - Micrografias de microscopia eletrônica de varredura. A- estrutura reprodutiva de fungo; B – inseto da broca-do-café presente no interior de um furo de um grão do nível de infestação Sujo I da localidade Cerrado; C – células de grão controle da localidade Cerrado; D - células de grão brocado do tratamento Sujo II da localidade Cerrado; E - células de grão de café Controle da localidade Sul de Minas e F - células de grão de café do nível Limpo da localidade Sul de Minas.



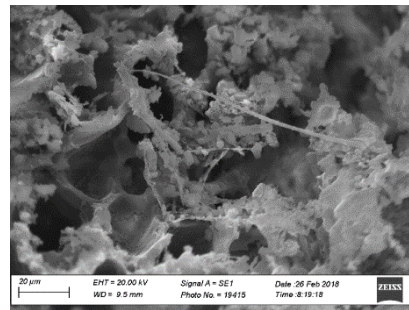
A



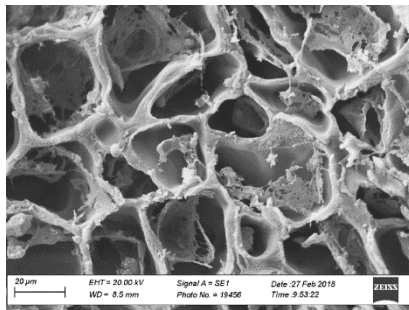
B



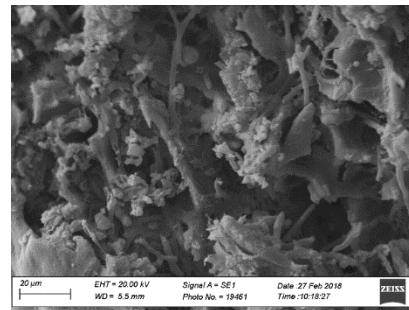
C



D



E



F

4 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos com o presente estudo, existe uma relação entre o nível de infestação da broca-do-café e o aumento do percentual de contaminação fúngica.

Dentre os fungos isolados e identificados, aqueles pertencentes aos gêneros *Fusarium* e *Aspergillus* estavam presentes em maiores proporções e em todos os níveis de infestação do inseto.

Quatro, das vinte espécies isoladas ao total, apresentaram potencial para a produção de ocratoxina A e estavam presentes em todos os níveis de infestação, exceto para o micro-organismo *A. ostianus*.

A presença de ocratoxina A foi detectada apenas nas amostras da região Cerrado, sendo os níveis de infestação Sujo I e II aqueles com maior concentração desse composto.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Cooxupé, pelo fornecimento de amostras de café e às agências de fomento Capes, Fapemig, CNPq e Finep, pelo apoio financeiro e a concessão de bolsas.

REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

- Amézqueta, S., González-Peñas, E., Murillo-Arbizu, M., Cerain, A. L. (2009). Ochratoxin A descontamination: A review. *Food Control*, 20, 326-333.
- Batista, L. R., Chalfoun, S. M., Silva, C. F., Cirillo, M., Varga, E. A., Schwan, R. F. (2009). Ochratoxin A in coffee beans (*Coffea arabica* L.) processed by dry and wet methods. *Food Control*, 20, 784-790.
- BRASIL. Resolução RDC nº 14, de 28 de março de 2014. Aprova do regulamento técnico que dispõe sobre matérias estranhas macroscópicas e microscópicas em alimentos e bebidas, seus limites de tolerâncias e dá outras providências. Órgão emissor: ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2014). http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2966692/RDC_14_2014_.pdf/2ae304af-8f2b-446b-a964-2d13ef295569 /Accessed 20 March 2018.
- BRASIL. Resolução RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011. Aprova do regulamento técnico sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. Órgão emissor: ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2011). http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2968262/RDC_07_2011_COMP.pdf/afe3f054-bc99-4e27-85c4-780b92e2b966 /Accessed 12 March 2018.
- Barrera, J.F. (2008) Coffee pest and their management. In *Encyclopedia of Entomology*; Capinera, J.L, Ed., Springer: Dordrecht, The Netherlands, p.961-998.
- Bozzola, J.J.; Russell, L.D. *Microscopia eletrônica: princípios e técnicas para biólogos*. 2º ed. Jones & Barlett: Sudbury – MA, 1998.
- Castellanos-Onorio, O.; Gonzalez-Rios, O.; Guyot, B.; Fontana, T. A.; Guiraud, J. P.; Schorr-Galindo, S.; Durand, N.; Suárez-Quiroz, M. (2011). Effect of two different roasting techniques on the ochratoxin A (OTA) reduction in coffee beans (*Coffea arabica*). *Food Control*, 22, 1184-1188.

Chalfoun, S. M.; Batista, L. R. *Fungos associados a frutos e grãos do café: Aspergillus e Penicillium*. Brasília: Embrapa, 2003. 69p.

Commission Regulation (EU) N° 105/2010 of 5 February 2010 amending Regulation (EC) N° 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards ochratoxin A. *Official Journal of the European Union*, L 35, 7-8.

Commission Regulation (EU) N° 401/2006 of 23 February 2006 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. *Official Journal of the 35 European Union*, L70, 12–34.

Dijksterhuis, J. & Samson, R.A. *Food mycology: A multifaceted approach to fungi and food*. CRC Press. 2007.

Fundação Procafé - Boletim de Avisos Fitossanitários (2016). Disponível em: <http://fundacaoprocafe.com.br/> Accessed 13 July 2016.

Geremew, T., Abete, D., Landsschoot, S., Haesaert, G., Audenaert, K. (2016). Occurrence of toxigenic fungi and ochratoxin A in Ethiopian coffee for local consumption. *Food Control*, 69, 65-73.

Ha, T. H. (2015). Recent advances for the detection of ochratoxin A. *Toxins*, 7, 5276-5300.

Iamanaka, B T.; Teixeira, A. A.; Teixeira, A. R. R.; Copetti, M. V.; Bragagnolo, N.; Taniwaki, M. H. (2014). The mycobiota of the coffee beans and its influence on the coffee beverage. *Food Research International*, 62, 353-358.

IARC – International Agency for Research on Cancer. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. Lyon, France: 1993, 79, 607-618.

- Infante, F. (2018) Pest management strategies against the coffee berry borer (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 66, p. 5275-5280.
- Klich, M.A. (2002) *Identification of common Aspergillus species*. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures.
- Oliveira, G.; Silva, d. M.; Pereira, R. G. F. A.; Paiva, L. C.; Pa.; Batista, L. R. (2013). Effect of different roasting levels and particle sizes on ochratoxin A concentration in coffee beans. *Food Control*, 34, 651-656.
- Ostry, V., Malir, F., Toman, J., Grosse, Y. (2017). Mycotoxins as human carcinogens – the IARC *Monographs* classification. *Mycotoxin Research*, 33, 65-73.
- Paterson, R. R. M., Lima, N; Taniwaki, M. H. (2014). Coffee, mycotoxins and climate change. *Food Research International*, 61, 1-15.
- Paterson, R. R. M., Lima, N. (2010). How will climate change affect mycotoxins in food? *Food Research International*, 43, 1902-1914.
- Pérez, J.; Infante, F.; Vega, F. E.; Holguín, F.; Macías, J.; Valle, J.; Nieto, G.; Peterson, S. W.; Kurtzman, C. P.; O'donnell, K. (2003). Mycobiota associated with the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*) in Mexico. *Mycological Research*, 107, 879-887.
- Pitt, J. I.; Hocknig, A.D. (1997) *Fungi and food spoilage*. London: Blackie Academic and Professional
- Pitt, J.I. (2000) *A laboratory guide to common Penicillium species*. Melbourne: Food Science Australia.
- Ramirez, L.M.; Cendoya, E.; Nichea, M.J.; Zachetti, V.G.L.; Chulze, S.N. (2018) Impact of toxigenic fungi and mycotoxins in chickpea: a review. *Current Opinion in Food Science*, v. 23, p. 32-37.
- Rezende, E. F., Borges, J. G., Cirillo, M. A., Prado, G., Paiva, L. P., Batista, L. R. (2013). Ochratoxigenic fungi associated with green coffee beans (*Coffea arabica*

- L.) in conventional and organic cultivation in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44, 377-384.
- Rodriguez, D., Cure, J. R., Gutierrez, A. P., Cotes, J. M. (2017). A coffee agroecosystem model: III. Parasitoides of the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*). *Ecological Modelling*, 363, 96-110.
- Rodriguez, D., Cure, J. R., Gutierrez, A. P., Cotes, J. M., Cantor, F. (2013). A coffee agroecosystem model II: Dynamics of a coffee berry borer. *Ecological Modelling*, 248, 203-214.
- Samsom, R. A.; Hoekstra, E.S.; Frisvad, J.C.; Filtenborg, O. (2000) *Introduction to food and air borne fungi*. 4 ed. Wageningen: Central Bureau Voor Schimmel Cultures.
- Serra, R., Lourenço, A., Alípio, P., Venâncio, A. (2006). Influence of the region of origin on the mycobiota of grapes with emphasis of *Aspergillus* and *Penicillium* species. *Mycological Research*, 110, 971-978.
- Sorrenti, V., Di Giacomo, C., Acquaviva, R., Barbagallo, I., Bognanno, M., Galvano, F. (2013). Toxicity of Ochratoxin A and its Modulation by Antioxidants: A review. *Toxins*, 5, 1742-1766.
- Taniwaki, M. H.; Teixeira, A. A.; Teixeira, A. R. R.; Copetti, M. V.; Iamanaka, B T. (2014). Ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in defective coffee beans. *Food Research International*, 61, 161-166.
- Taniwaki, M. H., Pitt, J. I., Teixeira, A. A., Iamanaka, B. T. (2003). The source of ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to processing methods. *International Journal of Food Microbiology*, 82, 173-179.
- Vega, F. E., Infante, F., Johnson, A. J. (2015) The genus *Hypothenemus*, with emphasis on *H. hampei*, the coffee berry borer. In *Bark Beetles: Biology and Ecology of Native and Invasive Species*; Vega, F. E., Hoffstetter, R.W., Eds.; Academic Press: San Diego, CA, p. 427-494.

Vega, F. E., Infante, E., Castilho, A., Jaramillo, J. (2009). The coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae): a short review, with recent findings and future research directions. *Terristrial Arthropod Reviews*, 2, 129-147.

Vega, F. E., Franqui, R.A.; Benavides, P.B. (2002) The presence of the coffee berry borer, *Hipothenemus hampei*, in Puerto Rico: fact or fiction? *Journal of Insect Science*, v.2, p. 1-3.

Velmourougane, K.; Bhat, R.; Gopinandhan, T. N. (2010). Coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*) - A vector for toxigenic molds and ochratoxin A contamination in coffee beans. *Foodborne Pathogens and Disease*, v.7, n. 10, p. 1279-1284.

Vilela, D. M., Pereira, G. V. M., Silva, C. F., Batista, L. R., Schwam, R. F. (2010). Molecular ecology and polyphasic characterization of the microbiota associated with semi-dry processed coffee (*Coffea arabica* L.) *Food Microbiology*, 27, 1128-1135.

ARTIGO 2**Influência da infestação de *Hypothenemus hampei* sobre a qualidade dos grãos de café****Revista Journal of the Science of Food and Agriculture**

(Versão Preliminar)

Resumo: Os atributos físicos e químicos dos grãos de café mantêm estreita relação com a qualidade da bebida e o valor de mercado da commodity. A broca-do-café é uma praga que tem causado prejuízo em todo o mundo e seus danos comprometem a sanidade dos grãos. O objetivo, neste estudo, foi verificar o efeito da infestação sobre parâmetros físicos e químicos dos grãos. Amostras de café foram coletadas e os grãos brocados presentes nas amostras foram classificados quando ao nível de infestação. Foram realizadas análises de composição centesimal, densidade, cor, compostos bioativos e ácidos orgânicos. A densidade do café diminuiu desde o primeiro nível de infestação, sendo mais afetada no nível “sujo II”. Os parâmetros L* e b* do sistema CIELab de cores variaram entre os níveis. Para os parâmetros físico-químicos, “sujo II” foi o que mais diferiu dos demais, com menores concentrações de açúcares, compostos lipídicos e sólidos solúveis, e maiores valores de cinzas, acidez titulável total, condutividade elétrica, lixiviação de potássio, ácido succínico e acético. Os compostos bioativos do café não foram influenciados pela praga.

Palavras-chave: broca-do-café, acidez, açúcares, densidade, cor, qualidade da bebida.

1 INTRODUÇÃO

O café é um alimento classificado quanto ao seu aspecto físico e sensorial e seu preço de comercialização é dependente da junção de ambos. A classificação física do café é realizada com base na cor e no tamanho dos grãos, e na presença de grãos defeituosos e de outras impurezas na amostra analisada. A classificação sensorial é realizada mediante análise de prova de xícara, em que um ou mais provadores treinados e capacitados degustam o café e o classificam, levando em consideração a presença de atributos sensoriais negativos ou positivos ao paladar (Brasil, 2003; SCAA, 2009). Por sua vez, esses atributos sensoriais variam conforme a composição química do grão.

Os grãos de café apresentam uma grande variedade de compostos químicos e sua composição química pode variar devido a diversos fatores, como espécie, cultivar, local de cultivo, tipo de processamento pós-colheita, estágio de maturação dos frutos no momento da colheita, condições de armazenamento, etc. (Ciaramelli et al, 2019; Cid e Peña, 2016). Outro fator que pode influenciar a composição química de um grão de café é a sanidade dos grãos. Quando um grão/fruto de café sofre ataque de um agente externo, seja ele praga ou micro-organismo, são desencadeadas várias reações do metabolismo secundário do fruto, numa tentativa de sanar/minimizar os efeitos negativos do agente. Essas reações enzimáticas podem levar à produção e/ou degradação de vários tipos de compostos que por sua vez, irão alterar a composição química deste grão (Toci e Farah, 2014; Toci e Farah, 2008). Além disso, o próprio agente externo pode produzir compostos químicos que irão alterar a composição química do grão, como é o caso dos micro-organismos, que podem produzir ácidos orgânicos oriundos da fermentação, e micotoxinas, produzidas por algumas espécies de fungos (Ha, 2015; Taniwaki et al, 2014).

A broca-do-café (*Hypothenemus hampei*) é a praga de maior importância para a cultura do cafeeiro em todo o mundo, pois está presente em todas as localidades produtoras de café e seu controle é de difícil condução. Este inseto passa a maior parte de seu ciclo de vida no interior de frutos de café, minimizando a eficiência de métodos químicos de controle por contato. Esta praga infesta frutos do cafeeiro perfurando-os ainda no campo, construindo um orifício do exocarpo até o endosperma. No endosperma, a fêmea ovípara e as larvas originadas irão se alimentar da semente até evoluírem para o próximo estágio de desenvolvimento (Infante, 2018; Vega et al, 2009).

O orifício causado pela broca-do-café pode facilitar a contaminação dos grãos, seja pela microbiota presente no ar, que irá colonizar no fruto através do orifício formado, seja por micro-organismos presentes no próprio inseto, como na cutícula, nas patas e asas e/ou no aparelho mastigador (Plata-Rueda et al, 2019; Velmourogane et al, 2010; Damom, 2000). No entanto, informações sobre as alterações químicas que a broca-do-café e micro-organismos associados a ela podem desencadear nos grãos de café ainda são escassas.

Walker et al (2019) avaliaram o perfil volátil de grãos de café do Havá com diferentes níveis de infestação da broca-do-café e observaram que os níveis de infestação do inseto geraram diferenças no perfil volátil dos grãos. Compostos como hexanal e 2-pentilfurano estavam correlacionados com grãos de café mais severamente danificados pela praga. Dessa maneira, este estudo foi realizado com o objetivo de analisar alterações nos atributos físicos e químicos de grãos de café brocados, em diferentes níveis de infestação da broca-do-café.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Coleta e preparo das amostras

As amostras de grãos de café utilizadas neste estudo foram coletadas em duas regiões produtoras do estado de Minas Gerais, Brasil, que têm alto índice de incidência da broca-do-café, Cerrado e Sul de Minas. Foram coletados 60 kg de grãos de café beneficiados de cada região, os quais foram classificados manualmente para seleção e categorização dos grãos, quanto ao nível de infestação da broca do café. A categorização foi realizada com base no número de furos contidos nos grãos e quanto à presença ou à ausência de coloração no interior dos furos, originando quatro categorias em cada região, sendo elas (FIGURA 1):

. controle: composta por grãos perfeitos, isentos de quaisquer tipos de defeitos;

. brocado limpo: composta por grãos contendo até dois furos ausentes de alteração de coloração no seu interior;

. brocado sujo I: composta por grãos contendo até dois furos com alteração de coloração no seu interior;

. brocado sujo II: composta por grãos contendo de três a seis furos com alteração de coloração no seu interior.

Figura 1 - Categorização dos grãos de acordo com o número de furos e alteração de coloração - controle (A); brocado limpo (B); brocado sujo I (C) e brocado sujo II (D).



2.2 Análises físicas de cor e densidade

Para a análise de cor, a amostra foi espalhada em uma placa de Petri de 15 cm de diâmetro, disposta sobre uma superfície escura, de modo que toda a placa fosse coberta por grãos de forma homogênea. A cor foi determinada utilizando-se colorímetro Minolta, modelo R300, fazendo-se a leitura dos valores de $L^*a^*b^*$ em cinco pontos equidistantes da placa (Oliveira et al, 2016). A densidade dos grãos foi determinada utilizando-se o peso dos grãos contidos em instrumento de volume conhecido.

2.3 Análises físico-químicas

As análises físico-químicas foram realizadas no laboratório de análises de alimentos da Empresa Mineira de Pesquisa Agropecuária (Epmig), unidade Sul de Minas. Foram realizadas as seguintes análises: umidade (ISO, 2003), cinzas, extrato etéreo, proteínas, açúcares totais, sólidos solúveis, pH, acidez titulável (AOAC, 2000), lixiviação de potássio (PRETE, 1992) e condutividade elétrica (KRYZYANOWSKI et al, 1991).

2.4 Quantificação de trigonelina, cafeína e ácido clorogênico.

A extração dos compostos bioativos foi realizada em banho-maria, a 90 °C, durante três minutos, utilizando-se 0,5 g de amostra, moídas em nitrogênio líquido e peneiradas em peneira de abertura de 0,42 mm, e 50 mL de água destilada. A mistura foi filtrada em papel de filtro nº 4 e em filtro de seringa hidrofílica de 0,45 µm. O filtrado foi injetado em cromatógrafo a líquido UFLC Shimadzu, equipado com bomba quaternária de alta pressão modelo LC-20AT, desgasificador modelo DGU-20A5, interface modelo CBM-20A, injetor

automático modelo SIL-20A-HT e detector UV-Vis (SPD-20A). A coluna utilizada foi do tipo Shim-pack CLC-ODS (6,0 x 150 mm, 5 µm) conectada a uma pré-coluna Eclipse XDB-C18 (4,6 x 12,5 mm, 5 µm). A fase móvel para a eluição dos compostos analisados contou com uma solução de ácido acético 1% em água (solvente A) e metanol (solvente B), obedecendo à proporção: água/metanol/ácido acético (85:14:1% v/v). As amostras e os padrões (cafeína marca Fluka/pureza > 99%; trigonelina marca Sigma-Aldrich/pureza > 99%; ácido clorogênico 5-CQA marca Sigma-Aldrich/ pureza > 95%) foram eluídos em modo isocrático. O comprimento de onda utilizado foi de 272 nm, fluxo de 1,0 mL/min, temperatura do forno de 40 °C e volume de injeção de 20 µL (Malta e Chagas, 2009)

2.5 Quantificação de ácidos orgânicos

As amostras foram moídas em moinho analítico tipo IKA, modelo A11Basic, em nitrogênio líquido por, aproximadamente, 1 minuto. Em seguida, as amostras foram peneiradas em peneiras de abertura de 0,42 mm. Foram pesados 0,5 g dessas amostras peneiradas que foram diluídas em 50 mL de ácido perclórico 0,23% e transferidas para um tubo tipo Falcon de 50 mL. A mistura foi agitada em Vortex, por três minutos. A mistura obtida foi filtrada em filtro de papel quantitativo e em filtro de seringa de 0,45 µm e, posteriormente, foram injetados 20 µL no cromatógrafo a líquido (RIBEIRO et al., 2018). O equipamento utilizado foi da marca Shimadzu, equipado com bomba quaternária de alta pressão modelo LC-20AT, degaseificador modelo DGU-20A5, interface modelo CBM-20A, injetor automático modelo SIL-20A-HT e detector UV-visível (SPD-20A). A coluna utilizada foi tipo supelcogel C-610H (30 cm x 7,8 MM d. i.) conectada a uma pré-coluna Supelcogel (5 cm x 4,6 mm d. i.) e a fase móvel composta por ácido perclórico 0,23% (Jham et al, 2002). Os padrões utilizados foram ácido acético marca J.T. Backer/pureza > 99,7%; ácido oxálico marca Sigma-

Aldrich/pureza > 99%; ácido crítico marca Sigma-Aldrich/pureza > 99,7%; ácido málico marca Sigma-Aldrich/pureza > 98%; ácido quínico marca Sigma-Aldrich/pureza > 98% e ácido succínico marca Sigma-Aldrich/pureza > 99%.

2.6 Análises estatísticas

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com quatro tratamentos (níveis de infestação - controle, limpo, sujo I e sujo II) e três repetições. Os dados foram analisados pelo software SPEED stat 1.0, em que se procedeu à análise de variância (ANOVA) e teste de médias Student Newman Keuls (SNK), a 5% de probabilidade.

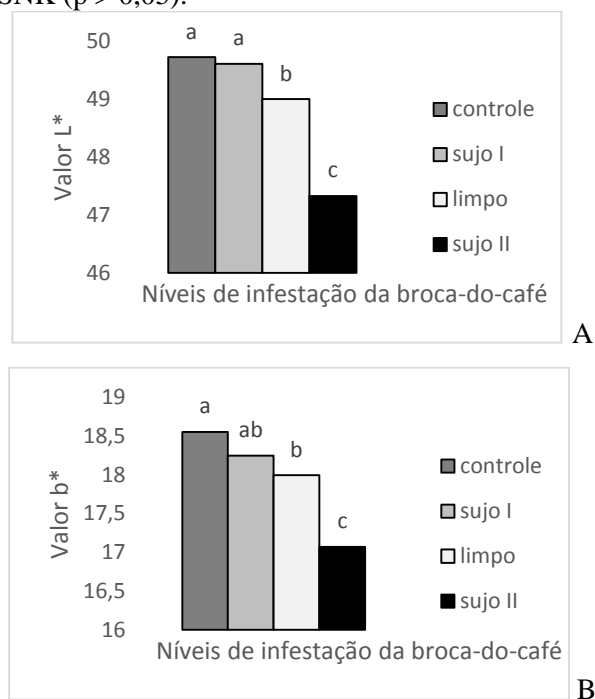
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Cor e densidade

Durante a seleção e a categorização dos grãos de café utilizados neste estudo, a alteração de coloração no interior dos furos feitos pela broca-do-café foi levada em consideração, conforme consta na Figura 1. Essa alteração de coloração também é levada em consideração quando se procede à classificação física dos grãos de acordo com a Classificação Oficial Brasileira (COB) (BRASIL, 2003), na qual se atribui maior peso para grãos de café brocados com alteração de coloração. Dessa forma, um determinado lote com maior número de grãos brocados “sujos” terá uma maior pontuação, resultando em uma classificação por tipo de menor qualidade e, conseqüentemente, de menor preço.

De acordo com os resultados deste estudo, a coloração dos grãos diferiu entre os níveis de infestação da broca-do-café, sendo os tratamentos “limpo” e “sujo II” diferentes entre si e diferentes dos tratamentos controle e “sujo I”, para os parâmetros L^* e b^* do sistema CIELab de cores (FIGURA 2). O sistema tridimensional CIELab de cores determina a cor de uma determinada amostra ou objeto por meio dos valores de L^* , que mede a luminosidade da amostra (0-100); a^* , que mede a variação de cor de verde ao vermelho (-120 a +120) e b^* , que mede a variação de cor entre o azul e amarelo (-120 a +120) (Oliveira et al, 2016). Os tratamentos “limpo” e “sujo II” apresentaram menores valores de L^* e b^* , o que significa que os grãos das amostras eram mais escuros, tendendo a ter coloração mais azulada.

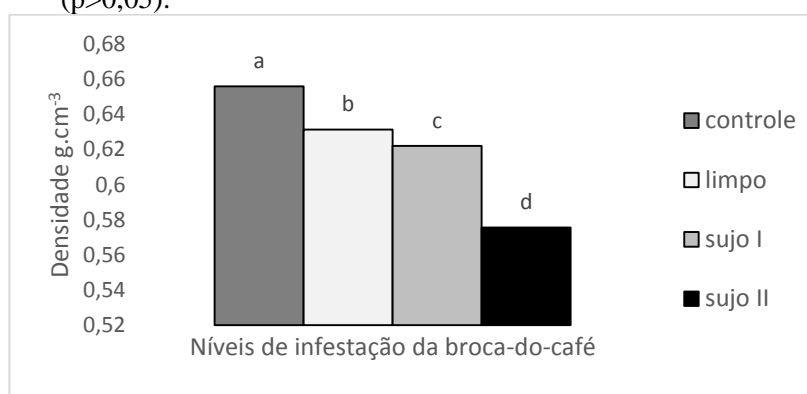
Figura 2 - Média dos valores L* (A) e b* (B) de cores dos grãos de café com diferentes níveis de infestação da broca-do-café. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si, de acordo com o teste SNK ($p > 0,05$).



Com relação à densidade, foi possível observar diferenças significativas entre os quatro níveis de infestação da broca-do-café, conforme mostrado na Figura 3. O café é uma commodity comercializada com base em uma classificação física e sensorial (BRASIL, 2003) e o preço pago por uma saca de 60 kg varia conforme essas classificações. Se o nível de infestação da broca-do-café influencia negativamente a densidade dos grãos, um maior volume de café será necessário para compor uma saca de 60 kg, quando houver, no lote, a presença de grãos brocados com maior número de furos, causando prejuízo ao produtor. Além disso, grãos de café brocados com maior número de furos tendem a ter menor resistência física a operações de beneficiamento e rebeneficiamento, podendo

quebrar e causar prejuízos, seja pelo aumento do número de defeitos de café, durante a classificação por tipo, ou pelo maior volume de grãos “tipo escolha” (Souza et al, 2013; BRASIL, 2003).

Figura 3 - Média dos valores de densidade dos grãos de café com diferentes níveis de infestação da broca-do-café. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si, de acordo com o teste SNK ($p>0,05$).



3.2 Análises físico-químicas

Os resultados das análises físico-químicas estão resumidos na Tabela 1. Somente os parâmetros proteína e umidade não apresentaram diferenças significativas entre os níveis de infestação da broca-do-café.

Tabela 1 - Média e desvio padrão dos teores de sólidos solúveis (g.100 g MS⁻¹), acidez titulavel total (mL de NaOH 0,1 N.100 g⁻¹), açúcares totais (g.100 g MS⁻¹), extrato etéreo (g.100 g MS⁻¹), proteína (g.100 g MS⁻¹), cinzas (g.100 g MS⁻¹), umidade (%), condutividade elétrica (µS.cm.g⁻¹) e lixiviação de potássio (ppm), em grãos de café com diferentes níveis de infestação da broca-do-café.

Tratamento	Sólidos solúveis	Acidez titulável	Açúcares totais	pH	Extrato etéreo	Proteína	Cinzas	Umidade	Condutividade elétrica	Lixiviação de potássio
Limpo	35,208 ^a ±1,671	221,250 ^b ±3,310	9,344 ^b ±0,301	6,114 ^b ±0,020	7,850 ^b ±0,120	12,883 ^a ±0,570	4,038 ^b ±0,131	10,867 ^a ±0,618	134,383 ^b ±9,558	35,192 ^b ±21,310
Sujo I	35,937 ^a ±1,860	212,500 ^c ±6,500	9,991 ^a ±0,299	6,118 ^b ±0,050	7,975 ^{ab} ±0,380	13,287 ^a ±0,760	4,093 ^b ±0,211	10,847 ^a ±0,628	140,978 ^b ±17,752	45,526 ^b ±10,810
Sujo II	32,500 ^b ±0,002	229,166 ^a ±4,701	7,791 ^c ±0,311	6,168 ^a ±0,031	7,191 ^c ±0,261	13,358 ^a ±0,641	4,450 ^a ±0,133	10,809 ^a ±0,677	244,549 ^a ±17,897	64,428 ^a ±16,900
Controle	35,625 ^a ±1,708	214,062 ^c ±5,200	9,766 ^a ±0,310	6,103 ^b ±0,019	8,200 ^a ±0,419	12,913 ^a ±0,577	4,152 ^b ±0,176	11,265 ^a ±0,776	113,528 ^c ±14,672	38,809 ^b ±13,350

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si, de acordo com o teste SNK (p>0,05).

A quantidade de sólidos solúveis presentes no café é composta, principalmente, por açúcares, cafeína, trigonelina e ácidos clorogênicos. Para os quatro níveis de infestação da broca-do-café, não houve variação nas concentrações de cafeína, trigonelina e ácido clorogênico (TABELA 2). Para o parâmetro açúcares totais, o tratamento “sujo II” apresentou menores concentrações desse composto, assim como menores concentrações de sólidos solúveis foram observadas para esse nível. Os açúcares são os principais compostos utilizados como substrato do metabolismo de micro-organismos, especialmente fungos (Khosravi et al, 2015). A menor quantidade desses compostos nos grãos com nível de infestação da broca-do-café mais severo pode estar relacionada a uma contaminação microbiana, devido à facilidade de entrada de micro-organismos através do orifício aberto pelo inseto (Velmourougane et al, 2010).

Para o nível de infestação “sujo II” constataram-se maiores valores de acidez. Naturalmente, o café tem compostos ácidos em sua composição química. Uma razão para o aumento da acidez das amostras é a presença de micro-organismos produtores de compostos ácidos, tais como fungos, leveduras e bactérias (Dezam et al, 2017; Chalfoun e Batista, 2003). Devido ao maior número de furos nesse nível, a probabilidade de contaminação microbiana aumenta, aumentando, assim, a presença de compostos ácidos na amostra, oriundos do metabolismo microbiano (Velmourougane et al, 2010).

A concentração de extrato etéreo no tratamento “sujo II” foi inferior à observada nos demais tratamentos. Os danos causados pela broca-do-café aos grãos podem causar oxidação dos compostos lipídicos do grão. Rodarte (2008), analisando cafés de diferentes qualidades, observou que maiores teores lipídeos estavam presentes em bebidas de melhor qualidade e dispostos, fisicamente, nas regiões periféricas dos grãos. Dentre os principais ácidos graxos presentes no café, destacam-se os ácidos palmítico e linoleico, sendo este último facilmente

propenso à oxidação. Os ácidos graxos palmítico, esteárico e araquidônico foram relacionados a bebidas de melhor qualidade em outros estudos (Hurtado-Benavides et al, 2016; Pereira et al, 2015).

O tratamento “sujo II” também apresentou maior teor de cinzas, quando comparado aos demais níveis de infestação da broca. Esse aumento no teor de minerais na amostra pode estar relacionado à presença de micro-organismos contaminantes que apresentam, em suas estruturas celulares, compostos inorgânicos, tais como cálcio (Mouginot et al, 2014). Outra hipótese a ser considerada seria quanto ao próprio inseto. Durante práticas agrícolas de controle da praga, o inseto pode vir a morrer no interior dos grãos de café, especialmente quando há uso de agentes químicos não desalojantes, aumentando, assim, a quantidade de cinzas presentes da amostra.

As análises de condutividade elétrica e lixiviação de potássio são comumente utilizadas nas sementes de modo geral e, em especial, nos grãos de café, para avaliar a estruturação das células, especialmente quanto ao rompimento de membranas celulares e ao extravasamento de conteúdos celulares. Quanto maior a desestruturação celular, maiores serão os valores encontrados para condutividade elétrica e lixiviação de potássio e menor é a qualidade fisiológica do grão (Costa e Carvalho, 2006). O tratamento “sujo II” diferiu dos demais tratamentos para ambas as análises, sendo possível observar que o maior nível de infestação da broca-do-café eleva os valores de condutividade elétrica e lixiviação de potássio, devido ao rompimento das membranas celulares causado pelo dano físico do inseto e das larvas que se alimentam do endosperma do grão nos estádios iniciais do ciclo de vida (Rodriguez et al, 2013; Vega et al, 2009).

3.3 Trigonelina, cafeína e ácido clorogênico

Os resultados da quantificação dos compostos bioativos do café (trigonelina, cafeína e ácido clorogênico) mostram que não existe relação entre nível de infestação da broca-do-café e o teor desses compostos nos grãos (TABELA 2). O café é um alimento rico em compostos com capacidade antioxidante, que podem reduzir estresses oxidativos no corpo humano, desempenhando efeito neuroprotetor e hipertensor. Os ácidos clorogênicos (3-CQA, 4-CQA e 5-CQA) são os principais compostos bioativos do café, sendo encontrados em maiores concentrações nos grãos da espécie robusta (Wongsa et al, 2019; Jeszka-Skowron^a et al, 2016). A origem dos grãos também é um fator que pode influenciar quantitativamente os teores desse composto (Jeon et al, 2017; Jeszka-Skowron^b et al, 2016).

Tabela 2 - Média e desvio padrão dos teores de cafeína, trigonelina e ácidos clorogênicos ($\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1}$) em grãos de café com diferentes níveis de infestação da broca-do-café.

Tratamento	Cafeína	Trigonelina	Ácidos clorogênicos
Limpo	1,3547 ^a ± 0,046	1,8212 ^a ± 0,101	4,3716 ^a ± 0,162
Sujo I	1,3526 ^a ± 0,073	1,8100 ^a ± 0,170	4,3238 ^a ± 0,145
Sujo II	1,3650 ^a ± 0,096	1,8731 ^a ± 0,169	4,4182 ^a ± 0,354
Controle	1,2835 ^a ± 0,119	1,7873 ^a ± 0,227	4,3298 ^a ± 0,379

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si, de acordo com o teste SNK ($p > 0,05$).

3.4 Ácidos orgânicos

Dos seis ácidos orgânicos quantificados nas amostras, não houve variação entre níveis de infestação da broca-do-café para os ácidos cítrico, málico e quínico (TABELA 3). O nível “sujo II” continha maiores concentrações de ácidos acético e succínico, quando comparado aos demais níveis. Ambos os ácidos são

encontrados naturalmente presentes em grãos de café (Dong et al, 2017; Galli e Barbas, 2004). No entanto, para o ácido acético, concentrações elevadas desse composto estão associadas à presença de fungos contaminantes, que o produzem como produto de seu metabolismo. Este ácido também tem estreita relação com a qualidade sensorial da bebida e é relacionado a grãos que passaram por algum tipo de fermentação indesejada, como os grãos defeituosos ardidos e pretos, sendo a concentração de ácido acético inversamente proporcional à bebida de melhor qualidade (Casas et al, 2017).

Tabela 3 - Média e desvio padrão dos teores de ácido oxálico, ácido cítrico, ácido málico, ácido quínico, ácido succínico e ácido acético (g.100 g⁻¹) em grãos de café com diferentes níveis de infestação da broca-do-café.

Tratamento	Ácido oxálico	Ácido cítrico	Ácido málico	Ácido quínico	Ácido succínico	Ácido acético
Limpo	0,0683 ^a ±0,012	1,3046 ^a ±0,068	0,4120 ^a ±0,028	0,3297 ^a ±0,011	0,3455 ^b ±0,087	0,4390 ^b ±0,050
Sujo I	0,0579 ^{bc} ±0,013	1,2422 ^a ±0,143	0,4142 ^a ±0,030	0,3106 ^a ±0,015	0,3671 ^b ±0,041	0,3794 ^b ±0,079
Sujo II	0,0513 ^c ±0,006	1,2422 ^a ±0,077	0,6037 ^a ±0,081	0,3275 ^a ±0,015	0,4316 ^a ±0,031	0,6913 ^a ±0,149
Controle	0,0659 ^{ab} ±0,014	1,2276 ^a ±0,125	0,3688 ^a ±0,038	0,3059 ^a ±0,030	0,3541 ^b ±0,027	0,3933 ^b ±0,048

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si, de acordo com o teste SNK ($p > 0,05$).

4 CONCLUSÃO

Foram observadas alterações nos atributos físicos e químicos dos grãos de café, de acordo com a intensidade de infestação da praga, sendo

- a densidade do café diminuiu desde o primeiro nível de infestação do inseto, sendo mais afetada no nível de infestação mais severo “sujo II”;
- a cor dos grãos foi influenciada pela praga;
- o nível de infestação “sujo II” foi o que mais diferiu dos demais níveis quanto à composição físico-química dos grãos. Também apresentou menores concentrações de açúcares, compostos lipídicos e sólidos solúveis, e maiores valores de cinzas, acidez titulável total, condutividade elétrica, lixiviação de potássio, ácido succínico e acético;
- trigonelina, cafeína e ácidos clorogênicos não foram afetados pelos danos causados pelo inseto.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Cooxupé, pelo fornecimento de amostras de café e às agências de fomento Capes, Fapemig, CNPq e Finep, pelo apoio financeiro e a concessão de bolsas.

REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

AOAC - Association of Official Agricultural Chemistry. Official methods of the Association of the Agricultural Chemists. 15th ed. Washington, 2000. 1094 p.

BRASIL - Instrução normativa nº 8, de 11 de junho de 2003. Aprova o regulamento técnico de identidade e qualidade para a classificação do café beneficiado grão cru. Órgão emissor: MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2003) Available in: http://www.codapar.pr.gov.br/arquivos/File/pdf/cafebenef008_03.pdf /Accessed in 12 December 2018.

Casas, M.I.; Vaughan, M.J.; Bonello, P.; Gardener, M.; Grotewold, E.; Alonso, A.P. (2017) Identification of biochemical features of defective *Coffea arabica* L. beans. *Food Research International*, v. 95, p. 59-67.

Chalfoun, S. M.; Batista, L. R. *Fungos associados a frutos e grãos do café: Aspergillus e Penicillium*. Brasília: Embrapa, 2003. 69p.

Ciaramelli, C.; Paumioli, A.; Airoldi, C. (2009) Coffee variety, origin and extraction procedure: implications for coffee beneficial effects on human health. *Food Chemistry*, v. 278, p. 47-55.

Cid, M.C.; Peña, M-P. (2016) Coffee: analysis and composition. *Encyclopedia of Food and Health*, p. 225-231.

Costa, P.S.C.; Carvalho, M.L.M. (2006) Teste de condutividade elétrica individual na avaliação da qualidade fisiológica das sementes de café (*Coffea arabica* L.) *Ciência e Agrotecnologia*, v. 30, n. 1, p. 92-96.

Damom, A. (2000) A review of the biology and control of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). *Bulletim of the Entomological Research*, v. 90, n. 6, p. 453-465.

- Dezam, A.P.G.; Vasconcellos, V.M.; Lacava, P.T.; Farinas, C.S. (2017) Microbial production of organic acids by endophytic fungi. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 11, p. 282-287.
- Dong, W.; Hu, R.; Chu, Z.; Zhao, J.; Tan, L. (2017) Effect of different drying techniques on bioactive components, fatty acid composition, and volatile profile of robusta coffee beans. *Food Chemistry*, v. 234, p. 121-130.
- Galli, V.; Barbas, C. (2004) Capillary electrophoresis for the analysis short-chain organic acids in coffee. *Journal of Chromatography A*, v. 1032, p. 299-304.
- Ha, T. H. (2015). Recent advances for the detection of ochratoxin A. *Toxins*, 7, 5276-5300.
- Hurtado-Benavides, A.; Dorado, D. A.; Sánchez-Camargo, A.P. (2016) Study of the fatty acid profile and the aroma composition of oil obtained from roasted Colombian coffee beans by supercritical fluid extraction. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 113, p. 4452.
- Infante, F. (2018) Pest management strategies against the coffee berry borer (Coleoptera: Curculionidae: Scolytidae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 66, p. 5275-5280.
- ISSO - International Organization for Standardization. Green coffee: determination of loss in mass at 105 °C: ISO 6673. Geneva, 2003. 17 p.
- Jeon, J.; Kim, H.; Jeong, I.; Hong, S.; Oh, M.; Park, K.; Shim, J.; El-Aty, A.M.A. (2017) Determination of chlorogenic acids and caffeine in homemade brewed coffee prepared under various conditions. *Journal of Chromatography B*, v. 1064, p. 115-123.
- ^aJeszka-Skowron, M.; Stanisz, E.; Paz de Peña, M. (2016) Relationship between antioxidant capacity, chlorogenic acids and elemental composition of green coffee. *LWT- Food Science and Technology*, v. 73, p. 243-250.
- ^bJeszka-Skowron, M.; Sentkowska, A.; Pyrznska, K.; Paz de Peña, M. (2016) Chlorogenic acids, caffeine content and antioxidant properties of green coffee

extracts: influence of green coffee preparation. *European of Food Research Technology*, v. 242, p. 1403-1409.

Khosravi, C.; Benocci, T.; Battaglia, E.; Benoit, I.; Vries, R.P. (2015) Sugar catabolism in *Aspergillus* and other fungi related to the utilization of plant biomass. *Advances in Applied Microbiology*, v. 90, p. 1-28.

Krzyzanowski, F. C.; França Neto, J. B.; Henning, A. A. Relatos dos testes de vigor disponíveis as grandes culturas. Informativo ABRATES, Brasília, v.1, n.2, p.15-50, 1991.

Malta. M.R.; Chagas, S.J. (2009) Avaliação de compostos não voláteis em diferentes cultivares de cafeeiro produzidas na região sul de Minas Gerais. *Acta Scientiarum Agronomy*, v. 31, p. 57-61.

Mouginot, C.; Kawamura, R.; Matulich, K.L.; Berlemont, r.; Allison, S.D.; Amend, A.S.; Martiny, A.C. (2014) Elementar stoichiometry of fungi and bacteria strains from grassland leaf litter. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 76, p. 278-285.

Oliveira, E.M.; Leme, D.S.; Barbosa, B.H.G.; Rodarte, M.P.; Pereira, R.G.F.A.P. (2016) A computer vision system for the coffee beans classification based in computational intelligence techniques. *Journal of Food Engineering*, v. 171, p. 22-27.

Pereira, L.F. Borém, F.M.; Ribeiro, F.C.; Giomo, G.S.; Taveira, J.H.S.; Malta, M.R. (2015) Fatty acid profiles and parameters of quality of specialty coffees produced in different Brazilian regions. *African Journal of Agricultural Research*, v. 10, n. 35, p. 3484-3493.

Plata-Rueda, A.; Martinez, L.C.; Costa, N.C.R.; Zanuncio, J.C.; Fernandes, M.E.S.; Serrão, J.E.; Guedes, R.NC.; Fernandes, F.L. (2019) Chlorantraniliprole – mediated effects on survival, walking abilities, and respiration of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 17, p. 53-58.

- 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. Dissertação de Mestrado.
- Ribeiro, D.E.; Borém, F.M.; Nunes, C.A.; Alves, A.P.C.; Santos, C.M.; Taveira, J.H.S.; Dias, L.L.C. (2018) Profile of organic acids and bioactive compounds in the sensory quality discrimination of arabica coffee. *Coffee Science*, v. 12, n. 2, p. 187-197.
- Rodriguez, D., Cure, J. R., Gutierrez, A. P., Cotes, J. M., Cantor, F. (2013). A coffee agroecosystem model II: Dynamics of a coffee berry borer. *Ecological Modelling*, 248, 203-214.
- Rodarte, M.P. (2008) Análise sensorial, química e perfil de constituintes voláteis de cafés especiais. *Thesis* (Doctor degree in Food Science) at Federal University of Lavras, 147p.
- SCAA – Specialty Coffee Association of American. (2009) Protocols – *Cupping Specialty Coffee*. Long Beach: SCAA, 7p.
- SOUZA, J.C.; REIS, P.R.; SILVA, R.A.; CARVALHO, T.A.F.; PEREIRA, A.B. Controle químico da broca-do-café com cyantraniliprole. *Coffee Science*, v.8, n.4, p. 404-410, 2013.
- Taniwaki, M. H.; Teixeira, A. A.; Teixeira, A. R. R.; Copetti, M. V.; Iamanaka, B T. (2014). Ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in defective coffee beans. *Food Research International*, 61, 161-166.
- Toci, A.T.; Farah, A. (2014) Volatile fingerprint of Brazilian defectives seeds: corroboration of potential marker compounds and identification of a new low quality indicators. *Food Chemistry*, v. 153, p. 298-314.
- Toci, A.T.; Farah, A. (2008) Volatile compounds as potential defective coffee beans' markers. *Food Chemistry*, v. 108, p. 1133-1141.
- Vega, F. E., Infante, E., Castilho, A., Jaramillo, J. (2009). The coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae): a short review, with

recent findings and future research directions. *Terristrial Arthropod Reviews*, 2, 129-147.

Velmourougane, K.; Bhat, R.; Gopinandhan, T. N. (2010). Coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*) - A vector for toxigenic molds and ochratoxin A contamination in coffee beans. *Foodborne Pathogens and Disease*, v.7, n. 10, p. 1279-1284.

Walker, H.E.; Lehman, K. A.; Parede, M.M.; Siderhurts, M.S. (2019) Analysis of volatile profiles of green Hawai'ian coffee beans damaged by the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*). *Journal of the Science oh the Food and Agriculture*, v. 99, p. 1954-1960.

Wongsa, P.; Khampa, N.; Horadee, S.; Chaiwarith, J.; Rattanapanone, N. (2019) Quality and bioactive compounds of blends of Arabica and Robusta spray-dried coffee. *Food Chemistry*, v. 283, p. 579-587.