
**EFEITO DE MICRONUTRIENTES E CULTIVARES SOBRE A
POPULAÇÃO FÚNGICA EM GRÃOS DE CAFÉ**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras **como parte das** exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, **área** de concentração Fitopatologia, para obtenção do título de “Doutor.”

Orientador

Prof. Mário Sobral de Abreu

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me concedido a capacidade de desenvolver este trabalho.

À Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade de realização do Curso.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Consórcio Nacional de Pesquisas Cafeeiras pelo financiamento do projeto.

Ao professor Mário Sobral de Abreu, pela orientação e ensinamentos.

À Doutora Sara Maria Chalfoun, pela inspiração, ensinamentos e valiosa contribuição.

Aos membros da banca examinadora, pelas críticas e sugestões apresentadas.

Ao Mário Lúcio dos Santos da EPAMIG, por todas as concessões, sem as quais este trabalho não se realizaria, meus agradecimentos sinceros.

Ao professor Júlio Sílvio de Souza Bueno Filho, do Departamento de Ciências Exatas da Universidade Federal de Lavras, e ao professor Júlio Raposo de Almeida, da Universidade de Taubaté pelo auxílio na realização das análises estatísticas.

A Terezinha, do Laboratório de Patologia de sementes pelo apoio e incentivo.

Aos funcionários da Cafeicultura, José Avelino, José Maurício e “Zeca” pelo valioso auxílio.

Ao Rodrigo Luz da Cunha, EPAMIG, São Sebastião do Paraíso, pela amostra de “Apoatã”, gentilmente cedida.

A Leisa, do Departamento de Fitopatologia pela atenção dispensada.

Aos colegas Luís Roberto e Renil, pelo apoio, que para mim foram essenciais nos estudos sobre o café.

À Eliene e Eugênia Vargas do Laboratório de Micotoxinas do Ministério da Agricultura e Abastecimento pelo valioso auxílio nas análises de ocratoxina.

Aos colegas da Patologia de Sementes, Wirton, Flávio, Rosângela e Otiniel, pelo agradável convívio.

Ao Barone e Leonardo pelo apoio, na hora em que tudo parecia impossível.

Aos alunos de graduação em Agronomia, Igor, Tullio, Vagner, Francisco e Nilson César, pelo auxílio na condução do experimento de campo.

Ao meu marido Luiz Eugênio; a minha filha Luiza; meus pais, Conceição e Heli; Silvana e Jaqueline pela paciência e ajuda imprescindível.

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

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	I
ABSTRACT.....	iii
CAPÍTULO 1	1
1 Introdução geral.....	1
2 Referencial teórico.....	4
2.1 O café no Brasil.....	4
2.2 Processamento do café.....	5
2.3 Qualidade do café.....	6
2.3.1 Influência de fatores genéticos na qualidade do café.....	9
2.3.2 Efeito de adubações na qualidade do café.....	11
2.3.3 Alterações qualitativas provocadas por fungos associados aos grãos..	14
2.4 Composição química dos grãos.....	17
2.5 Micotoxinas.....	23
2.5.1 Ocratoxina A em café.....	24
2.5.2 Fatores que influenciam a produção de Micotoxinas.....	26
3 Referências Bibliográficas.....	29
CAPÍTULO 2: Efeito de micronutrientes na população fúngica associada a grãos de café (<i>Coffea arabica</i> L), ocorrência de Ocratoxina A e qualidade do produto	39
Resumo.....	39
Abstract	40
1 Introdução.....	41
2 Material e Métodos.....	44

	Página
2.1 Caracterização do experimento.....	44
2.2 Exteriorização e identificação dos fungos associados aos grãos.....	45
2.3 Análises químicas.....	46
2.3.1 Preparo das amostras para análises químicas.....	46
2.3.2 Lixiviação de íons de potássio.....	47
2.3.3 Condutividade elétrica.....	47
2.3.4 Atividade enzimática da polifenoloxidase.....	47
2.3.5 Compostos fenólicos totais.....	47
2.4 Análise de Ocratoxina A.....	47
2.5 Análise estatística.....	48
3 Resultados e Discussão.....	50
3.1 População fúngica associada aos grãos.....	50
3.2 Ocorrência de ocratoxina A.....	55
3.3 Avaliação dos efeitos dos micronutrientes na composição química dos grãos de café cru.....	57
3.3.1 Lixiviação de Potássio.....	57
3.3.2 Condutividade elétrica.....	59
3.3.3 Atividade da Polifenoloxidase.....	61
3.3.4 Compostos fenólicos.....	63
4 Conclusões.....	66
5 Referências Bibliográficas.....	68
CAPÍTULO 3: Fungos associados aos grãos de café (<i>Coffea arabica</i> L.) processados por via seca e úmida em diferentes cultivares.....	73
Resumo.....	73
Abstract.....	74
1 Introdução.....	75

	Página
2 Material e Métodos.....	78
2.1 Caracterização do Experimento.....	78
2.2 Exteriorização dos fungos nos grãos de café.....	79
2.3 Detecção de ocratoxina A.....	80
2.4 Análise estatística.....	80
3 Resultados e Discussão.....	82
3.1 Micoflora associada aos grãos.....	82
3.1.1 Contaminação dos grãos de café por <i>Fusarium</i> spp.....	82
3.1.2 Contaminação dos grãos de café por <i>Penicillium</i> spp.....	85
3.1.3 Contaminação dos grãos de café por <i>Aspergillus</i> spp.....	90
3.1.4 Contaminação de grãos de café por <i>Cladosporium cladosporioides</i>	95
3.2 Comparação entre os grãos desinfestados e não desinfestados.....	96
3.3 Detecção de Ocratoxina A.....	98
4 Conclusões	102
5 Referências Bibliográficas.....	104

CAPÍTULO 4: Influências da população fúngica nas características químicas dos grãos crus de café (<i>Coffea arabica</i> e <i>C. canephora</i>) em diferentes cultivares.....	109
Resumo.....	109
Abstract	110
1 Introdução.....	111
2 Material e Métodos.....	114
2.1 Caracterização do Experimento.....	114
2.2 Micoflora associada aos grãos.....	115
2.3 Análises químicas.....	116
2.3.1 Preparo das amostras para as análises.....	116

	Página
2.3.2 Lixiviação de íons de potássio.....	116
2.3.3 Condutividade elétrica.....	116
2.3.4 Atividade enzimática da polifenoloxidase.....	116
2.3.5 Cafeína.....	117
2.3.6 Açúcares totais, redutores e não redutores.....	117
2.3.7 Acidez titulável total.....	117
2.3.8 Ácido clorogênico.....	117
2.3.9 Análise estatística.....	118
3 Resultados e Discussão.....	119
3.1 Atividade enzimática da polifenoloxidase.....	121
3.2 Ácido clorogênico.....	125
3.3 Lixiviação de potássio e condutividade elétrica.....	129
3.4 Cafeína, açúcares e acidez titulável.....	135
4 Conclusões.....	140
5 Referências Bibliográficas.....	141
Considerações Finais.....	145
Anexos.....	147

RESUMO

PASIN, Liliana Auxiliadora Avelar Pereira Efeito de micronutrientes e cultivares sobre a população fúngica em grãos de café (*Coffea arabica* L) Lavras: UFLA, 2000. 158p. (Tese - Doutorado em Fitopatologia) *

Foram realizados três ensaios objetivando estudar aspectos relacionados à microflora fúngica dos grãos de café na qualidade do produto final e produção de ocratoxina A. No primeiro ensaio objetivou-se verificar o efeito de micronutrientes aplicados sobre os frutos na população fúngica associada aos grãos, produção de OTA e qualidade do produto. No segundo, verificar a ocorrência fúngica em diferentes cultivares, processadas pelas vias seca e úmida e detecção de OTA nas diferentes cultivares. O terceiro ensaio objetivou relacionar cada espécie fúngica presente nas amostras de diferentes cultivares com as características químicas dos grãos. A avaliação da incidência fúngica foi realizada quando os grãos atingiram teor de umidade em torno de 12%, antes e após a desinfecção superficial com NaOCl 1%. A exteriorização dos fungos foi realizada através do método *Blotter Test*. A determinação de OTA foi realizada nos dois primeiros ensaios através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Foram determinados os valores médios de lixiviação de potássio, condutividade elétrica, atividade enzimática da polifenoloxidase, fenólicos totais, açúcares totais redutores e não redutores, cafeína e acidez titulável e ácido clorogênico. O efeito dos micronutrientes foi verificado em grãos crus beneficiados, pulverizados com cobre, zinco, manganês e boro, aplicados isoladamente e em associação, diretamente sobre os grãos, desde a fase de chumbinho até a colheita. Para o segundo ensaio, frutos das cultivares Catuai Amarelo, Mundo Novo, Acaiá, Rubi e Icatú, provenientes da safra 1998/1999, foram colhidos na Fazenda Experimental da EPAMIG, no município de Lavras/MG, constituindo as diferentes amostras analisadas. Parte dos frutos despolpados de cada cultivar foi imediatamente despolpados para posterior secagem no terreiro, a outra parte foi conduzida ao terreiro, onde permaneceu até atingir teor de umidade em torno de 12%. Os resultados obtidos no primeiro

* Comitê Orientador: Prof. Dr. Mário Sobral de Abreu – UFLA (Orientador), Dra. Sara Maria Chalfoun de Souza – EPAMIG, Prof.^a Dra. Vânia Déa de Carvalho – UFLA.

ensaio permitiram verificar que todos os nutrientes aplicados isoladamente reduziram significativamente a ocorrência dos fungos *Aspergillus ochraceus*, *Fusarium semitectum* e *Cladosporium cladosporioides*. Entretanto a ocorrência do fungo *Penicillium variable* não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos realizados. Apesar da ocorrência interna do fungo *A.ochraceus* ter sido em torno de 50% na testemunha, não se detectou a ocorrência de OTA nestas amostras. Verificaram-se valores médios mais elevados de lixiviação de potássio, condutividade elétrica e fenólicos totais e menor atividade enzimática da polifenoloxidase nas amostras de café com maior incidência dos fungos *Aspergillus ochraceus*, *Fusarium semitectum* e *Cladosporium cladosporioides*. Para o segundo e terceiro ensaio, verificou-se a ocorrência dos fungos *P. variable*, *Penicillium rugulosum*, *Penicillium funiculosum*, *F. semitectum*, *Fusarium equiseti*, *A. ochraceus*, *Aspergillus niger* e *C. cladosporioides* nas diferentes cultivares. Através dos resultados obtidos verificou-se que o fungo *F. semitectum* foi identificado apenas na cultivar Mundo Novo e *F. equiseti* foi identificado nas demais, não havendo diferenças significativas entre elas. Foram isolados, dos grão das amostras, três espécies do gênero *Penicillium*, sendo: *P.rugulosum* na cultivar Rubi, *P. funiculosum* na cultivar Icatu e *P.variable* nas demais. A cultivar Acaia apresentou maior incidência do fungo *P. variable*, seguida por Mundo Novo e Catuai. A ocorrência de *A. ochraceus* não diferiu entre as cultivares processadas pela via seca. Nas amostras de café despulpado, houve maior incidência deste fungo na cultivar Icatu, não havendo diferença entre as demais. A ocorrência de *A. niger* não apresentou diferenças entre as cultivares. As cultivares processadas pela via seca não apresentaram diferenças para o fungo *C. cladosporioides*. A cultivar Icatu, quando processada via úmida, apresentou menor ocorrência, diferindo estatisticamente das demais. A contaminação interna para todas as espécies fúngicas detectadas foi significativamente inferior à contaminação externa. A ocorrência de OTA foi verificada apenas em uma cultivar processada pela via úmida, em nível bem abaixo do limite proposto pela União Européia. Pela análise dos resultados obtidos no terceiro ensaio, observou-se que a presença do fungo *A. ochraceus* reduz a atividade da enzima polifenoloxidase e aumenta os valores de lixiviação de potássio, condutividade elétrica e fenólicos totais. A incidência do fungo *C. cladosporioides* influenciou nos valores médios de lixiviação de potássio e condutividade elétrica.

ABSTRACT

PASIN, L.A.A.P. **Effect of micronutrients and cultivars on fungal population in coffee grains.** Lavras: UFLA, 2000. 158p (Thesis - Doctorate in Phytopathology)*

Three trials aiming at studying the aspects related to fungal microflora on coffee kernels on the quality of the final product and ochratoxin A (OTA) production were conducted. The first trial was aimed at verifying the effect of micronutrients applied upon the fruits on the fungal population associated with beans, OTA production and bean quality. The second was aimed at verifying the fungal occurrence on different cultivars processed by the wet and dry vias and OTA detection in the different cultivars aged. The third trial was intended to relate each fungal species present in the samples of different cultivars with the chemical characteristics of kernels. The evaluation of the fungal incidence was performed when kernels reached moisture content around 12% before and after surface disinfection with 1% NaOCl. The fungal exteriorization was accomplished through the *Blotter test* method, this procedure was the same to all the trials. The OTA determination was proceeded in the two first trials through high performance liquid chromatography (HPLC). The average values of potassium leaching, electric conductance, polyphenoloxidase activity, total phenolics, total reducing and non-reducing sugars, caffeine, titratable acidity and chlorogenic acid. The effect of the micronutrients was verified in processed raw kernels sprayed with copper, zinc, manganese and boron, applied singly or in association, directly on kernels, since the phase green berry until harvest. For the second trial, fruits of the cultivars Mundo Novo, Catuaí, Acaia, Rubi and from the 1998/1999 crop were harvested in the EPAMIG experimental farm in the town of Lavras/MG, making up the different samples analyzed. A part of the pulped fruits of each cultivar were directly pulped for further drying on the flat terrain, the other part was carried to the flat terrain where they stayed until they reached the moisture content of around 12%. The results obtained in the first

* Guidance Committee: Prof. Dr. Mário Sobral de Abreu – UFLA (Orientador), Dra. Sara Maria Chalfoun de Souza – EPAMIG, Prof.^a Dra. Vânia Déa de Carvalho – UFLA.

trial enabled to verify that all the micronutrients applied singly reduced significantly the occurrence of the fungi; however the occurrence of the fungus *Penicillium variable* presented no significant differences among the treatments performed. In spite of the internal occurrence of the fungus *Aspergillus ochraceus* having been around 50% in the check, the occurrence of OTA was not detected in these samples. Higher average values of potassium leaching, electric conductivity and total phenolics and lower activity of polyphenoloxidase were detected in the coffee samples with the highest incidence of the fungi *A. ochraceus*, *F.semitectum* e *C.cladosporioides* on different cultivars. The second and third trials, the occurrence of fungi *P. variable*, *Penicillium rugulosum*, *Penicillium funiculosum*, *F. semitectum*, *Fusarium equiseti*, *A. ochraceus*, *Aspergillus niger* e *C. cladosporioides* was verified on the different cultivars. Through the results obtained, it was found that the fungus *F. semitectum* was identified only on the cultivar Mundo Novo and *F. equiseti* was identified on the others, with no significant differences among the cultivars. Three species of the genus *Penicillium*, namely: *P. rugulosum* on the cultivar Rubi, *P. funiculosum* on the cultivar Icatu and *P. variable* on the others were isolated from the grains. The cultivar Acaia presented the highest incidence of the fungus *P. variable* followed by the Mundo Novo and Catuaí. The occurrence of *A. ochraceus* did not differ among the cultivars processed by the dry via. In the samples of pulped coffee, there was a greater incidence of this fungus in the cultivar Icatu, with no differences among the others. The occurrence of *A. niger* presented no significant differences among the cultivars. The cultivars processed by the dry via presented no differences for the fungus *C. cladosporioides*. The cultivar Icatu, when processed moist via presented lower occurrence, of this fungus statistically differing from the others. The internal contamination for all the fungal species was significantly less in relation to the external contamination. The occurrence of OTA was found only in a cultivar processed by the wet via at a level quite below of the limit proposed by the European Community. From the analysis of the results obtained, it was found that the presence of the fungus *A. ochraceus* reduces the activity polyphenoloxidase and increase the values of potassium leaching, electric conductivity and total phenolics. The incidence of the fungi *C. cladosporioides* influenced the average values of potassium leaching and electric conductivity.

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO GERAL

Historicamente, o Brasil tem ocupado a posição de maior produtor e exportador de café no mercado internacional, constituindo uma das principais fontes de receita para o país, de grande importância social e econômica. No entanto, com o aumento da produção, associada à melhoria da qualidade do café por outros países produtores, além da crescente demanda por cafés de bebidas superiores por países importadores, a exportação brasileira tem sofrido quedas significativas, sendo que um dos fatores responsáveis pelo declínio da participação brasileira no mercado internacional foi a falta de padrão de qualidade do produto nacional.

Além de influenciar diretamente o preço do produto, a qualidade é fator imprescindível para a aceitação do café no comércio internacional. O consumo interno também tem apresentado aumentos significativos, sendo que o mercado consumidor tem se mostrado cada vez mais exigente quanto à qualidade do produto. Diante de tal exigência, há uma tendência de redução no mercado para o consumo de café de baixa qualidade, ou seja, o produtor brasileiro deverá se especializar e adotar técnicas modernas para a produção de café de qualidade superior.

A qualidade do café está relacionada às características dos grãos quanto a cor, aspecto, número de defeitos, aroma e sabor da bebida, os quais são dependentes de vários fatores, dentre eles a composição química do grão, que é determinada por fatores genéticos, pelo sistema de cultivo, ambiente e a presença de microorganismos responsáveis por fermentações e podridões que alteram sua qualidade. Entre os microorganismos que compõem a microbiota do café, os fungos filamentosos representam o grupo que pode provocar maiores danos. Além da influência direta na qualidade, certos fungos associados aos

grãos, denominados toxigênicos, podem produzir substâncias tóxicas, metabólitos secundários denominados micotoxinas. A incidência de fungos toxigênicos em grãos de café dificulta sobremaneira a aceitação do produto no mercado, já que representa uma ameaça à saúde dos consumidores.

Vários estudos de melhoramento genético buscam um maior vigor das plantas, associado à máxima produtividade, levando ao desenvolvimento de várias linhagens de cultivares de café com importantes características produtivas e vegetativas, como resistência a pragas e doenças, menor porte, maior relação frutos por ramo, sistema radicular mais eficiente, uniformidade de maturação, entre outras. Todas as características manipuladas geneticamente podem influenciar em maior ou menor grau na qualidade final do produto.

Embora as diferenças entre as diversas cultivares se restrinjam a características vegetativas e de produção, torna-se necessário conhecer a qualidade de diferentes cultivares, através da avaliação da incidência fúngica e da composição química dos grãos, objetivando alcançar uma melhor qualidade.

Além do fator genético, a qualidade do café é dependente da forma pela qual ele é cultivado, colhido e processado no campo. Deficiências nutricionais conduzirão a um café de baixa qualidade, já que predis põem a planta ao ataque de patógenos, acarretando acentuada desfolha da planta, o que proporcionará um mal suprimento na fase de enchimento dos grãos, levando a uma má formação e possivelmente, à queda dos mesmos. Com a desfolha, a planta terá sua produção comprometida no ano seguinte, já que suas reservas serão utilizadas para a recomposição vegetal, o que conduzirá a uma menor frutificação, além da influência direta na micoflora associada aos grãos. Entretanto, a influência de certos micronutrientes na qualidade dos grãos ainda não foi investigada.

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a influência dos fatores genéticos e ambientais na incidência fúngica associada aos grãos, produção de ocratoxina A e qualidade dos grãos.

Foram estabelecidos como objetivos específicos: 1) Avaliar o efeito dos micronutrientes (Zinco, Cobre, Boro e Manganês, aplicados isoladamente e em associação) na incidência fúngica, relacionando-a com as características químicas dos grãos crus; 2) Avaliar a produção de Ocratoxina A na cultivar Mundo novo submetida aos tratamentos com micronutrientes (Zinco, Cobre, Boro e Manganês, aplicados isoladamente e em associação). 3) Avaliar a incidência de fungos nos grãos de seis cultivares de café processados por via seca e úmida; 4) Avaliar a produção de ocratoxina A por fungos toxigênicos nas diferentes cultivares e diferentes vias de processamento; 5) Relacionar cada espécie fúngica associada aos grãos com as características químicas dos grãos crus.

2 REFERENCIAL TEORICO

2.1 O café no Brasil

O café arábica (*Coffea arabica* L.), planta da família Rubiaceae, tem como centro de origem o sul da Etiópia. Tendo chegado ao Brasil por volta de 1727, foi plantado inicialmente em Belém do Pará (Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 1987). A cafeicultura como atividade econômica existe desde o período colonial, no século XVIII, a principio na região do Vale do Paraíba e expandindo-se posteriormente para o Oeste do Estado de São Paulo (Silva, 2000)

O cafeeiro, planta tropical de altitude adaptada a clima úmido de temperaturas amenas, se constitui a cultura mais difundida entre os países de clima tropical. É produzido e exportado por mais de 50 países em desenvolvimento e o maior consumo provém dos Estados Unidos, países europeus e Japão. É o segundo produto de maior comercialização mundial, sendo de vital importância para a economia dos países produtores. A Organização Internacional de Café estima que a cafeicultura fornece empregos diretos para 25 milhões de pessoas no mundo podendo chegar a 100 milhões de pessoas quando se consideram os serviços e atividades relacionadas a indústria (Silva, 2000).

Dos produtos agrícolas nacionais exportados, o café verde e solúvel representaram, de janeiro a setembro de 1999, 5,3% do total arrecadado no país, gerando uma receita de 1,84 bilhões de dólares (EUA,1999, citado por Lopes,2000)

2.2 Processamento do Café

A fase de processamento é considerada a mais crítica para a preservação e aumento da qualidade do café. Após a colheita, os grãos de café podem ser processados por via seca, também denominada natural, ou por via úmida, que consiste na secagem dos frutos sem a casca e a mucilagem ou apenas sem a casca, dando origem aos cafés despulpados e descascados, respectivamente (Souza e Silva, 1999).

O preparo por via seca é a forma mais usual de processamento do café brasileiro, neste método, o café, após a colheita, tanto por derriça no chão, no pano, ou mecanizada, passará imediatamente por processos de separação das impurezas, que podem ser feitos através de peneiramento, manual ou mecânico, ventilação forçada ou ainda por separadores de ar e peneira. Em seguida o café é separado nos diferentes estágios de maturação em separadores hidráulicos. Após a separação de impurezas e lavagem, o café é encaminhado para o processo de preparo por via seca, que consiste na secagem em terreiro ou em secadores mecânicos.

A operação do processamento dos grãos de café por via úmida inclui a colheita dos grãos cereja; lavagem e seleção dos grãos flutuantes; despulpamento, que consiste na retirada da casca dos frutos maduros através de um descascador mecânico e posterior fermentação ou uso de substâncias químicas, enzimáticas ou por atrito e água quente, para a remoção da mucilagem; secagem e beneficiamento (Chalfoun e Carvalho, 1997). O tempo de fermentação dependerá da altitude e variedade do café. O café despulpado tem a vantagem de diminuir a área de terreiro e o tempo necessário para a secagem, além da obtenção de cafés de melhor qualidade, já que, para este procedimento, é necessária a colheita selecionada de frutos no estágio cereja, possibilitando a demucilação (Jones e Jones, 1984). Puerta (1996) também ressalta que a qualidade da bebida é preservada ou aumentada por esse processo, já que esta

via controla o tempo de fermentação, evitando fermentações prolongadas. O autor cita que em processamentos realizados por via seca, a obtenção de cafés com defeito é favorecida, porque o café fica um tempo maior em contato com a polpa ou mucilagem, por ser uma barreira para perda da umidade dos grãos.

A qualidade de café por via seca é influenciada pelas condições climáticas locais, no período de colheita e secagem (Lacerda et al., 1985). Segundo Carvalho (1997) a ausência de insolação e alta umidade do ar, favorecem o desenvolvimento de microorganismos, que produzem metabólitos como ácidos butírico e propiônico, afetando a qualidade do produto final quando difundidos da polpa para a semente.

2.3 Qualidade do café

A valorização da qualidade do café vêm de longa data, o que levou os setores ligados à atividade cafeeira no Brasil a elaborar normas de classificação de café em 1917, já que o café destaca-se entre os poucos produtos agrícolas que tem seus preços baseados em parâmetros qualitativos, cujo valor aumenta significativamente com a melhoria da qualidade, sendo considerado também um fator limitante para a exportação.

Segundo Amorim et al.(1977) e Prete (1992), para a comercialização do café, a qualidade da bebida tem maior peso que os outros atributos, pois é o que afeta diretamente o preço do produto, podendo ocorrer uma diferença de 30%, em média, entre o preço de um café fino (bebida mole) e um de qualidade inferior (bebida rio).

Mais recentemente, Prete (1992) definiu qualidade como sendo a somatória de atributos físicos do grão cru, como: cor, tamanho, densidade, forma e uniformidade; no grão torrado, têm-se como atributos de destaque as características organolépticas da bebida, expressas através do gosto e aroma.

A qualidade do café no Brasil é avaliada em função de duas classificações: uma baseia-se nas características físicas (tipo), através do aspecto e pureza do grão, e outra pelo sabor da bebida (Carvalho et al.,1994). A classificação por tipo é feita segundo a Tabela Oficial Brasileira de Classificação do Instituto Brasileiro do Café, IBC (1985). Já a classificação da bebida é realizada através da análise sensorial, conhecida como “prova da xícara”, que surgiu no Brasil no início do século XX e foi adotada pela Bolsa Oficial de Café e Mercadorias de Santos a partir de 1917.

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

Atualmente a classificação realizada através da análise sensorial, da forma como vem sendo aplicada, é questionada, já que representa um trabalho complexo que exige não apenas um conhecimento perfeito e grande prática, como também a educação do paladar. Valencia (1973) afirma que a prova da xícara é uma opinião subjetiva e dependente da capacidade sensorial do provador, que pode ser alterada e não é apta como padrão de qualidade, quando analisada isoladamente.

Vários estudos indicam que compostos químicos presentes no grão processado estão relacionados com a qualidade da bebida, como a enzima polifenoloxidase.

De acordo com os resultados obtidos por Carvalho et al.(1994), a determinação da atividade da polifenoloxidase, associada ao índice de coloração, permite avaliar a qualidade do café de modo mais objetivo; esse método, possivelmente, tenderá a substituir o método de classificação usado atualmente. Da mesma forma, Chalfoun (1996) relaciona a atividade da polifenoloxidase como sendo um parâmetro seguro para a avaliação qualitativa do café, pois os cafés que apresentam pior bebida pela prova tradicionalmente usada apresentam também o menor valor de atividade de polifenoloxidase.

A veracidade da análise da enzima polifenoloxidase sobre a classificação da bebida de café foi confirmada por Pimenta, Chagas e Costa (1997), cuja análise possibilitou a classificação de cafés “estritamente mole” a ”rio”, enquanto, através da análise sensorial, todas as amostras foram classificadas como “bebida dura”.

Vários fatores estão ligados à qualidade da bebida do café, destacando-se fatores externos, como: temperatura, umidade, tipo de solo, condições de cultivo, estado nutricional da planta, até a presença de microrganismos responsáveis por fermentações e podridões, abrangendo a colheita e o preparo do café. Carvalho e Chalfoun (1985), Feria-Morales(1990) e Chagas(1994) também relacionam a qualidade da bebida a diversos fatores, como, a composição química dos grãos, sendo determinada por fatores genéticos, culturais e ambientais; o processo de preparo e conservação do grão, nos quais a temperatura e a umidade são fatores determinantes, já que podem propiciar infecções microbianas e fermentações indesejáveis; a torração e o preparo da bebida. Os autores afirmam, ainda, que o sabor característico do café é devido à presença de vários constituintes químicos voláteis, destacando-se, entre eles, os ácidos, aldeídos, cetonas, açúcares, proteínas, aminoácidos, ácidos graxos, compostos fenólicos, entre outros, além da ação de enzimas em alguns desses

constituintes, formando como produtos das reações compostos que interferirão no sabor, quando se realiza a análise sensorial.

Prete (1992) ressalta que os piores cafés, em termos de qualidade de bebida, possuem menores teores de proteínas solúveis, fenóis hidrolizáveis, ácido ascórbico, lipídeos e carboidratos e maiores teores de aminoácidos, ácido clorogênico e ácidos graxos.

2.3.1 Influência de fatores genéticos na qualidade do café

As características físicas e a composição química dos cafés variam em função de fatores diversos, entre eles os fatores genéticos. Qualquer programa de melhoramento genético de uma espécie tem como principal objetivo o aumento da produtividade. Entretanto, sendo o café um produto em que seu preço é diretamente dependente da qualidade, é essencial que esses programas visem o desenvolvimento de cultivares de elevado potencial produtivo e, sobretudo, com boa qualidade de bebida (Carvalho, 1997)

Apesar de trabalhos mais antigos demonstrarem não haver diferenças entre cultivares de uma mesma espécie quanto à qualidade, a Organização Internacional do Café, recentemente apresentou resultados mostrando diferenças entre cultivares, destacando diferenças entre aromas e sabores, sugerindo que diferentes cultivares podem atender demandas diferenciadas no mercado de café (Carvalho, 1997).

A cafeicultura brasileira é constituída basicamente por linhagens das cultivares Mundo Novo, Catuaí e, mais recentemente, em área ainda pouco expressiva, Icatu e Rubi. Segundo Alves (1996) e Söndahl e Corp (1995), variedades distintas das espécies Arábica e Robusta podem estar associadas a qualidade de bebida do café.

A relação entre a qualidade da bebida e o material genético usado também foi citada por Söndahl e Corp (1995). Os autores mencionam que a

qualidade não é dependente apenas das condições ecológicas e práticas culturais adotadas na propriedade, mas também do material genético usado. Estes autores relatam que, até o momento, o conceito que se tem é que o café Arábica sempre oferece uma bebida de boa qualidade, enquanto o Robusta produz uma bebida de qualidade inferior, mas que, com os avanços obtidos pelo melhoramento genético, pode se obter linhagens de Arábica de alta qualidade e Robusta com melhor bebida.

Illy e Viani (1995), também ressaltam a melhor qualidade apresentada pelo café Arábica, o qual apresenta maiores concentrações de carboidratos, lipídeos e trigonelina, e o café Robusta, considerado de bebida neutra, que exhibe, normalmente, teores mais elevados de compostos fenólicos e cafeína. Os autores evidenciam também que a qualidade da bebida do café Arábica é uma característica multigênica. No cruzamento interespecífico entre Arábica e Robusta, a qualidade da bebida tem um comportamento poligênico, sendo que, em geral, o café Arábica melhora a qualidade do híbrido (Teixeira, Pimentel Gomes e Cruz, 1971). Essas observações salientam a importância do controle genético das características com vistas à seleção de plantas para melhoria da qualidade da bebida.

A relação entre qualidade e germoplasma pode ser identificada através de características morfológicas. Como exemplo, pode-se citar que genótipos com área foliar reduzida produzem, geralmente, cafés de boa qualidade, possivelmente influenciada pelo microclima da própria planta. A redução da área foliar promoverá maior aeração, aumentando a penetração de luz, fornecendo, com isto, mais energia durante o amadurecimento do grão, minimizando conseqüentemente a incidência de microorganismos, presentes no grão cereja muito maduro (Illy e Viani, 1995). Os autores afirmam, ainda, que, correlações estatísticas indicam haver interações significativas entre a composição química e a qualidade apenas quando várias substâncias ou classes

de substâncias são consideradas únicas, enquanto a correlação entre componentes específicos e qualidade é geralmente baixa.

Lopes et al. (2000) analisaram oito cultivares de café da espécie *Coffea arabica* L. e observaram diferenças entre as cultivares testadas com relação aos testes de condutividade elétrica e lixiviação de potássio, entretanto as mesmas cultivares não apresentaram diferenças quanto à atividade da polifenoloxidase.

2.3.2 Efeito de adubações na qualidade do Café

Trabalhos que relacionam níveis e fontes de nutrientes com a qualidade do café, são ainda incipientes; entretanto, diversos autores relatam que a composição química dos grãos e a qualidade da bebida de café podem ser influenciadas pela adubação de nitrogênio, fósforo, potássio, ferro, magnésio e matéria orgânica (Northmore, 1965; Amorim et al., 1967; Amorim, 1968; Amorim et al., 1973). A fertilização da cultura, de uma maneira geral, afeta o vigor da planta e, conseqüentemente, sua suscetibilidade à contaminação e infecção fúngica antes da colheita (Petraco, 1999).

Northmore (1965) procurou relacionar os teores de cálcio, fósforo, e potássio na semente com a qualidade total do grão, através da avaliação das características qualitativas do grão cru, do café torrado e da bebida, e concluiu que os altos níveis de cálcio e potássio nos grãos foram prejudiciais à qualidade da amostra. Em relação ao fósforo, não houve correlação entre os teores do elemento no grão e a qualidade total da amostra. Blore (1965) também observou um decréscimo na qualidade dos grão mediante a adubação potássica; entretanto, verificou que esta queda na qualidade pode ser controlada pela aplicação de magnésio. A adubação fosfatada aumentou a qualidade da bebida, principalmente com a presença de magnésio, que possibilitou aumento na absorção de fósforo (Amorim et al., 1965).

Com relação à adubação nitrogenada, Amorim (1967) verificou um efeito depreciativo na qualidade do café. Outra observação feita pelo mesmo autor foi que a deficiência em ferro no solo pode resultar em bebidas inferiores.

Através do estudo do efeito de nitrogênio, fósforo e potássio na composição do grão e na qualidade de bebida do café, Amorim et al. (1973) concluíram que maiores teores de nitrogênio e potássio do grão proporcionavam uma bebida de pior qualidade. Cabe ressaltar que o efeito na qualidade foi pequeno no caso do nitrogênio, ou seja, as bebidas passaram de classificações entre apenas mole e mole; entretanto, os aumentos de produtividade devidos às adubações fosfatadas e nitrogenadas compensam o efeito prejudicial à qualidade da bebida.

Os microorganismos representam uma das causas principais da redução da produtividade e qualidade dos produtos agrícolas, no entanto, é bem evidenciado que plantas bem nutridas são mais tolerantes ao ataque de microorganismos patogênicos. Marschner (1986) ressalta que os nutrientes minerais, além dos efeitos sobre o crescimento e produtividade, afetam também os padrões de crescimento, a morfologia e anatomia da planta, através da produção de compostos fenólicos, lignina, entre outros, e essencialmente suas propriedades fisiológicas e bioquímicas, como a produção de substâncias inibitórias ou repelentes, como fitoalexinas e fenóis, influenciando, desta maneira, o nível de resistência da planta à microorganismos patogênicos.

Trabalhos desenvolvidos pela EPAMIG (Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais) têm verificado que o oxiclureto de cobre 50% de cobre metálico, pulverizado diretamente sobre os frutos, pode reduzir o café de varrição que se constituirá em café de pior qualidade (Bartholo et al., 1989). De acordo com os autores, este efeito é atribuído ao papel exercido pelo cobre sobre o metabolismo de carboidratos, importante na fixação de frutos e folhas. Zambolim e Ventura (1993) ressaltam que baixas concentrações de cobre nas

folhas estimulam a atividade da peroxidase, enquanto que a alta concentração reduz a atividade da enzima. A redução na atividade da peroxidase pode resultar no acúmulo de peróxidos. Além da peroxidase, a catalase também pode degradar peróxidos. O aumento na concentração de cobre tem também efeito inibitório na atividade da catalase e a inibição destas enzimas pode acarretar no acúmulo de peróxidos, que são altamente bactericidas.

Becker-Raterink, Moraes e Quijano-Rico (1991) relatam existir uma correlação entre concentrações de cobre e manganês e a qualidade da bebida, em amostras de cafês cultivados em diferentes regiões de Angola. O manganês está relacionado com o aumento na síntese de lignina, atuando como co-fator enzimático nas rotas de biossíntese de lignina e fenóis solúveis, inibe a produção de exoenzimas, como a pectinametilesterase, produzida por certos fungos para degradação da parede celular do hospedeiro, pode atuar diretamente no crescimento de fungos que podem se associar aos grãos por toxidez direta (Graham e Webb, 1991).

Outro elemento essencial ao desenvolvimento do cafeeiro é o zinco, sendo fundamental na síntese de várias enzimas, na síntese do triptofano, aminoácido precursor do AIA (ácido indolacético), responsável pelo aumento de volume celular ou maior desenvolvimento das plantas. Sua deficiência é uma das mais generalizadas e limitantes para o cultivo do cafeeiro, e em caso de deficiência acentuada, pode ocorrer a seca de ramos, de ponteiros e frutos mal granados.

Perez (1970), citado por Pova (1978), relata que a deficiência de zinco não interfere apenas no crescimento de ramos e folhas, mas também no vingamento floral, tamanho e queda precoce dos frutos.

A interferência do zinco na produção foi demonstrada por Silva e Almeida (1970), citados por Pova (1978), que obtiveram um aumento de 38% na produção pela aplicação de zinco em forma de pulverização foliar.

O boro é outro microelemento essencial para as plantas, sendo imprescindível nos diversos estágios de desenvolvimento da planta. A deficiência deste elemento pode acarretar na redução ou deterioração da qualidade da produção. Está relacionado com a síntese de bases nitrogenadas, tais como a uracil, precursora da uridina-glicose bisfosfato (UDPG). A deficiência de boro resulta numa alteração na formação de UDPG e, conseqüentemente, redução da formação, translocação e degradação da sacarose, aumento na formação de amido e interferência na formação da parede celular (Römheld e Marschner, 1991).

Alguns autores relatam haver uma relação entre deficiência de boro e a conformação da parede celular. Zambolim e Ventura (1993) relatam que frutos de maçã apresentam um aumento na firmeza com crescentes níveis de boro no fruto, até 10 ppm.

A relação entre o boro e a conformação de parede celular sugere que este elemento pode induzir uma maior resistência dos frutos ao ataque de microorganismos.

O cafeeiro é extremamente dependente deste micronutriente, sendo o boro limitante para o crescimento em condições de solo pobre. Sua deficiência pode provocar o abortamento da florada.

2.3.3 Alterações qualitativas provocadas por fungos associados aos grãos de café

Trabalhos sobre a influência dos fungos na qualidade da bebida do café são bem antigos. Já na década de 30, Camargo concluiu que o gosto ruim do café estava associado à população microbiana durante o período de secagem, porém, o início real das investigações foi realizado por Krug (1940) quando observou, através de um exame rápido por meio de lente de bolso, que os grãos

de café seccionados apresentavam micélio de *Fusarium*, surgindo daí a hipótese de serem os fungos os responsáveis pela origem dos cafés duros.

Krug (1941), em um ensaio para explicar a variação da qualidade do café em duas zonas diferentes, observou que as piores bebidas são provenientes de grãos que apresentam maior porcentagem de microorganismos. Neste trabalho os resultados obtidos indicaram que uma ou mais espécies de fungos são responsáveis pelo mau gosto do café, especialmente os oriundos de varrição. Através dos isolamentos realizados, observou-se que a porcentagem de fungos encontrados no interior das sementes crescia com o aumento do tempo de permanência dos frutos no chão. Entre os fungos isolados, o fungo detectado com maior frequência foi *Fusarium roseum*, o qual conferia coloração rósea às fendas dos grãos, sendo este um indicativo de bebida ruim.

Trabalhando com café de terreiro, Bitancourt (1957) observou que os fungos mais abundantes foram *Colletotrichum gloesporioides*, *C. coffeanum*, *Fusarium* sp. *Penicillium* spp., e em menor incidência, *Aspergillus niger*.

Em estudos sobre a incidência de fungos em grãos de café provenientes de 31 países produtores, foi observada porcentagem média de fungos variável entre 93,4 a 100%, nas amostras de todos os países, em grãos sem desinfestação superficial. No entanto, após a desinfestação superficial dos grãos com hipoclorito de sódio a 5,0%, verificou-se que a infecção interna era bem menor nas amostras dos países das Américas Central e do Sul que nos países africanos e asiáticos. Fungos do gênero *Aspergillus* predominaram na microflora de 944 amostras, antes e após desinfecção. Os fungos dos gêneros *Alternaria* e *Fusarium* apresentaram incidência reduzida. O gênero *Penicillium* predominou nas amostras provenientes das Américas Central e do Sul (Mislivec, Bruce e Gibson, 1983).

Observando a relação entre a microflora do grão beneficiado e a classificação do café através da bebida, composição físico-química e química,

Carvalho et al. (1989) concluíram que as amostras de café classificadas como bebida mole e dura apresentavam índice de infecção de *Fusarium roseum*, *Aspergillus ochraceus* e *A. flavus* bem inferiores que os cafés classificadas como bebida riada e rio. Entretanto, apresentaram índices igualmente elevados de *Fusarium* sp e *Penicillium* sp., já o gênero *Cladosporium* predominou nos cafés classificadas como bebida mole e dura.

A predominância dos gêneros *Fusarium*, *Penicillium* e *Aspergillus* em amostras de café previamente classificadas nos padrões de “bebida rio e riada” foi constatada por Meirelles (1990). Apenas o fungo *Cladosporium* sp. predominou nos café de “bebida mole” e dura”, estes mesmos gêneros também foram constatados por Alves e Castro (1993) e Chalfoun et al. (1994). Em trabalho semelhante, Alves (1996), estudando os principais fungos presentes nos grãos de café em diferentes localidades do Estado de Minas Gerais, constatou, também, que *Fusarium*, *Aspergillus niger*, *A. ochraceus* e *A. flavus*, apresentaram relação com as piores bebidas, e o fungo *Cladosporium* mostrou-se associado aos cafés de melhor bebida. Entretanto, não se sabe que tipo de influência o *Cladosporium* exerce na qualidade dos grãos.

Trabalhando com frutos e grãos de café beneficiados, Silva et al., (1998) encontraram os fungos *Cercospora coffeicola*, *Cladosporium cladosporioides*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium semitectum* e *Penicillium* spp. Dentro do gênero *Aspergillus*, as espécies *A. niger* e *A. ochraceus*, foram as que apresentaram maior incidência. Em trabalho recente, Freitas (2000) também identificou os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* associados aos grãos de café beneficiados de vários municípios da região sul de Minas Gerais.

As transformações químicas ocorridas nos grãos de café, conduzindo a uma bebida inferior, são de natureza enzimática, envolvendo polifenoloxidase, glicosidase, lipase e proteases, sendo que as enzimas podem ser constituintes do próprio grão ou de microorganismos que contaminam o fruto em caso de alta

umidade, o que facilita a multiplicação desses organismos e o consequente aumento dessas enzimas (Amorim et al., 1977),

Os microorganismos que infectam os grãos de café, segundo Carvalho e Chalfoun (1985), produzem enzimas que agem sobre os componentes químicos da mucilagem, principalmente sobre os açúcares, fermentando-os e produzindo álcool, que é desdobrado em ácido acético, láctico, butírico e outros ácidos carboxílicos. Ao iniciar a produção de ácido butírico, inicia-se o comprometimento da qualidade do café.

2.4 Composição química dos grãos

A qualidade do café encontra-se relacionada aos constituintes químicos dos grãos, que atuam como precursores de substâncias responsáveis pelo “flavor” e cor dos grãos, o sabor e o aroma característicos do café são devidos à presença e teores de diversos compostos químicos voláteis e não voláteis, entre eles ácidos, aldeídos, cetonas, ácidos graxos, aminoácidos, compostos fenólicos, além da ação de enzimas em alguns destes constituintes, originando, como produto das reações, compostos que irão atuar no sabor, aroma e coloração, na análise sensorial (Carvalho,1997).

Os teores destes constituintes são variáveis durante o desenvolvimento e maturação dos grãos, podendo diminuir ou aumentar, até atingir níveis ideais característicos do grão de café maduro. A quantidade destes compostos varia em função do clima, solo, altitude, espécies, entre outros.

Chagas (1994) relata que a composição do grão de café cru depende de fatores genéticos, ambientais, condições de manejo pré e pós colheita e da ação de microorganismos. Estes fatores alteram o metabolismo do fruto, desencadeando a síntese de compostos químicos que são prejudiciais à qualidade.

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

Prete (1992) relata que a condutividade elétrica do exsudato dos grãos demonstra que quanto pior a qualidade da bebida, maiores serão os valores determinados. O autor determinou os valores de condutividade elétrica em diferentes genótipos de café, e concluiu que as diferenças encontradas poderiam ser atribuídas a composições químicas distintas e diferentes velocidades de deterioração.

O potássio é o principal íon lixiviado, presente na membrana do grão de café, que influencia diretamente na medida da condutividade elétrica. Assim, quanto maior a injúria sofrida pelo grão, maior quantidade de íons de potássio é translocada para o meio líquido. Amorim (1978) observou maior lixiviação em grãos de café de baixa qualidade, e concluiu que estes sofreram maiores degradações, conseqüentemente, maiores alterações na membrana celular.

A cafeína é um dos componentes químicos do café mais estudados, devido aos seus efeitos fisiológicos, principalmente como estimulante. Ocorre livre no citoplasma, complexada com clorogenato de potássio, o qual é pouco solúvel e encontra nesta forma alguma mobilidade entre os tecidos (Baumann et al., 1993 citado por Illy e Viani, 1995).

Charrier e Berthaud (1975) determinaram os teores de cafeína em diversas espécies do gênero *Coffea* e verificaram uma alta variabilidade e diferenças acentuadas entre as espécies. Esses resultados evidenciam uma ação preponderante do genótipo sobre a produção desse alcalóide.

Os teores de cafeína nos grãos crus foram determinados por Lopes (2000) em 8 cultivares distintas. O autor verificou diferenças estatísticas significativas entre as cultivares, sendo que as cultivares Catuaí Vermelho, Acaiaí Cerrado, Rubi e Icatu Amarelo apresentaram maiores teores de cafeína, não havendo, entretanto, diferenças entre elas. Os teores médios de cafeína obtidos confirmam os encontrados para a espécie *Coffea arabica*, que variam de 0.6 a 1.5%.

Os grãos crus de café contém diversos polissacarídeos, como: sacarose arabinogalactana, galactomanana e celulose. Os teores de polissacarídeos totais nos grãos crus variam de acordo com a espécie, sendo 44 a 55 % para o café Arábica e 37 a 47 % para o café Robusta (Abraham, 1992)

Dentre os açúcares do café, predominam os não redutores, particularmente a sacarose, sendo que os redutores apresentam-se em pequenas quantidades. Os açúcares estão associados com a qualidade, principalmente os redutores, que após a torrefação, reagem com aminoácidos, originando compostos voláteis que influenciam diretamente o aroma do produto final (Costa e Chagas, 1997).

Grãos provenientes de frutos cerejas das cultivares Mundo Novo e Catuaí, avaliados pela OIC (1992), apresentaram maior teor de carboidratos totais quando comparados aos grãos imaturos. O teor de sacarose foi maior nos grãos de frutos cerejas despulpados para cultivar Catuaí e nos cerejas processados por via seca para a cultivar Mundo Novo. Este trabalho evidencia que pode haver variação nos teores de açúcares em função das fases de maturação do grão, via de processamento e cultivares de uma mesma espécie.

Lopes (2000) também observou diferenças no teor de açúcares totais, redutores e não redutores, em diferentes cultivares de uma mesma espécie.

O teor de acidez titulável em grãos de café pode variar de acordo com os níveis de fermentação que ocorrem nos grãos e também com os diferentes estádios de maturação dos frutos, podendo servir como suporte para auxiliar a avaliação da qualidade do café.

Os principais ácidos do café são o málico e o cítrico, responsáveis por uma acidez desejável, que proporciona o sabor ácido característico do produto. Nos frutos de café, podem ocorrer diferentes tipos de fermentações, alterando a acidez, o sabor e o aroma (Costa e Chagas, 1997).

Diferenças na acidez entre as cultivares Catuai Amarelo e Mundo Novo, foram detectadas pela OIC (1992). A acidez titulável total em 8 cultivares de café Arábica foi determinada também por Lopes (2000), que também detectou diferenças estatísticas significativas.

O grão de café possui vários tipos de compostos fenólicos, sendo os ácidos clorogênicos os de maior importância, devido à grande quantidade encontrada no grão (Amorim, 1972). Estes ácidos, de acordo com Dentam (1985), estão presentes na superfície do grão, associados à graxa cuticular e também no citoplasma, ao lado da parede celular do endosperma no parênquima.

Os compostos fenólicos, principalmente os ácidos clorogênicos e caféico, exercem ação antioxidante dos aldeídos e, geralmente, são produtos secundários em plantas. Entretanto, Clifford (1985) afirma que a concentração destes compostos nos grãos de café é bem maior que na maioria dos vegetais, esta elevada concentração faz com que estes compostos exerçam outras funções, além de controlar os níveis de ácido indol acético na planta.

A presença destes compostos no café, em quantidades maiores que aquelas verificada para determinada espécie, está associada à desvalorização da qualidade (Amorim, 1972). Os compostos fenólicos são os principais substratos

para as enzimas polifenoloxidasas, e encontram-se compartimentalizadas em células intactas; no entanto, qualquer desorganização interna da célula, promovida por injúrias, faz com que enzima e substrato interajam, produzindo quinonas reativas, que reagem com proteínas e outras enzimas, promovendo a sua inativação (Araújo, 1990). Costa e Chagas (1997) afirmam que qualquer condição adversa aos grãos, ou seja, colheita inadequada, problemas no processamento e armazenamento, faz com que as polifenoloxidasas atuem sobre os polifenóis reduzindo sua ação antioxidante sobre os aldeídos, promovendo sua oxidação, resultando no detrimento do sabor e aroma do café após torração. Isto explica porque os teores de ácido clorogênico em cafés classificados como bebida “mole” são menores que nos cafés classificados como bebida “rio”, “riada” e “dura”.

Em cafés brasileiros, a maior concentração de compostos fenólicos, como o ácido clorogênico, pode ser devida ao ataque intenso do fungo *Fusarium* sp., que induz a planta a alterar seu metabolismo e produzir compostos de defesa (Amorim et al., 1973).

O teor do ácido clorogênico varia entre as diferentes espécies de cafeeiro e local de cultivo; como mostra o trabalho de Smith (1963), os valores são de aproximadamente 10% em *Coffea canephora* e 7% em *Coffea arabica*.

A presença de enzimas nos grãos de café pode servir como parâmetro para determinação de qualidade. Dentre as enzimas presentes nos grãos de café, a polifenoloxidase tem se destacado na determinação de qualidade, permitindo avaliá-la de modo mais objetivo. A polifenoloxidase (PFO) é também denominada tirosinase, fenolase, catecol oxidase, mono fenol oxidase, cresolase.

Quimicamente, a PFO é uma enzima cúprica que oxida os o-difenóis a quinonas. É uma enzima intracelular localizada principalmente na membrana dos cloroplastos, participando dos processos de respiração celular, biossíntese de flavonóides e quinonas e na defesa do vegetal, em resposta ao ataque de pragas

e patógenos. Além do café esta enzima é importante na determinação da qualidade de frutos e vegetais estocados e processados (Whitaker, 1995).

A ativação da polifenoloxidase ocorre após injúrias mecânicas ou após o estabelecimento da interação patógeno-planta, resultando na formação de quinonas e, conseqüentemente, de polímeros insolúveis que proporcionam uma barreira que impede a evolução da colonização do microorganismo nos tecidos da planta hospedeira.

As primeiras evidências da correlação da atividade enzimática da polifenoloxidase com a qualidade do café foram relatadas por Amorim e Silva (1968) após observarem uma maior atividade da enzima em cafés de melhor qualidade, indicando a menor ocorrência de degradações das paredes celulares nestes cafés.

A determinação da atividade da polifenoloxidase associada ao índice de coloração, permitem avaliar de modo mais objetivo a qualidade do café. Este método possivelmente, tenderá a substituir o método de classificação usado atualmente (Carvalho et al., 1994). Da mesma forma, Chalfoun (1996) relaciona a atividade da polifenoloxidase, como sendo um parâmetro seguro para a avaliação qualitativa do café, sendo que a pior bebida pela prova tradicionalmente usada apresenta também o menor valor de atividade de polifenoloxidase

A atividade enzimática da polifenoloxidase foi verificada por Valência Aristizabal (1972) entre as espécies *Coffea arabica* L e *Coffea canephora* e entre as variedades Típica, Bourbon, Caturra e Moka. Em relação às espécies observou-se acentuada diferença na atividade enzimática, que foi menor em *Coffea canephora*, entretanto, as diferenças encontrada para as variedades da mesma foram pequenas.

Comparando também café Arábica e Robusta, e as cultivares Mundo Novo, Bourbon Amarelo e Catuai, Oliveira et al. (1976) detectaram diferenças interespecíficas; no entanto, não observaram diferenças entre as cultivares.

Determinando a atividade da polifenoloxidase em grãos crus de diferentes cultivares de *Coffea arabica* L., Lopes (2000) não encontrou diferenças significativas entre elas.

2.5 Micotoxinas

O fato de fungos produzirem “flavors” desagradáveis ou outras substâncias e alterações indesejáveis em alimentos é bem relatado. Além disto, alguns fungos têm a capacidade de sintetizar substâncias químicas, que podem ser tóxicas, quando alimentos que as contêm são ingeridos pelo homem ou animais. Estas substâncias, produtos metabólitos de fungos, são denominadas micotoxinas. Apresentam quatro tipos básicos de toxicidade, sendo: agudo, crônico, mutagênico e teratogênico. Como efeito agudo tem-se a deterioração das funções hepáticas e renais. O câncer, principalmente no fígado, se destaca como o principal efeito crônico. Algumas micotoxinas podem afetar a replicação do DNA, gerando efeitos mutagênicos e teratogênicos (ICMSF, 1996 b).

Estes metabólitos são caracterizados pela diversidade estrutural química e de atividades biológicas. Espécies toxigênicas podem ser encontradas em todos os principais grupos de fungos, sendo que os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* são os maiores produtores (Scussel, 1998).

Cerca de 300 micotoxinas já foram isoladas; entretanto, as toxinas identificadas, que apresentam propriedades tóxicas acentuadas, sendo amplamente distribuídas em alimentos causando danos aos consumidores são: ergotoxina, aflatoxina, esterigmatocistina, ocratoxina, zearalenona, tricotecenos, fumonisinas, patulina, toxinas produzidas no arroz, rubratoxina, esporodesminas, ácido ciclopiazônico e micotoxinas tremorgênicas (Scussel, 1998; Moss, 1998).

No café, a micotoxina de maior ocorrência é a ocratoxina A (OTA), seguida pela aflatoxina e esterigmatocistina (Naidu, 1996). Além do café essa toxina, pode ser encontrada em diversos alimentos, destacando-se o milho,

cevada, feijão, soja, trigo, centeio e arroz, constituindo-se um sério problema de saúde pública mundial, desde que foi associada com a nefropatologia dos Balcans, uma enfermidade renal do homem, podendo também atingir o fígado e intestino delgado (Kroogh et al.,1997). Muitos trabalhos têm sido desenvolvidos para registrar a ocorrência de OTA em alimentos para o homem e rações animais.

Regulamentações para a presença de OTA em alimentos foram propostas e adotadas por 11 países, sendo os limites de tolerância variáveis de 1 a 50 μ g/Kg. Para o café, a União Européia propôs o limite máximo de tolerância de 5 μ g/Kg (Petracco, 1999).

2.5.1 Ocratoxina A em café

As ocratoxinas foram descobertas na África do Sul, em 1965, por um grupo de cientistas que isolava o fungo *Aspergillus ochraceus*, responsável por efeitos tóxicos em animais em laboratório, havendo subsequentemente identificado o metabólito.

Quanto a sua natureza química, as ocratoxinas (A, B e C) são um grupo de compostos que possuem uma β - fenilalanina ligada a uma isocumarina por ligação amida.

Dentre as ocratoxinas, a ocratoxina A é considerada a mais tóxica, sendo constituída por uma molécula de cloro na fórmula (radical R₁), responsável por seu caráter tóxico, distinguindo-se da ocratoxina B por apresentar fluorescência verde. A ocratoxina C é um etil eter da ocratoxina A e também apresenta fluorescência verde, porém muito menos tóxica (Scussel, 1998).

Ocratoxinas são produzidas por fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, dentre eles: *A. ochraceus*, *A. sulphureus*, *A. melleus*, *A. sclerotiorum*, *A. ostianus*, *A. alliarius*, *A. petrekki* e *P. verrucosum* (Scussel, 1998; Frisvad e Samson, 1991; Moss, 1998).

A primeira referência citada da OTA em café foi de Levi et al (1974), que detectaram níveis de até 360 ppb em sacas de cafés com alta incidência fúngica; entretanto, apenas traços da micotoxinas foram detectados em lotes comerciais. Posteriormente, Palo et al.(1977), citado por Petracco (1999), avaliaram cerca de 500 amostras de café verde, sem verificar qualquer ocorrência da OTA; no entanto, as análises foram realizadas através de TLC (cromatografia em camada delgada), cujos limites de detecção são muito altos, sendo expressos em mg/Kg.

Há evidências de que a incidência de fungos potencialmente toxigênicos, associados a frutos e grãos de café, está relacionada com o manejo de cultura e frutos durante a fase de pré e pós-colheita (Chalfoun et al., 1994), além dos fatores ambientais e genéticos (Feria Morales, 1990; Chagas, 1994). Comparando a contaminação com OTA em café Arábica e Robusta, Cantafora et al. (1983), relataram haver diferenças entre as duas espécies, sendo o café Robusta mais suscetível. No entanto, Nakajima et al.(1997) sugerem que a incidência da contaminação por esta toxina é independente das espécies de café, porém há uma correlação com o local de plantio, evidenciando a influência ambiental ou condições diferenciadas de manejo nas fases de pré e pós colheita, nas regiões em que predominam espécies distintas.

Em revisão realizada por Pohland, Nesheim e Friedman (1992), foi constatado que amostras de café beneficiado, provenientes de diversos países, apresentaram níveis máximos de contaminação por OTA variando de 90 a 360 ng/g. Neste trabalho, os autores constataram que, embora os fungos produtores de OTA sejam frequentemente encontrados em alimentos, a contaminação depende da região em que foram produzidos os produtos agrícolas. A produção de micotoxina é normalmente alta quando o substrato favorece o crescimento do fúngico e o meio se encontra livre de outras espécies que podem atuar

competitivamente com os fungos potencialmente toxigênicos, sendo que esta condição normalmente não ocorre (ICMSF, 1996a).

A ocorrência de ocratoxina A em cafés beneficiados têm sido relatada por vários autores, em concentrações que variam de 0,2 a 360 µg/Kg (Levi, Trenk e Mohr, 1974; Tsubouchi e Udagawa, 1984; Micco, Brera e Desiderio, 1989; Sturd-Rohr et al., 1995; Pittet et al., 1996; Nakajima et al., 1997; Trucksess et al. 1999; Mantle e Chow, 2000).

A OTA em amostras de café torrado, e também na sua infusão, foi determinada por Tsubouchi (1984, 1987 e 1988), demonstrando que esta toxina não se degrada durante o processo de torrefação. Vários trabalhos têm sido realizados no sentido de aprimorar a metodologia de análise para detecção em café verde e torrado (Pittet, et al., 1996, Truckess et al., 1997, Nakajima et al., 1997).

2.5.2 Fatores que influenciam a produção de micotoxinas

O crescimento de fungos toxigênicos associados aos grãos e, conseqüentemente, a deterioração e a produção de micotoxinas, resulta de uma interação complexa de vários fatores, que incluem a umidade, temperatura, injúrias nas sementes, composição do substrato, microflora fúngica, predomínio de linhagens toxigênicas, interação entre a população de microorganismos, entre outros (Scussel, 1998).

Normalmente a produção de micotoxinas pode ocorrer se a umidade do grão estocado aumentar de 9-16%, e a produção máxima ocorre entre 20 a 25% de umidade. Entretanto, a exigência de água para o crescimento e a produção de toxinas são diretamente influenciadas pelas espécies de fungos, temperatura, pH e substrato (Naidu, 1996; Scussel, 1998)

Nos grãos de café, a umidade no final da secagem deverá estar entre 11 a 12%; acima destes valores ocorre o branqueamento e aumenta o risco de deterioração.

A umidade relativa também é outro fator determinante para o desenvolvimento de fungos e produção de toxinas. É a umidade de equilíbrio entre o ambiente e o produto. Dependendo da umidade presente no alimento e da umidade do ambiente, haverá ganho ou perda da umidade do produto, favorecendo ou impedindo a proliferação de fungos.

A umidade relativa mínima para o crescimento de fungos é de 70%, e a umidade relativa ótima está entre 80 a 85%; contudo, eles também podem se desenvolver em UR de até 90 a 100% (Scussel, 1998).

A temperatura é outro fator que afeta a produção de micotoxinas, sendo amplamente variável entre espécies. Para várias espécies de fungos, 30^o C é uma temperatura satisfatória para o desenvolvimento efetivo; entretanto, essas faixas são afetadas por outros fatores, como umidade, concentração de oxigênio e disponibilidade de nutrientes (Naidu, 1996).

Os fungos micotoxigênicos podem crescer em vários tipos de substratos, que apresentam, em sua constituição química, compostos que podem estimular ou inibir a produção de micotoxinas. Micco et al. (1992) citam que a cafeína pode atuar como agente protetor contra a produção de aflatoxina B1 em grãos de café, embora as mudas de café cresçam em condições climáticas favoráveis ao crescimento do *Aspergillus*. A ação inibidora da cafeína sobre os fungos toxigênicos foi constatada também por Buchanan, Harry e Gealt (1983) e Chalfoun, Pereira e Angélico, (2000).

Buchanan, Harry e Gealt (1981) estudando os efeitos da cafeína sobre o crescimento dos fungos *Aspergillus ochraceus* e espécies toxigênicas de *Aspergillus* e *Penicillium*, constataram que a cafeína apresentou efeitos reduzidos sobre o crescimento inicial destes fungos; no entanto, quando os

fungos entraram na fase estacionária de crescimento, houve um decréscimo da massa micelial, proporcional à dose de cafeína testada.

Diversas pesquisas sobre a produção de aflatoxina e ocratoxina A sugerem que a cafeína pode inibir tanto o crescimento de fungos toxigênicos como a produção de toxina, sendo que os dois processos podem não estar diretamente relacionados (Buchanan, Harry e Gealt 1983). Os mesmos autores relacionam que a cafeína exerceu inibição drástica no crescimento e síntese de toxina dos fungos *A. parasiticus*, *A. ochraceus* e *A. versicolor*. O crescimento de *P. citrinum* foi inibido, pela cafeína, mas, a síntese da micotoxina foi apenas retardada. Inversamente, o fungo *P. urticae* foi relativamente resistente a cafeína com relação a inibição do crescimento, mas a produção de patulina foi acentuadamente suprimida pela cafeína.

A presença de outros microorganismos também pode alterar o crescimento e a produção de micotoxinas. Mislivec, Bruce e Gibson (1983) relatam que o fungo *A. ochraceus* ou *A. parasiticus* crescem junto com *A. flavus* sobre o mesmo substrato, não afetando a produção de aflatoxina. Já as espécies de *Penicillium* inibiram a produção de aflatoxina pelo *A. flavus*. Esta inibição foi atribuída a presença de alguns metabólitos estáveis produzidos pelos fungos do gênero *Penicillium*.

Vale ressaltar também que além dos fatores mencionados anteriormente, diferentes genótipos de diversas espécies de plantas, podem se comportar de maneira distinta com relação a microorganismos associados aos grãos. Scussel (1998) salienta que algumas variedades de grãos apresentam o pericarpo mais resistente à invasão e proliferação por fungos, o que dificulta a produção de toxinas. Além dos caracteres morfológicos dos grãos, características como arquitetura da planta e uniformidade de maturação também podem influenciar a associação de fungos toxigênicos e consequente produção de micotoxinas (Chalfoun et al., 1994).

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ABAHAM, K. O. **Guide on food products**. Bombay: Spelt Trade Publications, 1992. v.2. Coffee & Coffee products, p.1-14.
- ALVES, E. População fúngica associada ao café (*Coffea arabica* L.) beneficiado e às fases pré e pós colheita-relação com a bebida e local de cultivo. Lavras:UFLA, 1996. 48p. (Dissertação Mestrado em Fitossanidade)
- ALVES, E.; CASTRO, H. A. de Fungos associados ao café (*Coffea arabica* L.) e sua relação com a bebida. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 26,1993, Aracajú. **Resumos...**Brasília: SBF, 1993. P. 329.
- AMORIM, H. V. **Aspectos bioquímicos e histoquímicos do grão de café verde relacionados com a deterioração da qualidade**. Piracicaba: ESALQ, 1978. 85 p. (Tese - Livre Docência em Bioquímica).
- AMORIM, H. V. **Relação entre alguns compostos do grão de café verde com a qualidade da bebida**. Piracicaba: ESALQ,1972. 136p. (Tese - Doutorado em Bioquímica).
- AMORIM, H. V.; AMORIM, V. L. Coffee enzymes and coffee quality. In: ORY, R. L.; ANGELO, A. J. St. (eds) **Enzymes in food and beverage processing**. Washington: American Chemical Society, 1977. n.47, p.27-55.
- AMORIM, H. V.; CRUZ, A. R.; DIAS, R. M.;GUTIERREZ, L.E.; TEIXEIRA, A. A.;MELLO, M.; OLIVEIRA, G. O. Transformações químicas e estruturais durante a deterioração da qualidade do café. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEIRAS, 5.,1977, Guarapari. **Resumos...**Rio de Janeiro: IBC-GERCA, 1977. p..15-18.
- AMORIM, H.V.; MELLO, M. Significance of enzymes in non alcoholic coffee beverage. In: FOX,P.F. (ed) **Food Enzimology**, Amsterdam:Elsevier, 1991. v.2, p.189-209.
- AMORIM, H. V.; SCOTON, L. C.; CASTILHO, A. de; PIMENTEL GOMES, F.; MALAVOLTA, E. Estudos sobre a alimentação mineral do cafeeiro. XXI. Efeito da adubação NPK e orgânica na composição mineral do grão e na qualidade da bebida (2ª nota). **Anais da Escola Superior de Agricultura de "Luiz de Queiroz"**, Piracicaba, v.24, p.215-228, p.140-151,out.1967.

- AMORIM, H. V.; SCOTON, L. C.; CASTILHO, A. de; PIMENTEL GOMES, F.; MALAVOLTA, E. Estudos sobre a alimentação mineral do cafeeiro. XVII. Efeito da adubação NPK na composição química do solo, do fruto, e na qualidade da bebida (nota preliminar) *Anais da Escola Superior de Agricultura de "Luiz de Queiroz"*, Piracicaba, v.22, p.140-151, nov.1965.
- AMORIM, H. V.; SILVA, D. M. **Relação da atividade da polifenoloxidase do grão de Coffea arabica L. com a qualidade da bebida.** Piracicaba : ESALQ/USP, 1968. 16p. (Boletim Técnica,31).
- AMORIM, H. V.; SMUCKER, R.; PSITER, R. Some physical aspects of Brazilian green coffee beans and the quality of the beverage. *Turrialba, San Jose*, v.26,n.1, p.24-27, jan./mar. 1976.
- AMORIM, H. V.; TEIXEIRA, A. A.; MORALES, R. S.; REIS, A. J.; PIMENTEL GOMES, F.; MALAVOLTA, E. Estudos sobre alimentação mineral do cafeeiro XXVII. Efeito da adubação N, P, e K no teor de macro e micro nutrientes do fruto na qualidade da bebida do café. *Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"* Piracicaba, v.30, p.323-333, dez. 1973.
- ARAÚJO, J. M. de. Escurecimento enzimático em alimentos: aspectos químicos e controle. Viçosa : UFV, 1990. 14p. (Revisão,231).
- BARTHOLO, G. F.; MAGALHÃES FILHO, A. A. R. de; GUIMARÃES, P.T.G. CHALFOUN, S. M. Cuidados na colheita, no preparo e no armazenamento do café. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, v.14, n.162,p.33-44,1989.
- BECKER-RATERINK, S.; MORAES, W. B. C.; QUIJANO-RICO, M. **La Roya del cafeto conocimiento y control.** Deutsche Gesellschaft fur Technische Zusammenarbeit, Eschoborn, 1991. 281p.
- BITANCOURT, A. A. O tratamento das cerejas do café para melhorar a bebida. *O Biológico*, São Paulo, v.23, vn1 p 1-11, jan. 1957.
- BLORE, T. W. D. Some agronomic practices affecting the quality of Kenya Coffee. *Turrialba, San Jose*, v.15, n.2, p.111-118, abr/jun 1965.
- BUCHANAN, R. L.; HARRY, M. A.; GEALT, M. A. Caffeine inhibition of steigmatocystin, citrinin, and patulin production. *Journal Food Science*, Chicago, v.48, p.1226-1228, 1983.

- CANTAFORA, A.; GROSSI, M.; MIRAGRIA, M.; BENELLI, L. Determination of ochratoxin A in coffee beans using reversed phase high performance liquid chromatography. *La Rivista della Società Italiana diScienza dell'Alimentazione*, 12, p.103-108.1983.
- CARVALHO, V. D. **Cafeicultura empresarial: [produtividade e qualidade -- qualidade] do café.** Lavras : UFLA/FAEPE, 1997. 73p.
- CARVALHO, V. D de; CHAGAS, S. J. de R.; CHALFOUN, S. M.; BOTREL, N; JUSTE JÚNIOR, E. S. G. J. Relação entre a composição físico-química e química do grão beneficiado e a qualidade da bebida do café. I. Atividade de polifenoloxidase peroroxidase, índice de coloração e acidez. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília,v.29,n.3, p.449-454, mar. 1994.
- CARVALHO, V. D.; CHAGAS, S. J. R.; SOUZA, S. M. C. Fatores que afetam a qualidade do café, *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, v.18, n.187, p.5-20,1997.
- CARVALHO, V .D. de ; CHALFOUN, S. M. Aspectos qualitativos do café. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte,v.11, n.126,p.79-92,1985.
- CARVALHO, V. D. de; CHALFOUN, S. M.;COSTA COUTO, A.; CHAGAS, S. J. de R.; VILELA, E. R. Efeito do tipo de colheita e local de cultivo na composição físico-química e química do grão beneficiado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEIRAS, 15, 1989, Maringá. *Resumos ...* Rio de Janeiro: MIC/IBC,1989.p.23-24.
- CHAGAS, S. J. de R. **Caracterização química e qualitativa de cafés de alguns municípios de três regiões produtoras de Minas Gerais.** Lavras:UFLA, 1994. 83p. (Dissertação – Mestrado em Ciências dos Alimentos).
- CHALFOUN, S. M. **O café (*Coffea arabica* L.) na região Sul de Minas Gerais-Relação da qualidade com fatores ambientais, estruturais e tecnológicos.** Lavras: UFLA, 1996.154p. (Tese - Doutorado em Fitotecnia).
- CHALFOUN, S. M.; CARVALHO, V. L. D de. Efeito de microorganismos na qualidade da bebida do café. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, v.18, n.187, p.21-26, 1997.

- CHALFOUN, S.M. ; CARVALHO, V. D. de; CHAGAS, S. J. R. **Fungos toxigênicos e micotoxinas em café: determinação da ocorrência e severidade em diferentes fases de processamento e produtos comerciais**, Lavras: EPAMIG, 1989. 13p.
- CHALFOUN, S. M.; CARVALHO, V. L. de; CHAGAS, S. J. de R. COSTA, L. Controle de microflora associada a frutas e grãos de café (*Coffea arabica* L.) nas fases pré e pós colheita. **Informe Fegatex**, São Paulo, v.1, p.4-10. 1994.
- CHALFOUN, S. M.; PEREIRA, M. C.; ANGÉLICO, C. L. Efeito da cafeína (1,3,7-trimethylxantina) sobre o crescimento micelial, de fungos associados ao café. **Rer.Bras.de Armaz.**, Especial , Viçosa, v.1, p.50-53, 2000.
- CHARRIER, A.; BERTHAUD, J. Variation de la teneur en caféine dans le grene *Coffea*. **Café Cacao Thé**, Paris, v.11, n.4.,p.251-264, oct./dec.1975.
- CLIFFORD, M. N. Chemical and physical aspects of green coffee and coffee products. In: CLIFFORD, M. N.; WILLSON, K. C. (ed). **Coffee: botany, biochemistry and production of beans and beverage**. London : Croom Helm, 1985. p.305-374.
- COSTA, L.; CHAGAS, S. J. R; Gourmets - Uma alternativa para o mercado de café, **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.18.n.187,p.63-67, 1997.
- DENTAN, E. Examen microscopique de gran de café rioté. In: **INTERNATIONAL COLLOQUIUM EN COFFEE**, 12., 1987, Montreux. **Proceedings ...** Paris: ASIC, 1987. p.186-188.
- FERIA-MORALES, A.M. Changes in cup quality when using innovarive field practices.London: International Coffee Organization, 1990. p.2-8. (Sensory-Report).
- FREITAS, R.F. **Fungos associados a grãos de café (Coffea arabica L.) beneficiado de diversos municípios da Região Sul de Minas Gerais..** Lavras:UFLA, 2000. 71p. (Dissertação – Mestrado em Ciências de Alimentos)

- FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. Mycotoxins produced by species of *Penicillium* and *Aspergillus* occurring in cereals. In: Chelkowski **Cereals Grain: mycotoxins, fungi and quality in drying and storage**. Ed. J. Amsterdam: Elsevier, 1991.p.216-228, 1991.
- GARNER,R.C. Human biomonitoring for aflatoxin exposure at molecular level. In: INTERNATIONAL IUPAC SYMPOSIUM ON MYCOTOXINS AND PHYCOTOXINS, 8.1992, Mexico City, 1992. **Proceedings: Mexico City: IUPAC, 1992. p.35.**
- GARRUTI, R. dos S.; GONAGIN, A. Escala de valores para a avaliação da qualidade da bebida do café. **Bragantia**, Campinas,v. 20 , n.18, p.557-62,maio, 1961.
- GOODENOUGH, P.; ATKIN, R. K. **Quality in stored and processed vegetables and fruit**. London: Academic Press, 1981. 51p.
- GRAHAM, R. D.;WEBB, M. J. Micronutrients and disease resistance and tolerance in plants. In: MORTVEDT, J.J., GIORDANO,P.M.; LINDSA,W.L. (eds), **Micronutrients and agriculture**. 2.ed. Madison: SSSA 1991. p.329-370.
- ICMSF (International Commission on Microbiological specifications for Foods). Toxigenic fungi: *Penicillium*. In: **Microorganisms in Foods, 5. Characteristics of Food Pathogens**. London : Blakie Academic and Professional, 1996a p.347-381.
- ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods). 1996. Toxigenic fungi: *Aspergillus*. In: **Microorganisms in Foods,5. Characteristics of Food Pathogens**. London: Blakie Academic and Professional.1996b. p.397-413.
- ILLY, A.; VIANI, R. **Espresso coffee: The chemistry of quality**. San Diego, 1995. 235p.
- INSTITUTO BRASILEIRO DO CAFÉ. **Cultura do Café no Brasil: manual de recomendações**. 2. ed. Rio de Janeiro, 1985. p.36.
- INSTITUTO CAMPINEIRO DE ENSINO AGRÍCOLA. **Cultura do café**. Campinas,1987.84p.

- JONES, K. L.; JONES, S. E. Fermentations involved in the production of cocoa, coffee tea. **Progress Industrial Microbiology**, Amsterdam, v.19, p.411-56,1984.
- KROGH, P.; HALD, B.; PLESTINA, R.; CEOVIC, S. Balkan (endemic) nephropathy and foodborne ochratoxin A: preliminary results of a survey of foodstuffs. **Acta pathologica et Microbiologica Scandinavica**, Section B: Microrbiology, Copenhagen, v.85, p. 238-240, 1997.
- KRUG, H. P. Cafés duros. **Revista do Instituto do Café**, São Paulo, v.25,p.636 - 638,1941.
- LACERDA, L. A. O.; MIARELLI, M.; DAVOLI, J. Z.; CARVALHO, R. de; LOPES, I. C.; GUERRA NETO, E. G.; KANASHIRO, J. K.; LUZINI, N. R.; SANTINATO, R.; CORTEZ, J. G.; PAES CAMARGO, A.; TEXEIRA, A. A. Influência dos sistemas de colheita e preparo, na qualidade do café, nas diferentes regiões cafeeiras do Estado de São Paulo - resultados preliminares. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEIEIRAS, 12., 1985, Caxambu. **Trabalhos apresentados...** Rio de Janeiro: IBC, 1985 p.210-214.
- LEVI, C. P.; TRENK, H. L.; MOHR, H. K. Study of the occurrence of ochratoxin A in green coffee beans. **Journal of Association of Official Analytical Chemists**, Washington, v.57, n.4,p.866-870, 1974.
- LOPES, L. M. V. **Avaliação da qualidade dos grãos crus e torrados de cultivares de cafeeiros (*Coffea arabica* L.)**. Lavras: UFLA, 2000.110p. (Dissertação - Mestrado em Ciências de Alimentos).
- LOPES, L. M. V.; PEREIRA, R. G. F. A.; MENDES, A. N. G.; VILELA, E. R.; CARVALHO, V. D. de. Avaliação da qualidade de grãos de diferentes cultivares de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) **Revista Brasileira de Armazenamento**, Viçosa, n.1, p.3-8, 2000. Especial.
- LURIE, S.; LEVIN, A.; GREVE, C.; LABAVITCH, J.M. Pectic polymer changes in nectarines during normal and abnormal ripening. **Phytochemistry**, Elmsford, v.36,n.1,p-11-17,jan. 1994.
- MANTLE P.G.; CHOW, A. G. Ochratoxin formation in *Aspergillus ochraceus* with particular reference to spoilage of coffee. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam v.56, p.105-109, 2000.

- MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. London: Academic Press, 1986. 672p.
- MEIRELLES, A. M. A. **Ocorrência e controle da microflora associada aos frutos de café (*Coffea arabica* L.) provenientes de diferentes localidades do estado de Minas Gerais**. Lavras :UFLA, 1990. 71p.(Dissertação – Mestrado em Fitotecnia)
- MENGEL, K.; KIRKBY, E. A. **Principles of plant nutrition**, Bern: International. Potash Intitute, 1982. 655p.
- MICCO, C.; BRERA, C.; DESIDERIO, C. A study of the contamination by Ochratoxin A of green and roasted coffee beans, **Food Additives and Contaminants**, Basingstoke, v.1,n.3,p.333-339,1989.
- MICCO, M.; MIRAGLIA, M.; BRERA,C.; DESIDERIO, C.; MASCI, V. The effect of roasting on the fate aflatoxin B1 in artificially contaminated green coffee beans. **Mycotoxin Research**, Maing, v.8, p.93-97.1992.
- MISLIVEC, P.B.; BRUCE, V. R.; GIBSON, R. Incidence of toxigenic and other molds in green coffee beans. **Journal of Food Protection**, Washington, v.46, n.11, p.969-973,1983.
- MOSS, M. O. Recent studies of micotoxins. **Journal of Applied Microbiology**, Bedford, v.84, p.622s-676s, 1998 Symposium Supplement.
- NAIDU, R. Mycotoxins in coffee. **Indian coffee**, Bangalou, v.60, n.8, p.9-11, Aug., 1996.
- NAKAJIMA, M.; TSUBOUCHI, H.; MIYABE, M.; UENO,Y. Survey of aflatoxin B1 and ochratoxin A in commercial green coffee beans by high-performance liquid-chromatography linked with immunoaffinity chromatografy. **Food and Agricultural Imunology**, Cambridge, v.9, p.77-81, 1997.
- NORTHMORE, J. M. Some factores affecting the quality of Kenia coffee. **Turrialba**, San jose, v.15, n.3,p.184-193, jul./set.1965.

ORGANIZACION INTERNACIONAL DEL CAFÉ. El despulpado del café por medio de desmuciladoras mecánicas sin proceso de fermentación y su efecto em la calidad de bebida de café producido en la región de Apucarana en el estado de Paraná en Brasil. Londres, 1992, n.p. (Reporte de Evaluación Sensorial).

OLIVEIRA, J. C.; AMORIM, H. V.; SILVA, D. M.; TEIXEIRA, A. A. Atividade enzimática da polifenoloxidase de grãos de quatro espécies de café durante o armazenamento. *Científica*, Jaboticabal, v.4, n.2, p.114-119,1976.

PETRACCO, M. Melhoramento da qualidade do café pelo combate ao crescimento de mofos. In: [ENCONTRO SOBRE PRODUÇÃO DE CAFÉ COM QUALIDADE]. 1.,1999, Viçosa. Primeiro... Viçosa:UFV, 1999. p.22-35.

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

PITTET, A; TORNARE, D. HUGGETT, A.; VIANI, R. Liquid chromatographic determination of Ochratoxin A in pure and adulterated soluble coffee using na immunoaffinity colum procedure. *Journal of Agricultural and Food Chemists*, Washington, v.44,n.11, p.3564-3569,1996.

POHLAND, A. E.; NESHEIM, S.; FRIEDMAN, L. Ochratoxin A :a review. *Pure and Applies Chemistry*, Elmsford, v.64,p.1029-1046,1992.

POVOA, H.N. **Aplicação no solo de magnésio, Boro e Zinco, na presença de NPK -Efeitos no teor dos elementos presentes na folha e na produção cafeeira em formação.** Lavras: ESAL, 1978 65p. (Dissertação - Mestrado em Ciências do solo)

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

PUERTA QUINTERO, G. I. Calidad en taza de las variedades de *Coffea arabica* L. cultivadas en Colombia. *Cencafé*, Chinchiná,v.49,n.2, p.85-90, abr./jun. 1996.

- RÖMHELD, V.; MARSCHNER, H. Function of micronutrients in plants. In: Motvedt, J. J.; Giordano, P. M.; Lindsay, W. L., **Micronutrients in Agriculture**, 2 ed. Madison: SSSA, 1991. p.297-328
- SCUSSEL, V.M. **Micotoxinas em Alimentos**. Florianópolis: Insular, 1998 144p.
- SILVA, F. A. N.; FREITAS, R. F.; MACHADO, J.C.; CHALFOUN, S.M. População fúngica associada a frutos de café (*Coffea arabica* L.) durante as fases pré e pós colheita, e sua relação com a qualidade de bebida. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 24. 1998, Poços de Caldas. **Resumos...** Poços de Caldas: IBC, 1998.p.23-24.
- SILVA, C.F. **Diversidade microbiana em grãos de café (*Coffea arabica* L.) processados por via seca nas fases pré e pós colheita**. Lavras: UFLA, 2000. 125p. (Dissertação - Mestrado em Ciências de Alimentos).
- SMITH, R. F. Les acides chlorogéniques du café. **Café Cacao Thé**, Paris, v.7, n.4, p.245-252, jul./sept. 1963.
- SÖNDAHL, M.R.; CORP, F. Produção de café: considerações sobre qualidade. **Revista Illycaffé**, São Paulo, v.1,n.1, p.9, 1995.
- SOUZA e SILVA, J. Colheita secagem e armazenamento do café. In: [ENCONTRO SOBRE PRODUÇÃO DE CAFÉ COM QUALIDADE], 1., 1999, e Viçosa. **Primeiro...** Viçosa:UFV, 1999 .p.39-117.
- STUDER-ROHR, J.; DIETRI, D.R.; SCHLATTER, J.; SCHLATTER C. The occurrence of ochratoxin A in coffee. **Food and chemical toxicology**, Zurich, v.33,n.5, p.341-355, May. 1995.
- TEIXEIRA, A. A.; PIMENTEL GOMES, F.; CRUZ, V.F. A influencia de grãos ardidos em ligas com café de bebida mole. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v.24, n.6, p.683-687, dez.1971
- TSUBOUCHI, H.; UDAGAWA, S. A survey of occurrence of mycotoxins and toxigenic fungi in imported green coffee beans. **Proceedings of the Japanese Association of Mycotoxicology**, Tokyo, v.19, p.14-21.1984.
- TSUBOUCHI, H.; YAMAMOTO K.; HISADA, K.; SAKABE, Y; Ochratoxin A found in commercial roast coffee. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.36,n.3,p.540-542, 1988.

- TSUBOUCHI, H.; YAMAMOTO K.; HISADA, K.; SAKABE, Y.; UDAGAWA, S. Effect of roasting on ochratoxin A level in green coffee beans inoculated with *Aspergillus ochraceus*. **Mycopathologia**, The Hague, v.97, p.111-115, 1987.
- TRUCKESS, M. W.; GILER, J.; YOUNG, K.; WHITE, K. D.; PAGE, S. W. Determination and survey of ochratoxin A in wheat, barley, and coffee. **Journal of AOAC International**, Washington, v.8, n.1, p.85-87, 1999.
- VALENCIA, A. G. Actividad enzimática en el grano de café en relación con la calidad de la bebida de café. **Cenicafé**, Chinchiná, v.23, n.1, nov. 1973.
- VALENCIA-ARISTIZABAL, G. Atividade enzimática en el grano de café en relación con la calidad de la bebida de café. **Cenicafé**, Caldas, v.23, n.1, p.3-18, 1972.
- VILAS BOAS, B. M.; PÁDUA, F. R. M.; CARVALHO, V. D. de Teores de compostos fenólicos em café de diferentes padrões de bebida. In: SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS, 3., 1999, Campinas. **Resumos...** Campinas: UNICAMP, 1999. p.62.
- WHITAKER, J. R. Polyphenol oxidase. In: WONG, D. W. S. **Food Enzymes-structure and mechanism**. London: Chapman & Hall, 1995. p.271-307.
- ZAMBOLIM, L.; VENTURA, J. A. Resistência a doenças induzida pela nutrição mineral das plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.1, p.275-283, 1993.

CAPÍTULO 2

**EFEITO DE MICRONUTRIENTES NA POPULAÇÃO FÚNGICA
ASSOCIADA A GRÃOS DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.),
OCORRÊNCIA DE OCRATOXINA A E QUALIDADE DO
PRODUTO.**

RESUMO

PASIN, Liliana Auxiliadora Avelar Pereira **Efeito de micronutrientes na população fúngica associada a grãos de café (*Coffea arabica* L.), ocorrência de ocratoxina A e qualidade do produto.** Lavras: UFLA, 2000 158p. (Tese - Doutorado em Fitopatologia)*

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de micronutrientes, pulverizados diretamente sobre os grãos na pré-colheita, na incidência fúngica em grãos de café beneficiados do ano agrícola 1999/2000, ocorrência de ocratoxina A e composição química dos grãos. Os nutrientes cobre, zinco, manganês e boro, foram aplicados isoladamente e em associação, pulverizados diretamente sobre os grãos desde a fase de chumbinho até a colheita. A avaliação da incidência fúngica foi realizada quando os grãos atingiram teor de umidade em torno de 12%, antes e após a desinfecção superficial com hipoclorito de sódio a 1%. A exteriorização dos fungos foi realizada através do método *Blotter test*. A avaliação do índice de ocorrência baseou-se nas características morfológicas das colônias fúngicas. A determinação da OTA foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Foram determinados os valores médios de lixiviação de potássio, condutividade elétrica, atividade enzimática da polifenoloxidase, e fenólicos totais. Os resultados obtidos permitiram verificar que todos os nutrientes aplicados isoladamente reduziram significativamente a porcentagem média de incidência dos fungos *A. ochraceus*, *F. semitectum* e *C. cladosporioides*, entretanto a ocorrência do fungo *P. variable* não apresentou diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos realizados. Apesar da ocorrência interna do fungo *A. ochraceus* ter sido relativamente elevada, em torno de 50% na testemunha, não se detectou a ocorrência de OTA nestas amostras, sugerindo que o café não é um bom substrato para a produção desta micotoxina. Verificou-se valores médios mais elevados de lixiviação de potássio, condutividade elétrica e fenólicos totais, e menor atividade enzimática da polifenoloxidase nas amostras de café com maior incidência dos fungos *A. ochraceus*, *F. semitectum* e *C. cladosporioides*, indicando que a presença de fungos associados aos grãos pode exercer influência direta na qualidade do café.

* Comitê Orientador: Prof.Dr. Mário Sobral de Abreu – UFLA (Orientador), Dra. Sara Maria Chalfoun de Souza – EPAMIG, Prof^a Dra. Vânia Déa de Carvalho – UFLA.

ABSTRACT

PASIN, Liliana Auxiliadora Avelar Pereira. Effect of micronutrients on the fungal population associated with coffee (*Coffea arabica* L.) grains, occurrence of ochratoxin A and product quality. Lavras :UFLA, 2000 158p. (Thesis - Doctorate in Phytopathology)*

The purpose of this work was to evaluate the effect of micronutrients sprayed directly on the grains at the pre-harvest on the fungal incidence in the processed coffee grains of the agricultural year 1999/2000, occurrence of ochratoxin A and chemical composition of grains. The nutrients copper, zinc, manganese and boron were applied singly and in association, sprayed directly on grains since the phase green berry until harvest. The evolution of fungal incidence was performed when the grains reached moisture content around 12% before and after the surface disinfested with 1% sodium hypochloride. The fungal exteriorization was performed through *Blotter test* method. The evaluation of occurrence index was based on morphological characteristics of the fungal colonies. The determination of OTA was proceeded by high performance liquid chromatography (HPLC). The average values of potassium leaching, electric conductivity, polyphenoloxidase activity and phenolics were determined. The results obtained enabled at verifying that all nutrients applied singly reduced the average percentage of incidence of the fungi *Aspergillus ochraceus*, *Fusarium semitectum* and *Cladosporium cladosporioides* nevertheless, the occurrence of the fungus *P. variable* presented no significant statistic differences among the treatments accomplished. In spite of the internal occurrence of the fungi *A. ochraceus* having been relatively high, around 50%, on the occurrence of the OTA in these samples was not detected, suggesting that the coffee is not a good substrate for the production of the mycotoxin. Higher average values of potassium leaching electric conductivity na total phenolics and less enzyme activity of the fungi *A. ochraceus*, *F. semitectum* and *C. cladosporioides* denoting that the presence of fungi associated with grains may exercise direct influence on coffee quality.

* Guidance Committee: Prof. Dr. Mário Sobral de Abreu - UFLA (Major Adviser), Dra. Sára Maria Chalfoun - EPAMIG, Prof^a Dra. Vânia Déa de Carvalho - UFLA.

1 INTRODUÇÃO

O café constitui uma das principais fontes de receita para o país; no entanto, com o aumento da produção e melhoria da qualidade por outros países produtores, aliados a crescentes demandas por cafés de qualidade superior por países importadores, a exportação brasileira tem sofrido quedas significativas, refletindo diretamente nos aspectos sociais e econômicos do país.

Esta crescente demanda pelos países importadores por um café de melhor qualidade, mostra a importância de associar produtividade e qualidade, já que o café destaca-se entre os poucos produtos agrícolas que tem seus preços baseados em parâmetros qualitativos, cujo valor aumenta significativamente com a melhoria da qualidade.

Dentre os aspectos que influenciam a qualidade do café, a incidência de microorganismos nas fases de pré e pós colheita tem sido um dos principais fatores envolvidos. Os frutos estão expostos a uma diversidade de microorganismos, tais como leveduras, fungos, bactérias, que encontrando condições favoráveis para se desenvolver, infectam os grãos. Entre os organismos que compõem a microbiota do café, os fungos filamentosos representam o grupo que pode causar maior dano, comprometendo, conseqüentemente, a qualidade (Carvalho, 1997).

Além da influência direta na qualidade, certos fungos associados aos grãos, denominados toxigênicos, podem produzir substâncias tóxicas, ou seja, metabólitos secundários denominados micotoxinas, altamente nocivas à saúde do homem. A ocorrência de micotoxinas em grãos de café até então não era considerada por falta de evidências científicas. Somente recentemente, após o refinamento de técnicas químicas analíticas, a presença destes metabólitos tornou-se evidente.

No café, a toxina de maior ocorrência é a Ocratoxina A (OTA) sendo produzidas por fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, dentre eles: *A. ochraceus*, *A. melleus*, *A. sulphureus*, *P. variable*, *P. verrucosum* (Scussel,1998 e Moss,1998). A ocorrência desta toxina em grãos de café tem gerado grande preocupação no mercado consumidor do produto, devido ao seu potencial hepatóxico, nefrotóxico, teratogênico e carcinogênico (Sturder-Rhor et al.,1995), podendo comprometer, além da saúde do consumidor, a comercialização do produto.

De acordo com Frank (1998), uma das alternativas viáveis para impedir este problema seria a prevenção da contaminação dos grãos por fungos, durante o processo de produção.

A presença destes microorganismos e a qualidade do café dependem diretamente dos cuidados na condução e manejo da cultura e dos frutos durante as fases de pré e pós-colheita. (Souza e Carvalho,1997). Entre 1939 e 1943, Bitancourt (1957) realizou vários testes visando melhorar a qualidade do café, impedindo o desenvolvimento de microorganismos, e concluiu que é possível melhorar a bebida do café através de pulverizações. Feira-Morales (1990) ressalta que deficiência nutricional e o uso inadequado de medidas de proteção contra as doenças do café conduzem à produção de baixos padrões qualitativos do produto.

Considerando ainda o manejo da cultura, Petracco(1999) evidencia que medidas de conservação de solo e adubação verde exercem impacto na flora fúngica., assim como a poda e a fertilização da cultura, já que estas medidas aumentam o vigor da planta.

Considerando os danos causados por microorganismos não apenas na qualidade do café, como no aspecto de segurança do produto, pesquisas que visem o seu controle nas fases de pré e pós-colheita são ainda incipientes. Diante destas evidências, este trabalho objetiva determinar o efeito de micronutrientes

aplicados nos frutos na pré-colheita, na incidência fúngica dos grãos de café beneficiado, produção de ocratoxina A e a influência destes micronutrientes na composição química dos grãos verdes.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Caracterização do experimento

O trabalho foi desenvolvido em lavoura da EPAMIG, safra 1999/2000, situada no Campus da Universidade Federal de Lavras, no município de Lavras, MG, em lavoura adulta da cultivar Mundo Novo IAC-379-39, em franca produção.

O sistema de cultivo adotado foi o de livre crescimento com espaçamento de 4 x 1m. A lavoura não recebeu nenhuma pulverização com micronutrientes além dos tratamentos realizados neste ensaio, assim como pulverizações visando o controle fúngico. Os demais procedimentos foram os mesmos recomendados para a cultura do cafeeiro.

Testou-se o efeito de produtos químicos à base de cobre, manganês, zinco e boro, pulverizados com costal manual, mensalmente, isoladamente ou em associação, conforme tabela 1, diretamente sobre os frutos, desde a fase de chumbinho, até a colheita, totalizando sete pulverizações.

O experimento foi instalado em blocos casualizados, cada parcela foi constituída por 6 plantas, delimitadas por três plantas, que não foram pulverizadas, constituindo bordaduras. Cada fileira contendo os tratamentos foi separada por uma que não foi submetida a pulverizações.

Quando 80% dos frutos atingiram o estágio de maturação cereja, foram colhidos. Para cada tratamento colheram-se 60 Kg de frutos, para posterior secagem, em terreiro de concreto. Os frutos permaneceram no terreiro por um período de 15 dias, até atingirem o teor de umidade em torno de 12%. Após secagem os grãos foram armazenados em sacos de papel duplo. Para análises posteriores, as quais foram realizadas dois dias após a retirada dos grãos do terreiro.

TABELA 1 Relação dos tratamentos realizados no café (*Coffea arabica* L.) com respectivas fontes e concentrações dos nutrientes.

Tratamentos	Descrição
1	Cu – Oxidocloreto de cobre (0,3%)
2	Zn – Sulfato de zinco (0,5%)
3	Mn – Sulfato de manganês (0,2%)
4	B – Ácido Bórico (0,3%)
5	Cu+Zn (0,3 %+ 0,5%)
6	Cu+Mn (0,3%+0,2%)
7	Cu+B (0,3%+0,3%)
8	Zn+B (0,5%+0,3%)
9	Zn+Mn (0,5%+0,2%)
10	Mn+B (0,2%+0,3%)
11	Cu+Zn+Mn+B (0,3%+0,5%+0,2%+0,3%)
12	Testemunha

*Pulverização a alto volume (400 l/ha)

2.2 Exteriorização e identificação dos fungos associados aos grãos

Para identificação dos fungos associados aos grãos, 200 grãos de café beneficiados foram coletados ao acaso, de cada tratamento. Um lote de 100 grãos foi desinfectado superficialmente, após a imersão por 1 minuto em álcool etílico a 70%, a fim de garantir a desinfecção superficial em grãos com grande infecção de *Aspergillus* e *Penicillium*, fungos produtores de esporos muito secos e hidrofóbicos. Em seguida, os grãos foram imersos em solução de hipoclorito de sódio a 1% por três minutos. Após a imersão em hipoclorito de sódio, os grãos foram lavados com água destilada e esterilizada, para a remoção do resíduo. Este procedimento permite conhecer os fungos que realmente invadiram os grãos. Os 100 grãos restantes da amostragem realizada, não foram desinfectados, permitindo, assim, conhecer a população fúngica externa, a qual

representa uma fonte de inóculo em potencial, durante o período de transporte e armazenamento dos grãos.

Os grãos de cada tratamento, desinfetados e não desinfetados com hipoclorito de sódio, foram distribuídos, sob condições assépticas em placas de Petri de 15 cm de diâmetro, contendo três folhas de papel de filtro, previamente esterilizadas e umedecidas com água destilada e esterilizada. Cada placa com 25 grãos foi considerada uma repetição. Após plaqueamento, os grãos foram incubados em câmara com temperatura de $20^{\circ} \text{C} \pm 2^{\circ} \text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas de luz, durante oito dias, até exteriorização e desenvolvimento dos fungos (Mazzani, 1994).

A micoflora associada aos grãos foi avaliada através da identificação e contagem dos fungos, examinado individualmente os grãos em microscópio estereoscópico, após oito dias de incubação. Em alguns casos, a identificação foi confirmada pela visualização das estruturas morfológicas dos fungos em microscópio óptico.

2.3 Análises químicas

2.3.1 Preparo das amostras para análise químicas

Para a realização das análises químicas, fez-se uma amostragem de 200 gramas de grão cru, de cada tratamento. As amostras foram moídas em moinho marca Tecnal, modelo T 650, e peneiradas em peneiras de 20 mesh. Especialmente para a avaliação da atividade da polifenoloxidase e acidez titulável total, realizou-se a extração imediatamente após a moagem, para não haver alterações do material. Para as análises de condutividade elétrica e lixiviação de potássio, separaram-se 100 gramas de grão cru.

2.3.2 Lixiviação de íons de potássio

A determinação da quantidade de potássio lixiviado foi realizada em fotômetro de chama Digimed NK –2002 após 3,5 horas de embebição dos grãos, segundo metodologia proposta por Prete (1992).

2.3.3 Condutividade elétrica

Determinada através do método adaptado de Loeffler, Tekrony e Egli (1988).

2.3.4 Atividade enzimática da polifenoloxidase

A obtenção do extrato enzimático foi realizada através da adaptação do processo de extração descrito por Draetta e Lima (1976). Pesados 5 g do grão cru, adicionaram-se, a seguir, 40 ml de tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 6,0 agitando-o por 5 minutos, o material utilizado foi mantido sob refrigeração. Após agitação, as amostras foram submetidas à filtração a vácuo utilizando papel Whatman nº 1. A atividade enzimática foi determinada pelo método descrito por Ponting e Josling (1948), utilizando-se extrato de amostra sem DOPA como branco.

2.3.5 Compostos fenólicos totais

Foram extraídos pelo método de Goldstein e Swain (1963) utilizando metanol (50%) como extrator e identificados pelo método de Folin Denis, descrito pela AOAC (1990).

2.4. Análise de Ocratoxina A

As análises foram realizadas no Laboratório de Micotoxinas, do Ministério de Agricultura e Abastecimento, de acordo com os métodos analíticos de referência para análise de micotoxinas em produtos e subprodutos e derivados

de origem vegetal, publicadas no Diário oficial. Os procedimentos analíticos desta metodologia são baseados nos descritos por AOAC (1990) e Nakajima et al. (1990).

Utilizou-se a metodologia analítica para a determinação da ocratoxina A (OTA) por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE /HPLC). Esta metodologia fundamenta-se na extração da ocratoxina A pela solução de metanol: bicarbonato de sódio; purificação do extrato por coluna de imunoafinidade; separação do extrato purificado por CLAE; detecção e quantificação. O limite de detecção foi de 0,01 ng/g.

De cada tratamento foi retirado 1 Kg de grão, que foi previamente homogenizado, constituindo as sub-amostras. Após moídas, estas foram novamente homogeneizadas para a retirada de 25 g, os quais foram utilizados para as análises em triplicata.

Apenas o café beneficiado foi utilizado para realização das análises.

2.5 Análise estatística

Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado.

Para avaliação dos fungos exteriorizados pelos grãos de café cru, utilizaram-se quatro repetições de 25 sementes, para todos os tratamentos.

Para a realização das análises químicas, fez-se uma amostragem de 200 gramas de grão cru, de tratamento em cada bloco.

A análise estatística foi realizada utilizando-se o procedimento GLM (General Liner Models) do sistema estatístico SAS[®] (Sas Institute,1992).

Os testes de hipótese foram conduzidos através de análise de variância

Os dados referentes à incidência fúngica foram previamente transformados em $\sqrt{x + 0,5}$ antes de serem submetidos à análise de variância, em razão de não ter havido normalidade e/ou homogeneidade dos erros.

Os testes de comparações de médias, para detectar as diferenças quanto à incidência fúngica e composição química dos grãos, foram realizados pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 População fúngica associada aos grãos

Os resultados referentes às porcentagens médias de fungos em cafés beneficiados, submetidos a diferentes tratamentos com micronutrientes, em grãos desinfestados e não desinfestados com hipoclorito de sódio a 1%, são apresentados nas Tabelas 2 e 3. Observa-se que as espécies fúngicas associadas aos grãos de café estão incluídas nos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Cladosporium*, o que está de acordo com o verificado por Meirelles (1990), Alves (1996) e Freitas(2000).

A testemunha foi o tratamento no qual se observou maior incidência de todos os gêneros de fungos; entretanto, não se detectaram diferenças estatísticas significativas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade, entre a testemunha e alguns tratamentos, para todos os fungos. Isto foi verificado tanto para os grãos desinfestados como para os não desinfestados superficialmente (Tabela 2,3).

TABELA 2 Porcentagem de ocorrência de fungos em grãos de café beneficiado, não desinfestado com hipoclorito de sódio e pulverizados com micronutrientes. UFLA – Lavras (MG), 2000

Tratamentos	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	<i>Penicillium variable</i>	<i>Fusarium semitectum</i>	<i>Aspergillus ochraceus</i>
Cu	68 b	72 a	33 c	5 cd
Zn	68 b	73 a	33 c	6 cd
Mn	71 b	71 a	38 c	8 cd
B	69 b	72 a	41 c	10 cd
Cu+Zn	87 ab	64 a	58 ab	26 cd
Cu+Mn	66 b	63 a	58 ab	18 cd
Cu+B	70 b	58 a	66 ab	15 cd
Zn+Mn	83 ab	73 a	65 ab	22 cd
Zn+B	73 ab	83 a	47 bc	20 cd
Mn+B	84 ab	79 a	55 ab	42 bc
Cu+Zn+Mn+B	88 ab	70 a	68 ab	83 a
Testemunha	94 a	81 a	79 a	84 a

Médias com a mesma letra na coluna, são estatisticamente iguais pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Verificou-se menor incidência do fungo *Aspergillus ochraceus* para todos os micronutrientes aplicados isoladamente, sendo as pulverizações com cobre e zinco as mais efetivas no controle da incidência deste fungo; isto pode ser constatado na Tabela 2. Entretanto, quando os micronutrientes foram aplicados em associação, os resultados não foram satisfatórios, principalmente quando todos os fertilizantes foram aplicados associados em solução (Tabela 2).

O cobre é componente de diversas moléculas protéicas como: plastocianina, peroxidases e proteínas, que dentre várias funções, oxidam monofenóis a difenóis e promovem a formação de radicais mesoméricos;

fenolase, que participa da monooxigenação de monofenóis e cataliza a oxidação de *o* difenóis para *o* quinonas e lacase (Marschner, 1986).

Desta forma, no tocante à tolerância das plantas às doenças, o cobre pode exercer efeitos diretos sobre os fungos ou indiretos agindo sobre os próprios mecanismos de resistência do hospedeiro. No primeiro caso, a influência desse micronutriente está relacionada com sua capacidade fungistática, que tem sido amplamente demonstrada por vários pesquisadores (Graham, 1983; Bell, 1989).

De maneira geral, os mecanismos de controle de fungos pelo cobre podem ser devidos à toxicidade direta, provocando a desnaturação de proteínas; participação direta na síntese de lignina, reconhecida barreira à penetração de microorganismos (Graham e Webb, 1991).

Além de participar da síntese de lignina, o Mn também pode exercer uma inibição direta no crescimento fúngico, em certas concentrações, podendo atingir níveis tóxicos para o fungo (Graham e Webb, 1991). Neste trabalho, pode-se verificar também uma redução na porcentagem de incidência do fungo *A. ochraceus* quando se aplicou sulfato de manganês a 0.2%.

Becker-Raternink, Moraes e Quijano-Rico (1991) relatam existir uma correlação entre as concentrações de cobre e manganês e a qualidade da bebida; a melhor qualidade da bebida em função destes micronutrientes pode ser atribuída à redução da incidência de fungos associados aos grãos, já que a ocorrência de fungos nas fases pré e pós-colheita é um dos principais fatores que influenciam a qualidade.

Apesar do fungo *Aspergillus ochraceus* ser enquadrado no grupo de fungos xerofílicos, ou seja, capazes de atuar sobre grãos e sementes em atmosfera relativamente seca, desfavorável aos fungos de campo, e serem saprófitas e oportunistas, provavelmente foi sensível ao efeito fungitóxico do cobre e manganês, mesmo a baixas concentrações.

O zinco é um dos elementos mais limitantes para o cultivo do cafeeiro. Em caso de deficiência acentuada, pode causar a seca de ramos e ponteiros e frutos mal granados e supostamente mais sensíveis à associação com microorganismos. Neste estudo, pode-se observar que a aplicação de sulfato de zinco a 0.5% reduziu a incidência do fungo *A. ochraceus*.

O boro também participa no metabolismo de fenóis e lignina, além de ser responsável pelo incremento na formação de fitoalexinas fenólicas em resposta à liberação de borato, que se comportaria como elicitador dessas substâncias (Lewis, 1980; Graham e Webb, 1991).

A análise dos grãos desinfectados com hipoclorito de sódio é relevante para se conhecer o nível de infestação de cada fungo. O fungo *Aspergillus ochraceus* é um fungo saprófita e oportunista, necessitando de condições favoráveis para infectar o interior dos grãos de café (Samson et al., 1995). Verificando as tabelas 2 e 3, observa-se que a presença externa aos grãos é maior que a interna, no entanto, para o fungo *Aspergillus ochraceus*, os índices de contaminação interna e externa foram relativamente equivalentes. Verificou-se contaminação interna para todos os fungos detectados nos grãos não desinfectados.

Pode-se verificar, também, que o comportamento com relação aos tratamentos com micronutrientes foi semelhante, nos grãos desinfectados e não desinfectados, com hipoclorito (Tabelas 2 e 3), ou seja, quando se pulverizaram apenas os nutrientes isoladamente houve menor índice de infestação de *A. ochraceus*.

TABELA 3 Porcentagem de ocorrência de fungos em grãos de café beneficiado, desinfestado com hipoclorito de sódio e pulverizados com micronutrientes. UFLA – Lavras (MG), 2000

Tratamentos	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	<i>Penicillium variable</i>	<i>Fusarium semitectum</i>	<i>Aspergillus ochraceus</i>
Cu	16,0 b	22,0 a	14,0 c	4,0 c
Zn	11,0 b	23,0 a	12,0 c	5,0 c
Mn	15,0 b	21,0 a	15,0 c	8,0 c
B	17,0 b	22,0 a	12,0 c	9,0 c
Cu+Zn	32,0 a b	26,0 a	28,0 b	35,0 b
Cu+Mn	36,0 a b	22,0 a	28,0 b	11,0 c
Cu+B	36,0 a b	26,0 a	36,0 a b	12,0 c
Zn+Mn	38,0 a b	22,0 a	34,0 a b	15,0 c
Zn+B	36,0 a b	22,0 a	36,0 a b	20,0 b c
Mn+B	32,0 a b	26,0 a	31,0 a b	32,0 b
Cu+Zn+Mn+B	48,0 a	22,0 a	29,0 a b	44,0 a
Testemunha	44,0 a	26,0 a	36,0 a b	48 a

Médias com a mesma letra na coluna, são estatisticamente iguais pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A incidência dos fungos *Cladosporium cladosporioides* e *Fusarium semitectum* em resposta às pulverizações com micronutrientes foi semelhante à incidência de *Aspergillus ochraceus*. Todos os micronutrientes aplicados isoladamente diminuíram significativamente a incidência destes fungos; no entanto, para o fungo *Penicillium variable*, isto não foi verificado. Pode-se constatar, pela análise dos resultados obtidos e apresentados nas tabelas 2 e 3 que a incidência deste fungo não diferiu estatisticamente para todos os nutrientes aplicados isoladamente ou em associação, sugerindo que este fungo é indiferente ao efeito fungitóxico destes elementos, nas concentrações aplicadas.

3.2 Ocorrência de Ocratoxina A

No presente estudo constatou-se a incidência dos fungos *Aspergillus ochraceus* e *Penicillium variable*, conforme Figura 1, ambos citados como produtores de ocratoxina A (Scussel, 1998). No entanto, apesar da porcentagem média de ocorrência interna de *A.ochraecus* ter sido, em alguns tratamentos, como a testemunha, e todos os micronutrientes aplicados associados, próximo a 50%, a ocorrência desta micotoxina não foi detectada (Tabela 4).

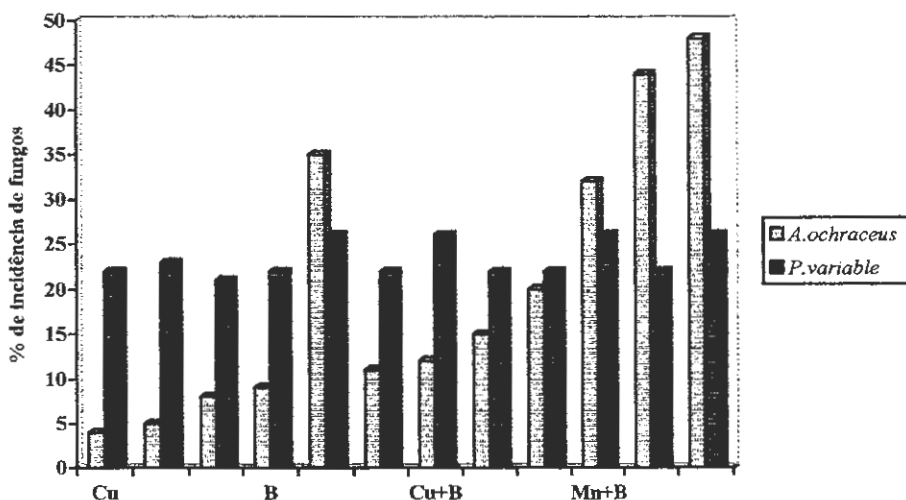


FIGURA 1 Porcentagem média de ocorrência interna de fungos potencialmente produtores de OTA, em amostra de café beneficiado, submetidas a pulverizações com micronutrientes, safra 1999/2000. Lavras-MG, UFLA, 2000.

TABELA 4 Ocorrência de Ocratoxina A (OTA) em amostras de café beneficiado submetidos a pulverização com micronutrientes. UFLA(MG), 2000.

Tratamentos	DET. (($\mu\text{g/Kg}$))
1	ND
2	ND
3	ND
4	ND
5	ND
6	ND
7	ND
8	ND
9	ND
10	ND
11	ND
12	ND

Levantamentos realizados em amostras de café para a detecção da ocorrência de micotoxinas demonstraram que a frequência de contaminação é extremamente baixa e quando a toxina é encontrada, o nível de contaminação é baixo (Tsubouchi et al., 1987; Levi, 1990; Mantle e Chow, 2000). Segundo Scussel (1998), vários fatores influenciam o desenvolvimento destes fungos e a produção de metabólitos tóxicos. Dentre esses fatores destaca-se a composição química do substrato. O baixo nível de contaminação por fungos potencialmente toxigênicos tem sido atribuído ao efeito inibidor da cafeína sobre a produção de micotoxinas (Buchanan, Harry e Gealt, 1983).

Chalfoun, Pereira e Angélico (2000) relatam que a cafeína pode exercer uma atividade biológica contra uma variedade de fungos, inclusive os toxigênicos. Neste estudo, o fato da contaminação interna ter sido inferior à contaminação externa sugere que a cafeína possa ter exercido um efeito inibidor

no crescimento destes fungos, inibindo, conseqüentemente, a produção da OTA. Entretanto, alguns relatos indicam alta contaminação interna de fungos toxigênicos em amostras de café, sendo também detectada ocratoxina A em níveis superiores aos propostos pela União Européia (Truckess et al., 1999; Urbano et al., 2000; Leoni et al., 2000), indicando que outros fatores, além da composição do substrato, podem influenciar a ocorrência de fungos toxigênicos e produção de micotoxina.

Dentre os fatores que favorecem o desenvolvimento fúngico, ressalta-se temperatura, umidade relativa, conteúdo de umidade, predomínio de linhagem toxigênica, composição do substrato e competição microbiana (Scussel, 1998; Moss, 1998). Isto sugere que, nas condições deste estudo, todos esses fatores podem ter contribuído para uma menor infestação interna dos fungos toxigênicos, e a inibição da produção de ocratoxina A, e não apenas o efeito da cafeína, já que em alguns casos, estes fungos podem infectar grãos de café e produzir micotoxinas.

3.3 Avaliação dos efeitos dos micronutrientes na composição química dos grãos de café cru

3.3.1 Lixiviação de potássio

Pela análise dos resultados apresentados na tabela 5, pode-se verificar que houve diferenças significativas entre os valores referentes à lixiviação de potássio (ppm), dos grãos provenientes de amostragem, nos diferentes tratamentos.

TABELA 5 Valores médios de lixiviação de Potássio de grãos beneficiados verdes de café (*Coffea arabica* L.), submetidos a pulverização com micronutrientes. Lavras-MG, UFLA, 2000.

Tratamentos	Lixiviação de K ⁺ (ppm)
Testemunha	54.84 a
Cu+Zn+Mn+B	50.88 b
Zn+Mn	50.06 b
Mn+B	49.83 b
Cu+B	48.91 bc
Zn+B	48.79 bc
Cu+Zn	46.41 cd
Cu+Mn	46.41 cd
B	45.83 d
Cu	42.82 e
Zn	42.62 e
Mn	42.03 e
C.V. (%)	2.45

Médias com a mesma letra na coluna, são estatisticamente iguais pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A maior lixiviação de potássio ocorreu nos grãos não submetidos a pulverizações e apresentou diferenças estatísticas significativas das demais.

Amorim (1978), realizando testes de lixiviação de Potássio, com o objetivo de avaliar a integridade da membrana, encontrou maiores índices de lixiviação em cafés de pior qualidade. Isto vem indicar que os cafés que tiveram deterioração da qualidade apresentaram suas membranas afetadas. O autor afirma, ainda, que as membranas são as primeiras a serem afetadas pelas condições adversas ao café. Consequentemente ocorrem desorganizações no

interior da célula, indicando que qualquer fator ambiental que altere a estrutura da membrana provocará a deterioração mais rápida do grão.

É comum ocorrerem danos mecânicos nos grãos não apenas durante a fase de processamento, mas também na fase de pré e pós-colheita, devido ao ataque de insetos e infecções microbianas (Carvalho, Chagas e Souza, 1997). Neste estudo, o maior valor de lixiviação de potássio, coincide com o tratamento em que foi verificada maior incidência de fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, o que está de acordo com o relato de Carvalho, Chagas e Souza (1997), que relacionam infecções microbianas como um relevante fator na alteração da estrutura das membranas. Uma vez rompida a estrutura da membrana, há um maior contato entre as enzimas e componentes químicos e entre os próprios componentes intra e extracelulares, o que acarreta reações na composição, e conseqüentemente, na qualidade dos grãos.

Os tratamentos que apresentaram menores valores de lixiviação foram as amostras nas quais se pulverizaram os nutrientes isoladamente, sendo verificado, nestes, menor incidência fúngica. Este fato confirma a relação existente entre infecções por microrganismos, alterações na estrutura da membrana e lixiviação de K^+ .

3.3.2 Condutividade elétrica

Através dos resultados apresentados na tabela 6, para a condutividade elétrica ($\mu/S/g$) dos grãos dos diferentes tratamentos com micronutrientes avaliados, observam-se diferenças significativas entre os tratamentos.

O tratamento no qual não se utilizou nenhum micronutriente, seguido pelo tratamento no qual todos os micronutrientes foram aplicados em associação, foram os que apresentaram maiores valores de condutividade elétrica e todos os nutrientes aplicados isoladamente apresentaram menores valores.

TABELA 6 Valores médios de condutividade elétrica de grãos beneficiados de café (*Coffea arabica* L.), submetidos a pulverização com micronutrientes. Lavras-MG, UFLA, 2000.

Tratamentos	Condutividade elétrica(μ /S/g)
Testemunha	265.93 a
Cu+Zn+Mn+B	254.26 a
Zn+Mn	210.19 b
Mn+B	209.58 b
Cu+B	203.22 b c
Zn+B	196.34 c d
Cu+Zn	187.60 d e
Cu+Mn	186.75d e
B	184.35d e
Cu	181.24 e
Zn	181.20 e
Mn	156.23 e
C.V. (%)	2.56

Médias com a mesma letra, na coluna, são estatisticamente iguais pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Pela análise dos resultados obtidos, pode-se verificar que ocorre uma relação positiva entre a lixiviação de K^+ e condutividade elétrica, sendo que maiores valores de condutividade elétrica foram encontrados em grãos que sofreram maior lixiviação de potássio. Esse resultado confirma o que foi verificado por Prete (1992), que relata ser o íon potássio o lixiviado em maior quantidade e que apresenta uma relação com a condutividade elétrica, com $r^2=0.99$.

Estes resultados também evidenciam que procedimentos adequados nas operações de colheita e pós-colheita, ataque de microorganismos, entre outros,

influenciam diretamente a qualidade do café, considerando que tais injúrias podem promover no grão. Diante disto, pode-se sugerir que os melhores cafés seriam provenientes de melhores condições de cultivo e processamento.

Considerando que quanto maior a intensidade dos danos celulares, maior a facilidade de penetração e difusão de água, e que todos os tratamentos foram conduzidos nas mesmas condições de manejo, acredita-se ter havido uma variação das membranas celulares nos grãos avaliados, que pode ser devida a uma maior incidência fúngica apresentada em alguns tratamentos, facilitando a translocação de íons citoplasmáticos para o meio líquido.

3.3.3 Atividade da polifenoloxidase

Os resultados referentes à atividade da polifenoloxidase (u/min/g de amostra), determinada em grãos crus submetidos a pulverizações com diferentes micronutrientes, estão apresentados na Tabela 7.

A atividade da polifenoloxidase apresenta faixas de variações que separam os cafés em quatro classes distintas, sendo bebida mole, apenas mole, dura, riada e rio. (Carvalho et al., 1994). Neste estudo, pode-se observar que os diferentes tratamentos diferiram significativamente, sendo o tratamento em que não foi aplicado nenhum dos produtos o que apresentou menor atividade desta enzima, se enquadrando de acordo com classificação proposta por Carvalho et al., (1994), no padrão de bebida dura. Verificou-se maior atividade enzimática da polifenoloxidase quando foram pulverizados os micronutrientes isoladamente, sendo as amostras classificadas no padrão mole segundo a classificação de Carvalho et al (1994), seguidas pelas associações de nutrientes, quando dois nutrientes foram aplicados em solução, nas quais o Cu estava presente, apresentando padrão apenas mole.

TABELA 7 Atividade enzimática da polifenoloxidase (u/min/g de amostra) de grãos beneficiados verdes de café (*Coffea arabica* L.), submetidos a pulverização com micronutrientes. Lavras-MG, UFLA, 2000.

Tratamentos	Atividade enzimática da polifenoloxidase (u/min/g de amostra)
Cu	65.33 a
B	64.74 ab
Mn	64.57 ab
Zn	64.50 ab
Cu+B	64.48 ab
Cu+Zn	64.16 ab
Cu+Mn	63.57 bc
Zn+B	62.73 cd
Mn+B	62.37 cd
Zn+Mn	62.17 d
Cu+Zn+Mn+B	61.83 e
Testemunha	60.66 e
C.V. (%)	0.82

Médias com a mesma letra, na coluna, são estatisticamente iguais pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Segundo Amorim e Silva (1968), os compostos fenólicos, principalmente os ácidos clorogênico e caféico, exercem uma função protetora, antioxidante dos aldeídos, quando ocorre qualquer condição adversa, incluindo a incidência de microorganismos associados aos grãos. As polifenoloxidasas agem sobre os polifenóis diminuindo sua ação antioxidante sobre os aldeídos, facilitando a oxidação destes, simultaneamente ocorre a produção de quinonas, que agem como substrato inibidor da ação da polifenoloxidase. Conseqüentemente, cafés de pior qualidade têm baixa atividade da polifenoloxidase.

Neste estudo, a maior ocorrência dos fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Fusarium* foi verificada nas amostras que apresentaram menor atividade desta enzima, confirmando o que foi verificado por Carvalho et al. (1989) e Alves (1996), segundo os quais a microflora de grãos de cafés beneficiados e classificados quanto à bebida apresentaram variações na composição e índice de infecção. Os cafés de bebida tipo mole e dura apresentaram as espécies *Fusarium* sp., *Aspergillus ochraceus* e *A. flavus* em quantidade bem inferior à dos cafés classificados como bebida “riado” e “rio”.

Estes resultados comprovam que a menor associação de fungos do gênero *Aspergillus* e *Fusarium* nos grãos de café, exerce influência direta na qualidade do café, já que estes microorganismos podem acarretar uma alteração na composição química do grão.

3.3.4 Fenólicos totais

Os resultados referentes aos fenólicos totais (%) no grão de café cru estão apresentados na tabela 8. O contraste entre os valores médios da porcentagem de fenólicos totais do tratamento testemunha (sem pulverização) e os valores médios dos demais tratamentos foi significativo (Tabela 8), evidenciando que injúrias provocadas nos grãos pela maior incidência fúngica, verificada neste tratamento, podem ter exercido influência direta na porcentagem destes compostos.

Enzimas e seus principais substratos, compostos fenólicos, encontram-se compartimentalizados em células intactas; entretanto, diante de qualquer desorganização interna da célula, promovida por injúrias, enzima e o substrato interagem produzindo quinonas reativas, as quais reagem com proteínas e outras enzimas, sendo então inativadas (Araújo, 1990).

TABELA 8 Valores médios de fenólicos totais de grãos beneficiados verdes de café (*Coffea arabica* L.), submetidos a pulverização com micronutrientes. Lavras-MG, UFLA, 2000.

Tratamentos	Fenólicos totais (% MS)
Testemunha	7.74 a
Cu+Zn+Mn+B	7.24 b
Zn+Mn	7.11 b
Mn+B	7.06 b
Zn+B	6.91 bc
Cu+Mn	6.59 c
Cu+Zn	6.50 cd
Cu+B	6.42 de
Mn	6.32 de
Zn	6.24 de
B	6.15 e
Cu	6.12 e
C.V. (%)	2.55

Médias com a mesma letra, na coluna, são estatisticamente iguais pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

A presença desses compostos no café em quantidades maiores que aquelas verificadas para determinada espécie, é associada à desvalorização da qualidade (Amorim, 1972). Os resultados deste estudo podem indicar que a maior ocorrência dos fungos *Aspergillus ochraceus* e *Penicillium variable* está relacionada com o aumento dos fenólicos totais, ocasionando, conseqüentemente, a depreciação da qualidade dos grãos .

Dentre os compostos fenólicos encontrados nos grãos de café, os ácidos clorogênicos são os de maior relevância, devido à quantidade encontrada no grão. Os resultados evidenciados neste trabalho reforçam o que foi sugerido por

Amorim et al. (1974), segundo o qual teor do ácido clorogênico é mais elevado em cafés de qualidade inferior em decorrência do ataque do fungo *Fusarium* sp., indicando que os danos mecânicos e químicos induzem à produção de maiores quantidades de compostos fenólicos.

4 CONCLUSÕES

Nas condições em que foi desenvolvido este trabalho e baseado nos resultados obtidos, conclui-se que:

- 1) Todos os micronutrientes (Cu, Zn, Mn e B), aplicados isoladamente, foram efetivos na redução da incidência dos fungos *Aspergillus ochraceus*, *Fusarium semitectum*, *Cladosporium cladosporioides*. Entretanto, quando estes foram aplicados em associação, este efeito não foi verificado, especialmente quando todos foram aplicados em conjunto.
- 2) Os micronutrientes não reduziram a porcentagem média de ocorrência do fungo *Penicillium variable*, mesmo quando aplicados isoladamente.
- 3) A contaminação interna dos grãos de café beneficiado foi inferior à externa, para todos os fungos observados
- 4) A ocorrência de ocratoxina A não foi verificada em nenhuma das amostras analisadas, mesmo nas condições em que a porcentagem média ocorrência interna do fungo *Aspergillus ochraceus* foi relativamente elevada, ou seja, em torno de 50%.
- 5) Os valores médios de lixiviação de potássio, condutividade elétrica e fenólicos totais foram maiores nas amostras em que a incidência dos fungos *Aspergillus ochraceus*, *Fusarium semitectum* e *Cladosporium cladosporioides* foi maior.

- 6) A atividade enzimática da polifenoloxidase foi menor nas amostras em que a ocorrência média dos fungos *Fusarium semitectum*, *Aspergillus ochraceus* e *Cladosporium cladosporioides* foram mais elevadas.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, E. **População fúngica associada ao café (*Coffea arabica* L.) beneficiado e às fases pré e pós colheita-relação com a bebida e local de cultivo.** Lavras: UFLA, 1996. 48p. (Dissertação - Mestrado em Fitossanidade)
- ALVES, E.; CASTRO, H. A. de **Fungos associados ao café (*Coffea arabica* L.) e sua relação com a bebida.** In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 26.,1993, Aracajú. **Resumos...**Brasília: SBF, 1993. p. 329.
- AMORIM, H. V. **Aspectos bioquímicos e histoquímicos do grão de café verde relacionados com a deterioração da qualidade.** Piracicaba: ESALQ, 1978. 85 p. (Tese - Livre Docência em Bioquímica).
- AMORIM, H. V. **Relação entre alguns compostos do grão de café verde com a qualidade da bebida.** Piracicaba: ESALQ,1972. 136p. (Tese -Doutorado em Bioquímica).
- AMORIM, H. V.; SILVA, D. M. **Relação da atividade da polifenoloxidase do grão de *Coffea arabica* L. com a qualidade da bebida.** Piracicaba: ESALQ/USP, 1968. 16p. (Boletim Técnica, 31).
- AMORIM, H.V.; TEIXEIRA, A. A.; GUERCIO, M. A.; CRUZ, V. F.; MALAVOLTA, E. **Chemistry of Brazilian green coffee anal the quality of the beverage : II-Phenolic compounds.** Turrialba, San Jose, v.24, n.2, p.217-221, abr./jun.1974.
- ARAÚJO, J. M. de **Escurecimento enzimático em alimentos: [aspectos químicos e controle].** Viçosa : UFV, 1990. 14p. (Revisão,231).
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMIST. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists.** 15 ed Washigton,1990. 2v.
- BECKER-RATERINK, S.; MORAES, W. B. C.; QUIJANO-RICO, M. **La Roya del cafeto conocimiento y control.** Eschoborn: Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit, , 1991. 281p.

- BELL, A. Role of nutrition in diseases of cotton. In: ENGELHARD, A. W.(ed), **Soilborne Plant Pathogens: [Management of disease with Macro-and Microelements]**. St.Paul. APS Press, 1989. p.167-204.
- BITANCOURT, A. A. O tratamento das cerejas do café para melhorar a bebida. **O Biológico**, São Paulo, v.23, n.1 p 1-11, jan. 1957.
- BUCHANAN, R. L.; HARRY, M. A.; GEALT, M. A. Caffeine inhibition of steigmatocystin, citrinin, and patulin production. **Journal of Food Science**, Chicago, v.48, p.1226-1228, 1983.
- CARVALHO, V. D. **Cafeicultura empresarial: [produtividade e qualidade - qualidade do café]**. Lavras: UFLA/FAEPE, 1997. 73p.
- CARVALHO, V. L. de; CHAGAS, S. J. de R.; CHALFOUN, S.M.; BOTREL, N.; JUSTE JÚNIOR, E. S. G. J. Relação entre a composição físico-química e química do grão beneficiado e a qualidade da bebida do café. I. Atividade de polifenoloxidase peroxidase, índice de coloração e acidez. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília,v.29, n.3, p.449-454, mar. 1994.
- CARVALHO, V. D.; CHAGAS, S. J. R.; SOUZA, S. M. C. Fatores que afetam a qualidade do café, **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.18, n.187, p.5-20,1997.
- CARVALHO, V. D. de; CHALFOUN, S M.; COSTA COUTO, A.; CHAGAS, S. J. de R.; VILELA, E. R. Efeito do tipo de colheita e local de cultivo na composição físico-química e química do grão beneficiado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 15.1989, Maringá, **Resumos ...**Rio de Janeiro: MIC/IBC, 1989.p.23-24.
- CHALFOUN, S. M.; CARVALHO, V.L. de; CHAGAS, S. J. de R. COSTA, L. Controle de microflora associada a frutas e grãos de café (*Coffea arabica* L.) nas fases pré e pós colheita. **Informe Fegatex**, São Paulo, v.1, p.4-10, 1994.
- CHALFOUN, S. M.; PEREIRA, M. C.; ANGÉLICO, C. L. Efeito da cafeína (1,3,7-trimetilxantina) sobre o crescimento micelial, de fungos associados ao café. **Revista Brasileira de Armazenamento**, Viçosa, n.1, p.50-53, 2000. Especial.

- DRAETTA, I. S.; LIMA, D. C. Isolamentos e caracterização das polifenoloxidasas do café. *Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas*, v.7, p.3-28, jun. 1976.
- FERIA-MORALES, A. M. **Changes in cup quality when using innovative field practices.** London: International Coffee Organization. Londres, 1990. p.2-8. (Sensory-Report).
- FRANK, J. M. Toward the prevention of mould mediated quality loss. HACCP analysis of an outdoor process. In: XVII Colóquio Científico Internacional sur le Café, 17, 1998, Nairobi, Kenya. *Proceedings...*, Paris: ASIC, 1998. p.61-68.
- FREITAS, R. F. **Fungos associados a grãos de café (Coffea arabica L.) beneficiado de diversos municípios da Região Sul de Minas Gerais.** Lavras:UFLA, 2000. 71p. (Dissertação – Mestrado em Ciências de Alimentos)
- GOLDSTEIN, J. L.; SWAIN, T. Changes in tannins in ripening fruits. *Phytochemistry, Oxford*, v.2,n.4,p.371-382, Dec.1963.
- GRAHAM, R. D. Effects of nutrient stress on susceptibility of plants to disease with particular reference to the trace elements. *Advances in Botanical Research, San Diego*, v.10, p.221-276, 1983.
- GRAHAM, R. D.; WEBB, M. J. Micronutrients and disease resistance and tolerance in plants. In: MORTVEDT, J.J., GIORDANO, P.M.; LINDSA, W.L. (eds), *Micronutrients and agriculture*. 2.ed. Madison: SSSA, 1991. p.329-370.
- LEONIL, L. A. B.; FURLANI, R. P. Z.; VALENTE SOARES, L. M.; OLIVEIRA, P. L. C.; SAWAZAKI, E. Ochratoxin A in Brazilian green coffee. In: INTERNATIONAL IUPAC SYMPOSIUM ON MYCOTOXINS AND PHYCOTOXINS. Guarujá, 2000. *Abstracts...* Guarujá: IUPAC, 2000, p.143.
- LEVI, C. P. Mycotoxins in coffee. *Journal of Association Official Analytical Chemistry*. Washington, v.6, p.1282-1285, 1990.
- LEWIS, D. H. Boron, lignification and origin of vascular plant a unified hypothesis. *New Phytologist*, London, v.84, p.209-229, 1980.

- LOEFFLER, T. M.; TEKRONY, D. M.; EGLI, D. B. The bulk conductivity test as an indicator of soybean quality. **Journal of Seed Technology**, Lansing, v.12, n.1, p.37-53, 1988.
- MANTLE, P. G.; CHOW, A. G. Ochratoxin formation in *Aspergillus ochraceus* with particular reference to spoilage of coffee. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.56, p.105-109, 2000.
- MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. London: Academic Press, 1986. 672p.
- MAZZANI, C. Hongos associados a grãos de cereais armazenados em Venezuela. In: **CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE MICOTOXICOLOGIA, 1., e ENCONTRO NACIONAL DE MICOTOXINAS, 8**, 1994, Rio de Janeiro. Anais ... Rio de Janeiro: 1994. p.58-60.
- MEIRELLES, A. M. A. **Ocorrência e controle da microflora associada aos frutos de café (*Coffea arabica* L.) provenientes de diferentes localidades do estado de Minas Gerais**. Lavras :UFLA, 1990.71 p. (Dissertação – Mestrado em Fitotecnia).
- MISLIVEC, P. B.; BRUCE, V. R.; GIBSON, R. Incidence of toxigenic and other molds in green coffee beans. **Journal of Food Protection**, Washington, v.46, n.11, p.969-973,1983.
- MOSS, M. O. Recent studies of micotoxins. **Journal Applied Microbiology**, Bedford, v.84, p.622s-676s, 1998 Symposium Supplement.
- NAKAJIMA, M.; TERADA, H.; HISADA, K.; TSUBOUCHI, H.; YAMAMOTO, K.; UDA, T.; ITOH, Y.; KAWAMURA, O.; UENO, Y. Determination of ochratoxin A in coffee bean and coffee products by monoclonal antibody affinity chromatography. **Food & Agricultural Immunology**, Nagoya, v.2, p.189-195. 1990.
- PETRACCO, M. Melhoramento da qualidade do café pelo combate ao crescimento de mofo. In: [Encontro sobre produção de café com qualidade], 1., 1999, Viçosa. **Primeiro...** Viçosa:UFV,1999.p.22-35.
- PONTING, J. D.; JOSLYNG, M. A. Ascorbic acid oxidation and browning in apple tissue extracts. **Archives of Biochemistry**, New York, v.19, p.47-63, 1948.

- PRETE, C. E. C. Condutividade elétrica do exsudado de grãos de café (*Coffea arabica* L.) e sua relação com a qualidade da bebida. Piracicaba: ESALQ, 1992. 125P. (Tese - Doutorado em Fitotecnia).
- SAMSON, R. A.; HOEKSTRA, E. S.; FRISVAD, J. C.; FILTENBORG, O. **Introduction to foodborne fungi**. 4.ed. Baam, Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 1995. 332p.
- SAS Institute. **SAS technical report SAS/TAT software: changes and enhancement release 607**. Cary Nc.: SAS Institute, 1992.
- SCUSSEL, V. M. **Micotoxinas em alimentos**. Florianópolis: Insular, 1998. 144p.
- SÖNDAHL, M. R.; CORP, F. Produção de café: considerações sobre qualidade. **Revista Illycaffé**, São Paulo, v.1, n.1, p.9, 1995.
- SOUZA, S. M. C.; CARVALHO, V. L. Efeito de microorganismos na qualidade de bebida do café. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.18, n.187, p.21-26, 1997.
- STUDER-ROHR, J.; DIETRICH, D. R.; SCHLATTER, J.; SCHLATTER, C. The occurrence of ochratoxin A in coffee. **Food and chemical toxicology**, Zurich, v.33, n.5, p.341-355, May 1995.
- TRUCKESS, M. W.; GILER, J.; YOUNG, K.; WHITE, K. D.; PAGE, S.W. Determination and survey of ochratoxin A in wheat, barley, and coffee. **Journal of AOAC International**, Washington, v.8, n.1, p.85-87, 1999.
- TSUBOUCHI H.; YAMAMOTO K.; HISADA, K.; SAKABE, Y.; UDAGAWA, S. Effect of roasting on ochratoxin A level in green coffee beans inoculated with *Aspergillus ochraceus*. **Mycopathologia**, The Hague, v.97, p.111-115, 1987.
- URBANO, G. R.; TANIWAKI, M. H.; BONES, A. de; LEITÃO, M. F. F. Incidence of toxigenic fungi and ochratoxin A detection in coffee from three Brazilian regions. In: **INTERNATIONAL IUPAC SYMPOSIUM ON MYCOTOXINS AND PHYCOTOXINS**. Guarujá, 2000. Abstract... Guarujá: IUPAC, 2000, p.164.

CAPÍTULO 3

FUNGOS ASSOCIADOS AOS GRÃOS DE CAFÉ(*Coffea arabica* L.) PROCESSADOS POR VIA SECA E ÚMDA EM DIFERENTES CULTIVARES

RESUMO

PASIN, Liliana Auxiliadora Avelar Pereira. **Fungos associados aos grãos de café (*Coffea arabica* L) processados por via seca e úmida em diferentes cultivares.** Lavras: UFLA, 2000. 158p (Tese - Doutorado em Fitopatologia)*

O objetivo deste trabalho foi verificar a microflora associada interna e externamente aos grãos de café nas cultivares. Catuaí Amarelo, Mundo Novo, Acaiaí, Rubi e Icatú, processadas pelas vias seca e úmida e detectar a ocorrência de Ocratoxina A nestas amostras. Frutos de café foram colhidos de 5 cultivares distintas na Fazenda Experimental da EPAMIG, situada no município de Lavras/MG no ano agrícola 1998/99. Parte dos frutos coletados de cada cultivar foi imediatamente despulpadas, para posterior secagem no terreiro. A outra parte foi conduzida até o terreiro de concreto, onde permaneceu até atingir o teor de umidade em torno de 12%. A avaliação da incidência fúngica foi realizada antes e após desinfecção superficial com NaOCl a 1%. O procedimento para exteriorização dos fungos foi o método *Blotter test*. A determinação da OTA foi realizada por HPLC. Os resultados obtidos permitiram verificar que o fungo *F. semitectum* foi identificado apenas na cultivar Mundo Novo, e *F. equiseti* foi identificado nas demais, não havendo diferenças significativas entre elas. Foram isolados dos grãos das amostras três espécies do gênero *Penicilium*, sendo: *P. rugulosum* na cultivar Rubi, *P. funiculosum* na cultivar Icatu e *P. variable* nas demais. A cultivar Acaiaí apresentou maior incidência do fungo *P. variable*, seguida por Mundo Novo e Catuaí. A ocorrência de *A. ochraceus* não diferiu entre as cultivares processadas pela via seca. Nas amostras de café despulpado, houve maior incidência deste fungo na cultivar Icatu, não havendo diferença entre as demais. A ocorrência de *A. niger* não apresentou diferenças entre as cultivares. As cultivares processadas pela via seca não apresentaram diferenças para o fungo *C. cladosporioides*. A cultivar Icatu, quando processada via úmida apresentou menor ocorrência, diferindo estatisticamente das demais. A menor porcentagem média de ocorrência nas amostras despulpadas não foi verificada para todas as espécies fúngicas detectadas nas amostras. A contaminação interna para todas as espécies fúngicas detectadas foi significativamente inferior a contaminação externa. A contaminação interna dos grãos pelos fungos toxigênicos foi muito pequena. A ocorrência de OTA foi verificada apenas em uma cultivar processada pela via úmida, em nível bem abaixo do limite proposto pela União Européia.

* Comitê Orientador : Prof . Dr. Mário Sobral de Abreu – UFLA (Orientador), Dra. Sara Maria Chalfoun de Souza- EPAMIG, Prof^a Vânia Déa de Carvalho – UFLA.

ABSTRACT

PASSIN, Liliana Auxiliadora Avelar Pereira. **Fungi associated with coffee (*Coffea arabica* L.) processed dry and wet via on different cultivars.** Lavras : UFLA, 2000. 158p. (Thesis - Doctorate in Phytopathology). *

The objective of this work was at verifying the mycoflora associated both internally and externally with coffee grains on the cultivars; Catuai Amarelo, Mundo Novo, Acaia, Rubi, Icatu processed by the dry and wet via and detect the occurrence of ochratoxin A in these samples. Coffee fruits were harvested from 5 distinct cultivars on the EPAMIG experiment farm, situated in the town of Lavras /MG in the agricultural year 1998/1999. A part of the fruits collected from each cultivar was readily pulped for further drying on the flat. The other part was carried to the concrete flat open terrace where it remained until they reached moisture content around 12%. The evaluation of the fungal incidence was performed before and after surface disinfection with 1% sodium hypochloride. The procedure for exteriorization of fungi was the *Blotter test* method. The determination of the OTA was accomplished by HPLC. The results obtained enabled to verify that the fungus *Fusarium semitectum* was identified only on the cultivar Mundo Novo and *Fusarium equiseti* was identified on the others, there being no significant differences among them. From the grains of the samples were isolated three species of the genus *Penicillium*, namely, *P. rugulosum* on the cultivar Rubi, *P. funiculosum* on the cultivar Icatu and *P. variable* on the others. The cultivar Acaia presented the highest incidence of the fungus *P. variable* followed by Mundo Novo and Catuai. The occurrence of *A. ochraceus* did not differ among the cultivars processed by dry via on the pulped coffee samples, there was a greater incidence of that fungus on the cultivar Icatu, white no differences among the others. The occurrence of *Aspergillus niger* did not present any differences among the cultivars. The cultivars processed by the dry via did not present any differences for the fungus *Cladosporium cladosporioides*. The cultivar Icatu, when processed wet via presented decreased occurrence of this fungus differing statistically from the others. The lowest average percentage of occurrence in the pulped samples was not found for all the fungal species detected in the samples. The internal contamination for all the fungal species was significantly less in relation to the external contamination. The internal contamination of the grains by toxigenic fungi was very poor. The occurrence of OTA was verified only on a cultivar

* Guidance Committe: Prof. Dr. Mário Sobral de Abreu – UFLA (Orientador), Dra. Sara Maria Chalfoun de Souza – EPAMIG, Prof.^a Vânia Déa de Carvalho – UFLA.

1 INTRODUÇÃO

O café é um dos poucos produtos agrícolas que recebe valor comercial não apenas pela especulação do mercado, como também de acordo com a qualidade da bebida produzida. Segundo a legislação vigente do Ministério da Agricultura e Reforma Agrária, cafés classificados como estritamente mole ou mole possuem valor agregado 30% superior aos cafés classificados como duro, rio ou riado (Silva,2000).

A cafeicultura, para o país, possibilita a geração de empregos e arrecadações de impostos importantes para a economia nacional. Para que haja a continuidade de lavouras cafeeiras, é necessário produzir e produzir bem, o que significa aumentar produtividade e melhorar a qualidade.

A qualidade do café é determinada comercialmente por características físicas dos grãos e organolépticas da bebida. O desenvolvimento de infecções microbianas nos grãos de café pode comprometer tanto o seu aspecto visual quanto o gosto e aroma. Entre os organismos que compõem a microbiota do café, os fungos filamentosos representam o grupo que pode causar maior dano (Carvalho Chagas e Souza, 1997).

A associação de fungos filamentosos aos grãos de café depende de fatores ambientais da região de cultivo, como umidade, temperatura, época do ano, população do solo e variedade do café cultivado (Silva, 2000).

Diversas pesquisas têm procurado assegurar que a qualidade do café não se perca em nenhuma das etapas de seu processamento, levando a estudos de melhoramento genético em busca de um maior vigor das plantas, associado à máxima produtividade. Várias linhagens de cultivares de café com importantes características produtivas e vegetativas têm sido desenvolvidas.

As diferenças entre as diversas cultivares se restringem a características vegetativas e de produção, no entanto, torna-se necessário conhecer a qualidade de diferentes cultivares, através da avaliação da incidência fúngica e composição química dos grãos, objetivando alcançar melhor qualidade.

A relação entre a qualidade e o germoplasma tem sido identificadas através de características morfológicas, como por exemplo, genótipos com área foliar reduzida, geralmente produzem cafés de boa qualidade, possivelmente influenciada pelo microclima da própria planta. A redução da área foliar promoverá maior aeração, aumentando a penetração de luz, diminuindo conseqüentemente o tempo de amadurecimento e a umidade dos frutos, atenuando a fermentação microbiana que ocorre nos frutos cerejas demasiadamente maduros. (Illy e Viani, 1995).

Outro fator preponderante na qualidade final do produto é o processamento dos grãos. Os grãos de café após colhidos, podem ser processados por via seca (café em coco) ou por via úmida (café despulpado). Segundo Jones e Jones (1984), cafés processados por via seca sempre fornecem bebidas de pior qualidade quando comparados aos cafés processados por via úmida. Dentre os fatores que contribuem para aumentar a qualidade de cafés processados pela via úmida está a menor ocorrência de fungos em frutos cerejas despulpados (Carvalho, 1997).

Além da depreciação qualitativa em grãos de café, fungos associados aos grãos podem produzir micotoxinas, substâncias tóxicas altamente nocivas à saúde humana.

No café a toxina de maior ocorrência é a ocratoxina A (OTA), sendo produzida por fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* (Moss, 1998). Em recente encontro entre países produtores e consumidores de café, discutiu-se a situação atual da OTA em grãos de café verdes, sendo sugerido, pelas autoridades reguladoras da União Européia (EU), o limite de 5 ppb. Este limite

estabelecido poderá provocar a rejeição de grande quantidade de café verde importada, refletindo diretamente na economia dos países produtores.

Entretanto, deve-se considerar que o desenvolvimento de fungos toxigênicos, e conseqüente, produção de metabólitos tóxicos, depende de vários fatores, dentre eles a variedade de café cultivada e a forma como o café é processado (Illy e Viani, 1995; Carvalho, 1997; Silva, 2000)

Neste sentido, este trabalho objetiva verificar a contaminação interna e externa dos fungos associados aos grãos, detectar a ocorrência de ocratoxina A de café em diferentes cultivares, processadas por via seca e úmida.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Caracterização do Experimento

Foram avaliadas 5 cultivares de café da espécie *Coffea arabica* L., cultivadas na área de produção de sementes da Fazenda Experimental da EPAMIG, localizadas no município de Lavras, MG (Tabela 1).

O sistema de cultivo adotado foi o de livre crescimento. As condições de cultivo foram as recomendadas para a cultura do cafeeiro na região, sendo que todas as plantas foram conduzidas sob as mesmas condições de manejo.

Todas as cultivares receberam pulverização com fungicida para o controle da ferrugem, exceto a cultivar "Icatu Amarelo".

Realizou-se a colheita quando 80% dos grãos atingiram o estágio de maturação cereja.

Foram colhidos 30 quilos de café, da safra 1998/1999, de cada cultivar, constituindo as amostras analisadas.

TABELA 1 Cultivares e linhagens de Café (*Coffea arabica* L.) provenientes da Fazenda Experimental da EPAMIG, no município de Lavras-MG. UFLA, Lavras, 2000

Cultivar	Linhagem	Espaçamento	Ano de Instalação da lavoura
Acaiá Cerrado	MG 1474	3,0 x 0,7	1996
Mundo Novo	IAC379/19	4,0 x 0,9	1993
Icatú Amarelo	IAC 2944	3,8 x 0,8	1993
Catuaí Amarelo	IAC-62	4,0 x 0,8	1993
Rubi	MG 1192	3,0 x 0,8	1995

Metade da amostra coletada foi processada via úmida, na qual se retirou a casca do fruto maduro através de um descascador mecânico, seguida pela fermentação da mucilagem e lavagem dos grãos. Após a retirada da mucilagem, os grãos foram conduzidos ao terreiro para a secagem. A outra metade foi preparada por via seca, ou seja, os frutos foram colocados para secagem em terreiro de concreto, imediatamente após a colheita.

Os grãos permaneceram no terreiro até atingirem o teor de umidade de aproximadamente 12%, totalizando 20 dias. Após obtenção do teor de umidade adequado, os grãos foram beneficiados, acondicionados em sacos de papel duplo e armazenados no laboratório de Controle de enfermidades de plantas do Departamento de Fitopatologia da UFLA, até a realização das análises.

2.2 Exteriorização dos fungos nos grãos de café

Para verificação dos fungos associados aos grãos utilizou-se a técnica *Blotter Test* (Tempe, 1963), que consiste na distribuição dos grãos em placas de Petri de 15 cm de diâmetro, contendo três folhas de papel de filtro previamente esterilizadas e umedecidas em água destilada e esterilizada, para posterior incubação. Segundo Samsom et al., (1995), o plaqueamento direto tem sido considerado a técnica mais efetiva para análise de fungos em alimentos como grãos e castanhas.

Das amostras beneficiadas de cada cultivar, processadas tanto pela via seca quanto pela úmida, foram retirados 100 grãos aleatoriamente, para posterior distribuição, em condições assépticas, de 25 grãos por placa, conforme a técnica *Blotter Test*. Cada placa com 25 grãos foi considerada uma repetição.

Após plaqueamento, os grãos foram incubados a $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ em câmara com fotoperíodo de 12 horas de luz negra (comprimento de onda próximo a ultravioleta) durante oito dias, até a exteriorização e desenvolvimento dos fungos (Mazzani, 1994).

A micoflora associada aos grãos foi avaliada em todas as cultivares, processadas por via seca e úmida, através do exame criterioso de cada grão, individualmente, em microscópio estereoscópio, após oito dias de incubação. Em alguns casos a identificação foi confirmada pela visualização das estruturas morfológicas dos fungos em microscópio óptico.

2.3 Detecção de Ocratoxina A

Foram coletados 30 Kg de frutos de cada cultivar, sendo colhidos aleatoriamente na lavoura, em diversos pontos. Posteriormente retirou-se 1 Kg de cada amostra de café verde beneficiado, constituindo as sub-amostras, que após moídas, foram devidamente homogeneizadas para a retirada de 50 g para a realização da análise.

As análises foram realizadas no Laboratório de Micotoxina, do Ministério de Agricultura e Abastecimento, conforme métodos analíticos de referência para análise de micotoxinas em produtos e subprodutos e derivados de origem vegetal, publicados no diário Oficial de 1999. Os procedimentos analíticos desta metodologia foram baseados nos descritos pela AOAC (1990) e Nakajima (1990).

A metodologia utilizada para a determinação da OTA foi Cromatografia líquida de alta eficiência, com limite de detecção de 00,1 ng/g, sendo realizada em triplicata.

2.4 Análise estatística

Para análise dos fungos associados aos grãos, utilizou-se o delineamento experimental em blocos casualizados, constando de 4 blocos, em esquema fatorial 5X2X2, sendo as combinações entre as 5 cultivares, processadas por via seca e úmida, e desinfecção superficial dos grãos com hipoclorito de sódio a 1%.

A análise estatística foi realizada utilizando-se o procedimento GLM do sistema estatístico SAS® (Sas Institute, 1992)

Foi realizada análise de variância para cada fungo detectado, nas diferentes cultivares e diferentes vias de processamento.

Os testes de comparação de médias foram realizados pelo teste Tukey ($P \leq 0.05$). Os dados foram previamente transformados em $\sqrt{x + 0,5}$, antes de serem submetidos à análise de variância, em razão de não ter havido normalidade e/ou homogeneidade dos erros.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Micoflora associada aos grãos

3.1.1 Contaminação dos grãos de café por *Fusarium* spp

Os resultados referentes à incidência do fungo *Fusarium semitectum* e *Fusarium equiseti*, detectados em amostras de cafés beneficiados, em diferentes cultivares, processadas pelas vias secas e úmidas, e associados aos grãos externa e internamente, estão apresentados nas tabelas 2, 3, 4 e 5.

Verificou-se a ocorrência do fungo *Fusarium semitectum* apenas na cultivar Mundo Novo, tanto para as amostras despulpadas quanto para as amostras de café em coco; observa-se também que a via de processamento não influenciou na incidência deste fungo.

O fungo *Fusarium equiseti* foi detectado nas demais cultivares, nas duas vias de processamento, não sendo, entretanto, verificado na cultivar Mundo Novo.

Fungos do gênero *Fusarium* têm sido detectados em grãos de café em vários trabalhos (Carvalho et al., 1989; Meirelles, 1990; Alves, 1996; Freitas, 2000); no entanto, a maioria dos trabalhos não referencia a espécie em questão, nem a cultivar avaliada.

Freitas (2000), trabalhando com amostras de café beneficiado de diversos municípios da região Sul de Minas Gerais, verificou que as lavouras de Catuaí e Icatu tiveram índices de severidade de contaminação por *Fusarium* sp. menores que nas lavouras formadas por outras cultivares, sugerindo que a incidência fúngica ocorre de forma diferenciada nas diferentes cultivares.

Neste estudo, as cultivares Catuaí e Icatu, apresentaram porcentagem média de ocorrência externa em tomo de 80 % e 4 % de ocorrência interna,

entretanto, não foram verificadas diferenças significativas ($P \leq 0.05$) entre estas cultivares e as demais (Tabelas 4 e 5).

TABELA 2 Incidência (porcentagem média de ocorrência) do fungo *Fusarium semitectum* em grãos de café processados por via seca e úmida, em diferentes cultivares UFLA –Lavras/MG, 2000.

Cultivares	Em coco	Despolpado
Acaia	0,0 a A	0,0 a A
Mundo Novo	83,0 b A	97,0 b A
Icatu	0,0 a A	0,0 a A
Catuai	0,0 a A	0,0 a A
Rubi	0,0 a A	0,0 a A

Médias com a mesma letra, maiúscula nas linhas e minúscula nas colunas, são estatisticamente iguais pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

TABELA 3 Incidência (porcentagem média de ocorrência) do fungo *Fusarium semitectum* em grãos de café desinfetados com hipoclorito de sódio, processados por via seca e úmida, em diferentes cultivares UFLA –Lavras/MG, 2000.

Cultivares	Em coco	Despolpado
Acaia	0,0 a A	0,0 a A
Mundo Novo	3,0 a A	2,0 a A
Icatu	0,0 a A	0,0 a A
Catuai	0,0 a A	0,0 a A
Rubi	0,0 a A	0,0 a A

Médias com a mesma letra, maiúscula nas linhas e minúscula nas colunas, são estatisticamente iguais pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

TABELA 4 Incidência (porcentagem média de ocorrência) do fungo *Fusarium equiseti* em grãos de café processados por via seca e úmida, em diferentes cultivares UFLA –Lavras/MG, 2000.

Cultivares	Em coco	Despoldado
Acaía	57,0 a A	66,0 a A
Mundo Novo	0,0 b A	0,0 b A
Icatu	87,0 a A	74,0 a A
Catuaí	77,0 a A	76,0 a A
Rubi	74,0 a A	99,0 a A

Médias com a mesma letra, maiúscula nas linhas e minúscula nas colunas, são estatisticamente iguais pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

TABELA 5 Incidência (porcentagem média de ocorrência) do fungo *Fusarium equiseti* em grãos de café desinfetados com hipoclorito de sódio, processados por via seca e úmida, em diferentes cultivares UFLA –Lavras/MG, 2000.

Cultivares	Em coco	Despoldado
Acaía	4,0 a A	1,0 a A
Mundo Novo	0,0 a A	0,0 a A
Icatu	2,0 a A	3,0 a A
Catuaí	3,0 a A	1,0 a A
Rubi	4,0 a A	1,0 a A

Médias com a mesma letra, maiúscula nas linhas e minúscula nas colunas, são estatisticamente iguais pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Várias espécies de *Fusarium* são relatadas associadas à cultura do cafeeiro. Em germinadores e viveiro, no estágio “palito de fósforo”, têm sido relatadas as espécies de *F.solani*, *F.oxysporum*, *F. equiseti*, *F.moniliforme* e

F. semitectum. Estas espécies mostraram-se patogênicas às cultivares de Catuaí e Mundo Novo. Portanto, são várias as espécies de *Fusarium* que podem atacar o cafeeiro desde a fase de viveiro, de crescimento das plantas no campo até a de frutificação (Zambolim et al., 1999).

Além dos sintomas causados por fungos deste gênero nos diversos órgãos das plantas, sintomas de *fusariose* têm sido também observados no pedúnculo dos frutos tipo cereja. Inicialmente, há um apodrecimento dos pedúnculos, que adquirem coloração pardo-escuro. Posteriormente, a lesão atinge todo o fruto, secando-o totalmente, até a abscisão. Os frutos podem ser atacados em todos os estádios, sendo os maiores danos causados quando o fruto em formação é atingido. No entanto, espécies do gênero *Fusarium* podem ser isoladas de frutos, principalmente no estágio cereja, sem que os sintomas sejam observados (Zambolim et al., 1999).

Neste estudo, não se observou sintoma em nenhuma das cultivares avaliadas, entretanto o fungo estava presente nas amostras de café. Como não foram detectados sintomas de fusariose nas plantas das quais foram coletadas as amostras, supõe-se que os frutos tenham sido infectados por tubos germinativos de conídios recém-germinados do fungo, disseminados pelo vento, respingos de chuva ou insetos.

Acredita-se que, nas condições deste estudo, a ocorrência do fungo *Fusarium semitectum* apenas na cultivar Mundo Novo possa ser explicada pela contaminação da lavoura, desta cultivar, casualmente apenas por conídios deste fungo, e não por alguma característica inerente a esta cultivar.

3.1.2 Contaminação dos grãos de café por *Penicillium* spp

Os resultados referentes à porcentagem de ocorrência dos fungos *P.variable*, *P.rugulosum* e *P.funiculosum* em grãos de café cru beneficiado,

desinfestados ou não com hipoclorito de sódio a 1%, de cultivares distintas, processadas por via seca e úmida estão apresentados nas tabelas 6 a 11.

TABELA 6 Incidência (porcentagem média de ocorrência) do fungo *P.rugulosum* em grãos de café processados por via seca e úmida, em diferentes cultivares UFLA –Lavras/MG, 2000.

Cultivares	Em coco	Despolpado
Acaía	0,0 a A	0,0 a A
Mundo Novo	0,0 a A	0,0 a A
Icatu	0,0 a A	0,0 a A
Catuai	0,0 a A	0,0 a A
Rubi	82,0 b A	49,0 b B

Médias com a mesma letra, maiúscula nas linhas e minúscula nas colunas, são estatisticamente iguais pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

TABELA 7 Incidência (porcentagem média de ocorrência) do fungo *Penicillium rugulosum* em grãos de café desinfestados com hipoclorito de sódio, processados por via seca e úmida, em diferentes cultivares UFLA –Lavras/MG, 2000.

Cultivares	Em coco	Despolpado
Acaía	0,0 a A	0,0 a A
Mundo Novo	0,0 a A	0,0 a A
Icatu	0,0 a A	0,0 a A
Catuai	0,0 a A	0,0 a A
Rubi	3,0 a A	1,0 a A

Médias com a mesma letra, maiúscula nas linhas e minúscula nas colunas, são estatisticamente iguais pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

TABELA 8 Incidência (porcentagem média de ocorrência) do fungo *P. funiculosum* em grãos de café processados por via seca e úmida, em diferentes cultivares UFLA –Lavras/MG, 2000.

Cultivares	Em coco	Despolpado
Acaía	0,0 a A	0,0 a A
Mundo Novo	0,0 a A	0,0 a A
Icatu	79,0 b A	90,0 b A
Catuai	0,0 a A	0,0 a A
Rubi	0,0 a A	0,0 a A

Médias com a mesma letra, maiúscula nas linhas e minúscula nas colunas, são estatisticamente iguais pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

TABELA 9 Incidência (porcentagem média de ocorrência) do fungo *P. funiculosum* em grãos de café, desinfestados com hipoclorito de sódio, processados por via seca e úmida, em diferentes cultivares UFLA –Lavras/MG, 2000.

Cultivares	Em coco	Despolpado
Acaía	0,0 a A	0,0 a A
Mundo Novo	0,0 a A	0,0 a A
Icatu	4,0 a A	3,0 a A
Catuai	0,0 a A	0,0 a A
Rubi	0,0 a A	0,0 a A

Médias com a mesma letra, maiúscula nas linhas e minúscula nas colunas, são estatisticamente iguais pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

TABELA 10 Incidência (porcentagem média de ocorrência) do fungo *P. variable* em grãos de café processados por via seca e úmida, em diferentes cultivares UFLA -Lavras/MG, 2000.

Cultivares	Em coco	Despoldado
Acaía	95,0 a A	96,0 a A
Mundo Novo	72,0 a b A	30,0 a B
Icatu	0,0 c A	0,0 c A
Catuai	37,0 b A	54,0 a b B
Rubi	0,0 c A	0,0 c A

Médias com a mesma letra, maiúscula nas linhas e minúscula nas colunas, são estatisticamente iguais pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

TABELA 11 Incidência (porcentagem média de ocorrência) do fungo *P. variable* em grãos de café, desinfectados com hipoclorito de sódio, processados por via seca e úmida, em diferentes cultivares UFLA -Lavras/MG, 2000.

Cultivares	Em coco	Despoldado
Acaía	3,0 a A	2,0 a A
Mundo Novo	2,0 a A	4,0 a A
Icatu	0,0 a A	0,0 a A
Catuai	4,0 a A	4,0 a A
Rubi	0,0 a A	0,0 a A

Médias com a mesma letra, maiúscula nas linhas e minúscula nas colunas, são estatisticamente iguais pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Diversos trabalhos evidenciam a associação do gênero *Penicillium* sp em grãos café beneficiado (Meirelles, 1990; Alves e Castro, 1993; Alves, 1996). Recentemente, Freitas (2000) identificou as espécies *P. brevicompactum*,

P.citrinum, *P.viridicatum* e *P. verrucosum* associadas a grãos de café beneficiado de diversos municípios da região Sul de Minas Gerais; entretanto, no presente trabalho não foi detectada nenhuma das espécies relatadas por este autor, sugerindo que várias espécies de *Penicillium* podem estar associadas aos grãos de café. No mesmo trabalho, o autor observou que os valores médios do índice de severidade de contaminação pelas espécies de *Penicillium* foram mais elevados nas lavouras de Catuaí e Icatu. Neste estudo, a cultivar Icatu foi a única em que foi verificada a ocorrência de *P.funiculosum*, já a cultivar Catuaí apresentou menor incidência de *P.variable*, diferindo estatisticamente ($P \leq 0,05$) das demais.

Pode-se observar que o fungo *P. rugulosum* apareceu apenas na cultivar Rubi, já o fungo *P.funiculosum* foi identificado na cultivar Icatu e nas demais cultivares verificou-se a ocorrência de *P. variable*.

O gênero *Penicillium* é enquadrado no grupo de fungos denominados fungos de armazenamento, ou seja, é responsável pela invasão e deterioração das sementes e grãos armazenados. Os fungos classificados neste grupo são capazes de atuar sobre sementes ou grãos em atmosfera relativamente seca, desfavorável aos fungos de campo (Neergarrd, 1977; Berjak, 1987). Esses fungos são adaptados a ambientes com baixa umidade e podem crescer em qualquer matéria orgânica que contenha grau de umidade em equilíbrio com a umidade do ambiente entre 65 e 90%. Estes fungos são difundidos em quase todo o mundo e estão entre os mais bem sucedidos e abundantes organismos vivos, sendo responsáveis por contaminações quase que inevitáveis em grãos armazenados (Christensen, 1973).

Alguns pesquisadores consideram que os fungos de armazenamento ocorrem apenas durante esse período, não estando presentes em grãos recém colhidos ou que, se presentes, estão em quantidade reduzida (Christensen, 1963; Kennedy, 1964; Christensen, 1973). Nas condições deste estudo, os fungos do

gênero *Penicillium* possivelmente se associaram aos grãos ainda no campo, já que o procedimento para exteriorização deste fungos foi realizado logo após a colheita. Estes fungos podem estar associados aos grãos na forma de micélio dormente, e quando encontram condições favoráveis, germinam.

Diferentes espécies do gênero *Penicillium* se encontram associadas a cultivares distintas. A própria arquitetura morfológica da planta, como os ramos secundários mais ou menos abundantes, ou uniformidade na maturação dos frutos, pode ter exercido influência direta ou indireta na associação de espécies fúngicas adaptadas em maior ou menor grau a determinadas condições.

Através da análise dos resultados obtidos neste trabalho, pode-se verificar que houve diferença estatisticamente significativa na incidência de *Penicillium* spp. das amostras processadas pelas vias seca e úmida. Para *P. rugulosum*, verificou-se que as amostras da cultivar Rubi despulpada apresentou menor incidência deste fungo. A cultivar Mundo Novo também apresentou menor incidência de *P. variable* no café processado via úmida, entretanto o mesmo não foi verificado para a cultivar Catuai.

Os resultados observados no presente estudo discordam daqueles obtidos por Carvalho (1997), segundo o qual o despulpamento reduziu significativamente a ocorrência dos fungos.

3.1.3 Contaminação dos grãos de café por *Aspergillus* spp

A porcentagem média de ocorrência de *Aspergillus ochraceus* não diferiu estatisticamente entre as cultivares avaliadas, no café processado pela via seca; no entanto, a cultivar Icatu apresentou incidência de 50%, diferindo das demais ($P \leq 0.05$) nas amostras de café despulpado (Tabela 12). A contaminação interna deste fungo não diferiu entre as cultivares (Tabela 13).

A incidência do fungo *Aspergillus niger* também não apresentou variações significativas ($P \leq 0.05$) entre as cultivares (Tabelas 14 e 15).

TABELA 12 Incidência (porcentagem média de ocorrência) do fungo *Aspergillus ochraceus* em grãos de café, processados por via seca e úmida, em diferentes cultivares UFLA –Lavras/MG, 2000.

Cultivares	Em coco	Despolpado
Acaía	18,0 a A	17,0 a A
Mundo Novo	9,0 a A	5,0 a A
Icatu	8,0 a A	50,0 b B
Catuaí	12,0 a A	14,0 a A
Rubi	16,0 a A	19,0 a A

Médias com a mesma letra, maiúscula nas linhas e minúscula nas colunas, são estatisticamente iguais pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

TABELA 13 Incidência (porcentagem média de ocorrência) do fungo *Aspergillus ochraceus* em grãos de café, desinfectados com hipoclorito de sódio processados por via seca e úmida, em diferentes cultivares UFLA –Lavras/MG, 2000.

Cultivares	Em coco	Despolpado
Acaía	3,0 a A	1,0 a A
Mundo Novo	1,0 a A	2,0 a A
Icatu	2,0 a A	3,0 a A
Catuaí	2,0 a A	4,0 a A
Rubi	4,0 a A	3,0 a A

Médias com a mesma letra, maiúscula nas linhas e minúscula nas colunas, são estatisticamente iguais pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

TABELA 14 Incidência (porcentagem média de ocorrência) do fungo *Aspergillus niger* em grãos de café, processados por via seca e úmida, em diferentes cultivares UFLA –Lavras/MG, 2000.

Cultivares	Em coco	Despoldado
Acaia	2,0 a A	0,0 a A
Mundo Novo	4,0 a A	0,0 a A
Icatu	2,0 a A	3,0 a A
Catuai	12,0 a A	5,0 a A
Rubi	2,0 a A	0,0 a A

Médias com a mesma letra, maiúscula nas linhas e minúscula nas colunas, são estatisticamente iguais pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

TABELA 15 Incidência (porcentagem média de ocorrência) do fungo *Aspergillus niger* em grãos de café, desinfetados com hipoclorito de sódio, processados por via seca e úmida, em diferentes cultivares UFLA –Lavras/MG, 2000.

Cultivares	Em coco	Despoldado
Acaia	1,0 a A	1,0 a A
Mundo Novo	1,0 a A	0,0 a A
Icatu	0,0 a A	0,0 a A
Catuai	0,0 a A	1,0 a A
Rubi	0,0 a A	0,0 a A

Médias com a mesma letra, maiúscula nas linhas e minúscula nas colunas, são estatisticamente iguais pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Avaliando amostras de café provenientes de diversas regiões do Sul de Minas Gerais, incluindo Lavras, Freitas (2000) observou diferenças entre as cultivares utilizadas quanto ao índice de contaminação para os fungos

A.ochraceus e *A.niger*, sendo mais elevados nas lavouras de Catuai e Icatu. Neste estudo, apenas a cultivar Icatu diferiu das demais; entretanto, isto só foi observado nas amostras de café despulpadas.

Aspergillus niger e *Aspergillus ochraceus* são descritos em vários relatos associados ao café (Carvalho et al., 1989; Meirelles, 1990; Alves e Castro, 1993; Freitas, 2000). Este trabalho confirma a ocorrência destes fungos nos grãos de café em diferentes cultivares.

Os fungos do gênero *Aspergillus* também são caracterizados pela habilidade em crescer em tecidos relativamente secos de grãos e sementes. Estes fungos são xerofílicos, ou seja, adaptados a ambientes com baixa umidade relativa do ar (Christensen e Lopes, 1963). Os saprófitas e oportunistas, como *Aspergillus ochraceus*, podem tomar-se ativos mesmo em sementes e grãos com umidade abaixo de 13% (Berjak, 1987). Em uma sucessão crescente de teores de água, várias espécies de *Aspergillus* mais xerofílicas se manifestam, e aumentam o grau de umidade e temperatura do grão em função de sua atividade metabólica, desta forma, os fungos menos xerofílicos, porém mais agressivos, se estabelecem em detrimento dos xerofílicos (Mycock e Berjak, 1995).

Cafés processados por via seca geralmente fornecem bebidas de pior qualidade quando comparados aos cafés processados por via úmida (Jones e Jones, 1984). A qualidade do café por este processo depende das condições climáticas locais, no período de colheita e secagem (Lacerda et al., 1985). Na ausência de insolação e alta umidade do ar, os microorganismos têm favorável ambiente para o seu desenvolvimento, produzindo metabólitos que afetam a qualidade final através da difusão destes da polpa para a semente (Carvalho, 1997). Com o despulpamento, a intensidade de ocorrência dos microorganismos associados aos grãos diminui significativamente. Neste estudo, porém, isto não foi verificado, já que a ocorrência deste fungo não diferiu significativamente quando as amostras foram processadas por via seca e úmida em quatro das

cultivares avaliadas. A cultivar Icatu apresentou maior valor médio de porcentagem de ocorrência deste fungo na amostra de café despulpada, sugerindo, portanto, que outros fatores, além do despulpamento, influenciam na ocorrência deste fungo. Dentre os fatores que possivelmente influenciaram a maior incidência deste fungo no café despulpado, está a menor ocorrência do fungo *Cladosporium* na amostra desta cultivar. Milsivic, Bruce e Gibson (1983) relata haver um efeito inibitório exercido por certos fungos em detrimento de outros, esta inibição pode ser atribuída à presença alguns metabólitos estáveis produzidos por certos fungos. Neste estudo alta ocorrência de *Cladosporium* nas amostras pode ter inibido o desenvolvimento do *A.ochraceus*. (Figura 1)

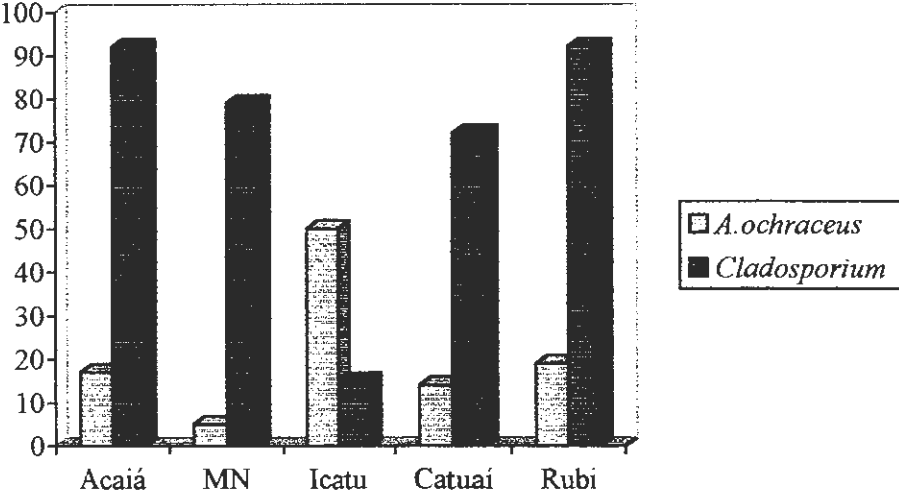


FIGURA 1 Incidência dos fungos *Aspergillus ochraceus* e *Cladosporium* sp em amostras de café despulpado em diferentes cultivares. UFLA, Lavras/MG, 2000.

3.1.4 Contaminação dos grãos de café por *Cladosporium cladosporioides*

Os resultados referentes à incidência do fungo *Cladosporium cladosporioides* nas amostras desinfectadas e não desinfectadas com hipoclorito de sódio 1%, em diferentes cultivares, processadas por via seca e úmida, estão apresentados nas Tabelas 16 e 17.

Verificou-se que nos grão processados pela via seca, não houve diferenças significativas ($P \leq 0,05$) na incidência deste fungo, nas diferentes cultivares. Nas amostras de café despulpado, apenas a cultivar Icatu diferiu das demais, apresentando menor ocorrência média deste fungo. Nas amostras de café desinfestadas com hipoclorito de sódio, também não foram detectadas diferenças estaticamente significativas entre as cultivares, nas duas vias de processamento.

O fungo *Cladosporim* sp. é citado em vários trabalhos associado aos grão de café (Meirelles, 1990; Alves e Castro, 1993; Alves, 1996); entretanto, nenhum trabalho relaciona a ocorrência deste fungo em diferentes cultivares.

TABELA 16 Incidência (porcentagem média de ocorrência) do fungo *Cladosporium cladosporioides* em grãos de café, processados por via seca e úmida, em diferentes cultivares UFLA –Lavras/MG, 2000.

Cultivares	Em coco	Despulpado
Acaía	87,0 a A	92,0 a A
Mundo Novo	92,0 a A	79,0 a A
Icatu	92,0 a A	15,0 b B
Catuai	86,0 a A	86,0 a A
Rubi	87,0 a A	92,0 a A

Médias com a mesma letra, maiúscula nas linhas e minúscula nas colunas, são estatisticamente iguais pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

TABELA 17 Incidência (porcentagem média de ocorrência) do fungo *Cladosporium cladosporioides* em grãos de café, desinfestados com hipoclorito de sódio, processados por via seca e úmida, em diferentes cultivares UFPA –Lavras/MG, 2000.

Cultivares	Em coco	Despolpado
Acaia	3,0 a A	2,0 a A
Mundo Novo	3,0 a A	2,0 a A
Icatu	5,0 a A	4,0 a A
Catuai	4,0 a A	3,0 a A
Rubi	4,0 a A	1,0 a A

Médias com a mesma letra, maiúscula nas linhas e minúscula nas colunas, são estatisticamente iguais pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Carvalho (1997) relata que a elevada presença deste fungo em frutos nos diversos estádios de amadurecimento, entretanto com o despulpamento dos frutos “cerejas”, a intensidade de ocorrência destes fungos diminui significativamente. Neste estudo, esta redução só foi observada na cultivar Icatu, evidenciando que outros fatores, além da via de processamento utilizada, influenciam a redução da porcentagem média de ocorrência deste fungo.

3.2 Comparação entre grãos desinfestados e não desinfestados

A comparação entre os dados de cada fungo estudado está apresentada na Tabela 18, considerando que a desinfestação e não desinfestação dos grãos de cafés amostrados é essencial para se conhecer a contaminação do ambiente de produção e processamento do café, assim como a intensidade de infestação de cada fungo.

TABELA 18 Incidência de fungos associados aos grão de café processados por via seca, em diferentes cultivares. UFLA, Lavras/MG, 2000

Cultivares	<i>Fusarium semitectum</i>		<i>Fusarium equiseti</i>		<i>Penicillium rugulosum</i>		<i>Penicillium variable</i>		<i>Penicillium funiculosum</i>		<i>Aspergillus ochraceus</i>		<i>Aspergillus niger</i>		<i>Cladosporium</i>	
	ND	D	ND	D	ND	D	ND	D	ND	D	ND	D	ND	D	ND	D
Acaia	0 A	0 A	57 A	4 B	0 A	0 A	95 A	3 B	0 A	0 A	18 A	3 B	2 A	1 A	87 A	2 B
MN	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	72 A	2 B	0 A	0 A	9 A	1 A	4 A	0 A	92 A	2 B
Icatu	83 A	3 B	87 A	2 B	0 A	0 A	0 A	0 B	79 A	4 B	8 A	2 A	2 A	0 A	92 A	4 B
Catuaf	0 A	0 A	77 A	3 B	0 A	0 A	37 A	4 B	0 A	0 A	12 A	2 A	12 A	1 A	86 A	3 B
Rubi	0 A	0 A	74 A	4 B	82 A	4 B	0 A	0 A	0 A	0 A	16 A	4 A	2,0 A	0 A	87 A	1 B

97

Médias mesma letra na linha, para cada fungo, são estatisticamente iguais pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$)

D- grãos desinfetados com NaOCl a 1%

ND – grãos desinfetados com NaOCl a 1%

Os fungos *A.niger* e *A.ochraceus* são saprófitas e oportunistas (Samson et al., 1995), necessitando, portanto, de condições favoráveis para que possam infectar o interior dos grãos. Na tabela 18 observa-se que a contaminação externa aos grãos é significativamente maior que a interna; no entanto, apesar de reduzida porcentagem média de ocorrência, verificou-se a contaminação interna de todos os fungos detectados.

Considerando que o limite de tolerância de infecção interna dos grãos de café é de 5%, Freitas (2000) observa-se que, nas condições deste estudo, todas as cultivares avaliadas têm um excelente padrão, sendo que a qualidade do café nestas cultivares possivelmente não será comprometida pela presença de fungos filamentosos normalmente associados externamente aos grãos.

3.3 Detecção de ocratoxina A

Das espécies fúngicas detectadas nas diferentes cultivares analisadas, nas duas vias de processamento utilizadas, apenas os fungos *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus niger* e *Penicillium variable* são citados como produtores de OTA (Sturder-Rohr et al., 1995; Pittet et al., 1996; Scussel, 1998)

Pelos resultados apresentados na tabela 3, podemos verificar a ocorrência da ocratoxina A em apenas uma cultivar analisada, em concentrações bem abaixo do limite proposto para o café pela União Européia, apesar da constatação da ocorrência do fungo *P. variable* externamente ter sido de 96%, nas amostras da cultivar Acaia processada via úmida, e 50% de contaminação externa do fungo *Aspergillus ochraceus* nas amostras despulpadas da cultivar Icatu. Não se detectou a ocorrência de OTA nestas cultivares, sugerindo que a associação de espécies toxigênicas externamente aos grãos não implica na síntese deste metabólito (Tabela 19 e Figuras 2,3).

TABELA 19. Ocorrência de OTA em diferentes cultivares de café beneficiado, processado por via seca e úmida (café – despolpado/D). UFLA, Lavras/MG 2000.

Cultivar	µg/Kg
Acaiaá	ND
Catuai	ND
Icatú	ND
Mundo Novo	ND
Rubi	ND
Acaiaá / D	ND
Catuai / D	ND
Icatú /D	ND
Mundo Novo /D	ND
Rubi /D	1.86

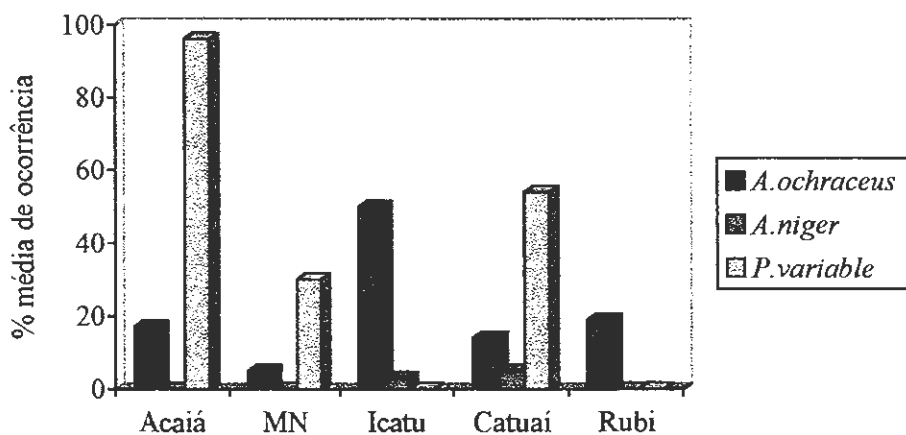


FIGURA 2 Incidência (porcentagem média de ocorrência) externa dos fungos produtores de OTA em amostras de café cru despolpado, em diferentes cultivares. UFLA, Lavras/MG, 2000.

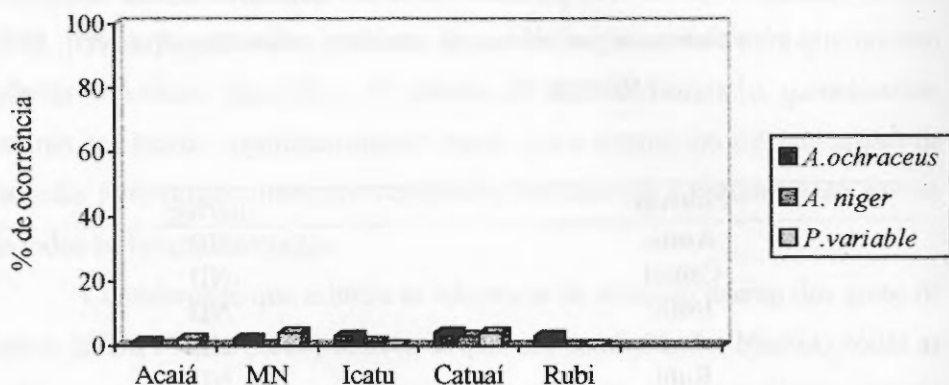


FIGURA 3 Incidência (porcentagem média de ocorrência) interna dos fungos produtores de OTA em amostras de café verde despulpado, em diferentes cultivares. UFLA, Lavras/MG,2000.

Estes resultados confirmam que a ocorrência e a concentração desta toxina é dependente de vários fatores (Scussel, 1998; Petracco, 1999; Chalfoun, Pereira e Angélico, 2000), entre eles destaca-se a composição química dos grãos, já que certas substâncias, como a cafeína, podem inibir substancialmente a produção de micotoxinas (Buchanan, Harry e Gealt, 1983). Micco et al. (1992) citam que a cafeína pode atuar como agente protetor contra a produção de aflatoxina B1 em grãos de café, mesmo em condições climáticas favoráveis ao crescimento do fungo produtor. O mesmo pode ter ocorrido para OTA nas condições deste estudo.

Chalfoun, Pereira e Angélico (2000) relatam que a cafeína pode exercer uma atividade biológica contra vários fungos, inclusive os toxigênicos. Neste trabalho, a contaminação interna foi acentuadamente inferior à contaminação externa do grão. Este fato sugere que a cafeína pode ter exercido um efeito

inibidor no desenvolvimento destes fungos, inibindo a infecção do grão contaminado e, conseqüentemente, a produção de OTA.

Levantamentos realizados em amostras de café para a detecção da ocorrência de micotoxinas demonstraram que a freqüência de contaminação é baixa e, quando a toxina é encontrada, o nível de contaminação é baixo (Tsubouchi et al., 1987; Levi, 1990; Mantle e Chow, 2000). Estes relatos confirmam o que foi verificado neste estudo.

A baixa ocorrência interna dos fungos toxigênicos, verificada neste estudo, não confirma alguns relatos, os quais indicam alta contaminação interna em amostras de café, sendo também detectado OTA em níveis superiores aos propostos pela União Européia (Truckess et al., 1999; Urbano et al., 2000; Leoni et al., 2000). A alta porcentagem de ocorrência destes fungos relatada nestes trabalhos sugere que outros fatores, além da composição do substrato, podem influir na ocorrência de fungos toxigênicos e conseqüente produção de toxinas.

Dentre os fatores que favorecem o desenvolvimento fúngico, ressaltam-se temperatura, predomínio de linhagens toxigênicas, competição do substrato, competição microbiana e cultivares resistentes. Scussel (1998) cita que as variedades de grãos com pericarpo mais resistente à invasão por fungos apresentam maior resistência à penetração e proliferação destes e, conseqüentemente, a produção de micotoxinas é dificultada ou suprimida.

Neste estudo, apenas a cultivar Icatu diferiu significativamente das demais quanto à ocorrência do fungo *Aspergillus ochraceus*; no entanto, isto foi verificado apenas para a amostra desta cultivar processada pela via úmida. Pode-se inferir, portanto, que outros fatores, além de características morfológicas inerentes às cultivares, podem influenciar na associação de fungos toxigênicos aos grãos.

4 CONCLUSÕES

Nas condições em que foi desenvolvido este trabalho e com base nos resultados obtidos conclui-se que:

- 1) Foram identificados nas amostras os fungos *Fusarium semitectum* e *Fusarium equiseti*. Entretanto, o fungo *F. semitectum* foi isolado apenas da cultivar Mundo Novo.
- 2) Isolaram-se as espécies *P. funiculosum* apenas nas amostras da cultivar Icatu, *Penicillium rugulosum* apenas nas amostras da cultivar Rubi e *P. variable* nas demais cultivares.
- 3) A ocorrência de *Aspergillus ochraceus* foi verificada em todas as cultivares, não havendo diferenças significativas entre elas nas amostras de café processadas pela via seca. Nas amostras de café despulpado, a incidência deste fungo foi mais elevada na cultivar Icatu.
- 4) A porcentagem média de ocorrência de *Aspergillus niger* não diferiu entre as cultivares despulpadas e em coco.
- 5) Não se verificaram diferenças significativas entre as cultivares processadas pela via seca do fungo *Cladosporium cladosporioides*, entretanto, a cultivar Icatu quando processada via úmida, apresentou menor ocorrência.
- 6) A menor porcentagem média de ocorrência, nas amostras processadas pela via úmida, não foi verificada para todas as espécies fúngicas detectadas nas amostras, das diferentes cultivares.

- 7) A contaminação interna para todas as espécies fúngicas detectadas neste estudo foi significativamente inferior à contaminação externa.

- 8) A contaminação interna dos grãos de café processados pelas vias seca e úmida pelos fungos potencialmente toxigênicos foi muito pequena. A ocorrência de OTA foi verificada em apenas na cultivar Rubi, processada pela via úmida, entretanto em nível bem abaixo do limite proposto pela União Européia.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, E. **População fúngica associada ao café (Coffea arabica L.) beneficiado e às fases pré e pós colheita-relação com a bebida e local de cultivo.** Lavras :UFLA, 1996. 48p. (Dissertação - Mestrado em Fitossanidade).
- ALVES, E.; CASTRO, H. A. de Fungos associados ao café (Coffea arabica L.) e sua relação com a bebida. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 26. 1993, Aracajú, **Resumos...**Brasília: SBF, 1993. p. 329.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMIST. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists.** 15 ed Washington,1990. 2v.
- BERJAK, P. Stored seeds: the problems caused by micro-organims (With particular reference to the fungi) In: NASSER, L.C.; WETZEL,M.N.; FERNANDES, J.M. **Seed pathology: international advance course, proceedings.** Brasilia: Informativo Abrates, 1987. p.38-50.
- BUCHANAN, R. L.; HARRY, M. A.; GEALT, M. A. Caffeine inhibition of steigmatocystin, citrinin, and patulin production. **Journal of Food Science,** Chicago, v.48, p.1226-1228, 1983.
- CARVALHO, V. D. **Cafeicultura empresarial: [produtividade e qualidade - qualidade do café].** Lavras :UFLA/FAEPE, 1997. 73p.
- CARVALHO, V. D.; CHAGAS, S. J. R.; SOUZA, S. M. C. Fatores que afetam a qualidade do café, **Informe Agropecuário,** Belo Horizonte, v.18, n.187, p.5-20, 1997.
- CARVALHO, V.D. de; CHALFOUN, S .M.; COSTA COUTO, A.; CHAGAS, S. J. de R.; VILELA, E. R. Efeito do tipo de colheita e local de cultivo na composição físico-química e química do grão beneficiado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEIEIRAS, 15. 1989, Maringá. **Resumos ...**Rio de Janeiro: MIC/IBC, 1989. p.23-24.

- CHALFOUN, S. M.; PEREIRA, M. C.; ANGÉLICO, C. L. Efeito da cafeína (1,3,7-triethylxantina) sobre o crescimento micelial, de fungos associados ao café. **Revista Brasileira de Armazenamento**, Viçosa, n.1, p.50-53, 2000. Especial.
- CHRISTENSEN, C. M. Loss of viability in storage: microflora. **Seed Science and Technology**, Zürich, v.1, n.3, p.547-562,1973
- CHRISTENSEN, C. M.; LOPEZ, L. C. F. Pathology of storage seeds. **Proceedings of the International Seed Testing Association**, Wageningen, v.28, n.4, p.701-711,1963
- FREITAS, R.F. **Fungos associados a grãos de café (Coffea arabica L.) beneficiado de diversos municípios da Região Sul de Minas Gerais..** Lavras:UFLA, 2000. 71p. (Dissertação - Mestrado em Ciências de Alimentos).
- ILLY, A.; VIANI, R. **Espresso coffee: the chemistry of quality.** San Diego, 1995. 235p.
- KENNEDY, B.W. Moisture content, mold invasion and seed viability of stored soybeans. **Phytopathology**, St.Paul, v.54,n.7,p.771-774, July 1964.
- LEONI, L.A.B.; FURLANI, R. P. Z.; VALENTE SOARES, L. M.; OLIVEIRA, P. L. C.; SAWAZAKI, E. Ochratoxin A in Brazilian green coffee. In: **INTERNATIONAL IUPAC SYMPOSIUM ON MYCOTOXINS AND PHYCOTOXINS. Abstracts...** Guarujá: IUPAC, 2000, p.143.
- LEVI, C. P. Mycotoxins in coffe. **Journal of Association Official Analytical Chemistry**, Washington, v.6, p.1282-1285, 1990.
- JONES, K. L.; JONES, S. E. Fermentations involved in the production of cocoa, coffee, tea. **Progress Industrial Microbiology**, Amsterdam, v.19, p.411-56,1984.

- LACERDA, L. A. O.; MIARELLI, M.; DAVOLI, J. Z.; CARVALHO, R. de; LOPES, I. C.; GUERRA NETO, E. G.; KANASHIRO, J. K.; LUZINI, N. R.; SANTINATO, R.; CORTEZ, J. G.; PAES CAMARGO, A.; TEXEIRA, A. A. Influência dos sistemas de colheita e preparo, na qualidade do café, nas diferentes regiões cafeeiras do Estado de São Paulo - resultados preliminares. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 12., 1985, Caxambu. **Trabalhos apresentados...** Rio de Janeiro: IBC, 1985 p.210-214.
- MANTLE, P. G.; CHOW, A. G. Ochratoxin formation in *Aspergillus ochraceus* with particular reference to spoilage of coffee. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam v.56, p.105-109, 2000.
- MAZZANI, C. Hongos associados a grãos de cereais armazenados em Venezuela. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE MICOTOXICOLOGIA, 1., ENCONTRO NACIONAL DE MICOTOXINAS, 8. 1994, Rio de Janeiro. Anais ... Rio de Janeiro: Editora, 1994. p.58-60.
- MEIRELLES, A. M. A. Ocorrência e controle da microflora associada aos frutos de café (*Coffea arabica* L.) provenientes de diferentes localidades do estado de Minas Gerais. Lavras :UFLA, 1990. (Dissertação – Mestrado em Fitotecnia).
- MICCO, M.; MIRAGLIA, M.; BRERA, C.; DESIDERIO, C.; MASCI, V. The effect of roasting on the fate aflatoxin B1 in artificially contaminated green coffee beans. **Mycotoxin Research**, Mainz, v.8, p.93-97.1992.
- MISLIVEC, P.B.; BRUCE, V R.; GIBSON, R. Incidence of toxigenic and other molds in green coffee beans. **Journal of Food Protection**, Washington, v.46, n.11, p.969-973,1983.
- MOSS, M. O. Recent studies of micotoxins. **Journal Applied Microbiology**, Bedford, v.84, p.622s-676s, 1998. Symposium Supplement.
- MYCOCK, D. J.; BERJAK, P. The implications of seed associated mycoflora during storage. In: KIGEL, J.; GALILI, G. (ed.). **Seeds development and germination**. New York: Marcel Decker, 1995. p.747-766.

- NAKAJIMA, M.; TERADA, H.; HISADA, K.; TSUBOUCHI, H.; YAMAMOTO, K.; UDA, T.; ITOH, Y.; KAWAMURA, O.; UENO, Y. Determination of ochratoxin A in coffee bean and coffee products by monoclonal antibody affinity chromatography. **Food & Agricultural Immunology**, Nagoya, v.2, p.189-195, 1990.
- NEEGAARD, P. **Seed pathology**. 2.ed. London: MacMillan, 1979. 1191p (2v).
- PETRACCO, M. Melhoria da qualidade do café pelo combate ao crescimento de mofo. In: [ENCONTRO SOBRE PRODUÇÃO DE CAFÉ COM QUALIDADE.], 1., 1999, Viçosa, Primeiro... Viçosa:UFV, 1999. p.22-35.
- SAMSON, R. A.; HOEKSTRA, E. S.; FRISVAD, J. C.; FILTENBORG, O. **Introduction to foodborne fungi**. 4.ed. Baam, Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 1995. 332p.
- SAS Institute. **SAS technical report SAS/TAT software: changes and enhancement release 607**. Cary Nc.: SAS Institute, 1992.
- SILVA, C.F. **Diversidade microbiana em grãos de café (*Coffea arabica* L.) processados por via seca nas fases pré e pós colheita**. Lavras: UFLA, 2000. 125p. (Dissertação - Mestrado em Ciências de Alimentos).
- SCUSSEL, V. M. **Micotoxinas em Alimentos**. Florianópolis: Insular, 1998. 144p.
- TEMPE, J. de. The blotter method for seed health testing. **Proceeding International of the Seed Testing Association**. Copenhagen, v.28,n.1, p.133-151, 1963
- TRUCKESS, M. W.; GILER, J.; YOUNG, K.; WHITE, K. D.; PAGE, S. W. Determination and survey of ochratoxin A in wheat, barley, and coffee. **Journal of AOAC International**, Washington, v.8,n.1, p.85-87, 1999.
- TSUBOUCHI, H.; YAMAMOTO, K.; HISADA, K.; SAKABE, Y.; UDAGAWA, S. Effect of roasting on ochratoxin A level in green coffee beans inoculated with *Aspergillus ochraceus*. **Mycopathologia**, The Hague, v.97, p.111-115, 1987.

URBANO, G. R.; TANIWAKI, M. H.; BONES, A. de; LEITÃO, M. F. F.
Incidence of toxigenic fungi and ochratoxin A detection in coffee from three
Brazilian regions. In: INTERNATIONAL IUPAC SYMPOSIUM ON
MYCOTOXINS AND PHYCOTOXINS. Guarujá, 2000.
Abstract...Guarujá: IUPAC, 2000, p.164.

ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R. do; PEREIRA, A. A.; CHAVES, G. M.
Manejo integrado das doenças do cafeeiro. In: [ENCONTRO SOBRE
PRODUÇÃO DE CAFÉ COM QUALIDADE], 1., 1999, Viçosa,
Primeiro... Viçosa:UFV, 1999. p.22-35.

CAPÍTULO 4

INFLUÊNCIA DA POPULAÇÃO FÚNGICA NAS CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DOS GRÃOS CRUS DE CAFÉ (*Coffea arabica* L e *Coffea canephora*) EM DIFERENTES CULTIVARES

RESUMO

PASIN, Liliana Auxiliadora Avelar Pereira **Influência da população fúngica nas características químicas dos grãos crus de café (*Coffea arabica* e *C. canephora*) em diferentes cultivares.** Lavras : UFLA, 2000. 158p (Tese Doutorado em Fitopatologia)*

Este trabalho foi realizado com o objetivo de verificar a influência dos fungos associados aos frutos de café nas características químicas dos grãos crus de *Coffea arabica* L e *Coffea canephora*. Frutos das cultivares “Apoatã,” “Catuaí Amarelo”, “Mundo Novo”, “Acaiá”, “Rubi”, e “Icatú”, provenientes da safra 1998/1999, foram colhidos na fazenda Experimental da EPAMIG, no município de Lavras-MG e São Sebastião do Paraíso-MG, constituindo as diferentes amostras analisadas. Após beneficiamento e secagem, os grãos foram incubados em câmara úmida para exteriorização dos fungos através do método *Blotter test* e submetidos às análises de polifenoloxidase, açúcares totais redutores e não redutores, ácido clorogênico, acidez titulável, lixiviação de potássio, condutividade elétrica e cafeína. Verificou-se a ocorrência dos fungos *Penicillium variable*, *Penicillium rugulosum*, *Penicillium funiculosum*, *Fusarium semitectum*, *F. equiseti*, *Aspergillus ochraceus*, *A. niger*, *Cladosporium cladosporioides* nas diferentes cultivares. Para análise estatística, utilizou-se o procedimento GLM do sistema estatístico SAS, análise de variância com covariáveis, sendo os fungos associados aos grãos os fatores covariáveis quantitativos e as cultivares os fatores qualitativos. Pela análise dos resultados obtidos observou-se que a presença do fungo *Aspergillus ochraceus* reduz a atividade da polifenoloxidase e aumenta os valores de lixiviação de potássio, condutividade elétrica e fenólicos totais. A incidência do fungo *Cladosporium cladosporioides* influenciou nos valores médios de lixiviação de potássio e condutividade elétrica.

* Comitê Orientador: Prof.Dr. Mário Sobral de Abreu – UFLA (Orientador), Dra.Sara Maria Chalfoun de Souza – EPAMIG, Prof. ^a Dra. Vânia Déa de Carvalho – UFLA.

ABSTRACT

PASIN, Liliana Auxiliadora Avelar Pereira. Influence of the fungal populations on the chemical characteristics of the raw coffee (*Coffea arabica* e *C. canephora* L.) grains in different cultivars. Lavras:UFLA, 2000. 158p. (Doctorate thesis in Phytopathology).*

This work was performed with a view at verifying the influence of the fungi associated with coffee fruits on the chemical characteristics of the raw grains of *Coffea arabica* L. The cultivars "Apoatã", "Catuaí Amarelo", "Mundo Novo", "Acaia", "Rubi" and "Icatú" from the 1998/ 1999. Fruits of crop were harvested on the EPAMIG Experiment farm in the town of Lavras – MG and São Sebastião do Paraíso MG, making up the different samples analyzed. After processing and drying, the grains were incubated in wet chamber for fungal exteriorization through the blotter test method and submitted to the analyzes of polyphenoloxidase, total reducing and non-reducing sugars, clorogenic acid, titelable acidity, potassium leaching, electric conductivity and caffeine. The occurrence of the fungi *Penicillium variable*, *Penicillium rugulosum*, *Penicillium funiculosum*, *Fusarium equiseti*, *Fusarium semitectum*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus niger* and *Cladosporium cladosporioides* in the different cultivars. For statistical analysis, the GLM procedure of SAS statistic system, analysis of variance with co-variables was employed, the fungi associated with the grains being the quantitative covariable factors and the cultivars the quanlitative factors. From the analysis of the results obtained, it was observed that the presence of the fungus *Aspergillus ochraceus* reduces the activity of polyphenoloxidase and increases the values of potassium leaching, electric conductivity and clorogenic acid. Incidence of the fungus *Cladosporium cladosporioides* influenced the average values of potassium leaching and electric conductivity.

* Guidance Committee: Prof. Dr. Mário Sobral de Abreu – UFLA (Major Adviser), Dra. Sara Maria Chalfoun de Souza – EPAMIG, Prof.^a Dra. Vânia Déa de Carvalho – UFLA.

1 INTRODUÇÃO

O café constitui uma das principais fontes de receita para o Brasil, apresentando grande importância social e econômica. O país ocupa a posição de maior produtor e exportador de café no mercado internacional; entretanto, com o aumento da produção e melhoria da qualidade do café por outros países produtores, associado a crescentes demandas por cafés de bebidas superiores pelos países importadores, a exportação brasileira tem sofrido quedas significativas, sendo que um dos fatores determinantes deste declínio é a falta de qualidade do produto nacional.

Deve-se considerar ainda que o café destaca-se dentre os produtos agrícolas que têm seus preços baseados em parâmetros qualitativos, cujo valor aumenta significativamente com a melhoria da qualidade. Entretanto, essa qualidade é dependente de vários fatores que se relacionam em todas as etapas da produção do café, desde a escolha da variedade a ser plantada até o preparo da bebida.

A qualidade de produtos alimentares, segundo Carvalho (1997), é de difícil definição e seus padrões qualitativos variam conforme o tipo de mercado. De modo mais abrangente, três conjuntos de caracteres são utilizados para classificar alimentos e bebidas quanto a qualidade. Características extrínsecas, diretamente relacionadas com a aparência externa do produto, como tamanho, forma, cor; caracteres intrínsecos, ligados à composição química do produto, responsáveis pelo sabor, aroma e valor nutricional dos alimentos; e características de segurança, pois o alimento deverá estar isento de qualquer substância que pode ser tóxica ao consumidor

Diversos fatores interferem diretamente na qualidade do café. Dentre eles, destaca-se a composição química do grão, a qual é determinada, segundo

Carvalho e Chalfoun (1985), por fatores genéticos, culturais e ambientais; o processo de preparo e conservação do grão, no qual a temperatura e a umidade são fatores determinantes, já que podem propiciar infecções microbianas e fermentações indesejáveis. Dentre esses aspectos, a infecção microbiana dos grãos de café pode comprometer tanto seu aspecto visual, gosto e aroma, como a segurança do produto. Dos organismos que compõem a microbiota do café, os fungos filamentosos representam o grupo de maior relevância, já que apresentam maior ocorrência, e podem provocar perdas, como transformações bioquímicas nos grãos (Neergaard, 1977).

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

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

A maior concentração de compostos fenólicos, como o ácido clorogênico, pode ser causada pelo intenso ataque do fungo filamentoso do gênero *Fusarium*, que induz a planta a alterar seu metabolismo e produzir compostos de defesa (Uriti, 1961, citado por Silva, 2000)

A associação de fungos às sementes e grãos pode ocorrer durante todas as etapas de produção, inclusive após a colheita, em condições de armazenamento, constituindo uma das principais causas de depreciação qualitativa. Os primeiros relatos sobre a influência de fungos filamentosos na qualidade do café foram feitos na década de trinta, após detecção de micélio de *Fusarium* em amostras de grãos ardidos (Krug, 1940). Desde então, vários trabalhos evidenciam a presença de fungos filamentosos em grãos de café.

As espécies fúngicas de maior ocorrência no café estão incluídas nos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* (Mislivic, Bruce e Gibson, 1983; Alves, 1996; Chalfoun, 1997; Freitas, 2000). Todos os relatos evidenciam que a incidência de fungos filamentosos influencia diretamente a bebida do café; no entanto, investigações sobre as alterações químicas ocorridas nos grãos ainda são incipientes.

O presente estudo teve como objetivos verificar a influência de diferentes fungos associados aos frutos de café (*Coffea arabica* L. e *Coffea canephora* L.) na composição química do grão cru e verificar as características químicas do grão em diferentes cultivares.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Caracterização do Experimento

Foram avaliadas 5 cultivares de café da espécie *Coffea arabica* L., cultivadas na Fazenda Experimental da EPAMIG, localizada nos municípios de Lavras, MG, e uma cultivar da espécie *C. canephora* de São Sebastião do Paraíso, MG (Tabela 1)

O sistema de cultivo adotado foi o de livre crescimento. As condições de cultivo foram as recomendadas para a cultura do cafeeiro, na região.

Foram colhidos 30 Kg de café, da safra 1998/1999, de cada cultivar, constituindo as amostras analisadas

TABELA 1 Cultivares e linhagens de café (*Coffea arabica* L. e *C. canephora*) provenientes da Fazenda Experimental da EPAMIG, nos municípios de Lavras e São Sebastião do Paraíso MG. UFLA, Lavras/MG, 2000.

Cultivar	Linhagem	Procedência
Apoatã	LC 2258	São Sebastião do Paraíso
Acaiá Cerrado	MG 1474	Lavras
Mundo Novo	IAC 379/19	Lavras
Icatú Amarelo	IAC 2944	Lavras
Catuai Amarelo	IAC-62	Lavras
Rubi	MG 1192	Lavras

Após colhidos, os frutos permaneceram no terreiro até atingirem o teor de umidade de aproximadamente 12%. Ao atingir o teor de umidade adequado, os grãos foram beneficiados e acondicionados em sacos de papel duplo, e armazenados no laboratório de Controle de Enfermidades de Plantas do Departamento de Fitopatologia da UFLA, até a realização das análises.

2.2 Micoflora associada aos grãos

Para verificação da incidência fúngica, os grãos foram distribuídos em placas de Petri de 15 cm de diâmetro, contendo três folhas de papel de filtro previamente esterilizadas e umedecidas em água destilada e esterilizada, para posterior incubação. Segundo Samson et al. (1995), o plaqueamento direto tem sido considerado a técnica mais efetiva para análise de fungos em alimentos como grãos e castanhas.

Das amostras beneficiadas de cada cultivar, foram retirados 100 grãos aleatoriamente, para posterior distribuição, em condições assépticas, de 25 grãos por placa, conforme a técnica *Blotter Test*. Cada placa com 25 grãos foi considerada uma repetição.

Após plaqueamento, os grãos foram incubados a $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ em câmara com fotoperíodo de 12 horas de luz negra (comprimento de onda próximo a ultravioleta) durante oito dias, até a exteriorização e desenvolvimento dos fungos (Mazzani, 1994).

A população fúngica associada aos grãos foi avaliada em todas as cultivares, a fim de garantir uma maior diversidade de espécies fúngicas associadas aos grãos. A identificação dos fungos foi realizada através do exame individual de cada grão, utilizando-se da forma de coloração das colônias e esporos ao microscópio estereoscópio, após oito dias de incubação.

2.3 Análises químicas

2.3.1 Preparo das amostras para análise química

Para a realização das análises químicas, fez-se uma amostragem de 200 gramas de grão cru, de cada cultivar. As amostras foram moídas em moinho marca Tecnal, modelo T 650 e peneiradas em peneiras de 20 mesh. Especialmente para a avaliação da atividade da polifenoloxidase e acidez titulável total, realizou-se a extração imediatamente após a moagem, para não haver alterações do material.

Para as análises de condutividade elétrica e lixiviação de potássio, separaram-se 100 gramas de grão cru.

2.3.2 Lixiviação de íons de potássio

A determinação da quantidade de potássio lixiviado foi realizada em fotômetro de chama Digimed NK -2002 após 3,5 horas de embebição dos grãos, segundo metodologia proposta por Prete (1992).

2.3.3 Condutividade elétrica

Determinada através do método adaptado de Loeffler et al.(1988).

2.3.4 Atividade enzimática da polifenoloxidase

A obtenção do extrato enzimático foi realizada através da adaptação do processo de extração descrito por Draetta e Lima (1976). Pesados 5 g do grão cru, adicionaram-se, a seguir, 40 ml de tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 6,0, agitando-o por 5 minutos, sendo o material utilizado mantido sob refrigeração. Após agitação, as amostras foram submetidas à filtração a vácuo utilizando-se papel Whatman nº 1. A atividade enzimática foi determinada pelo método

descrito por Potting e Josling (1948), utilizando-se extrato de amostra sem DOPA como branco.

2.3.5 Cafeína

Avaliada segundo o método colorimétrico descrito pelo Instituto Adolfo Lutz (1985).

2.3.6 Açúcares totais, redutores e não redutores

Extraídos pelo método de Lane-Enyon, citado pela AOAC (1990) e determinados pela técnica de Somogy, adaptada por Nelson (1944).

2.3.7 Acidez titulável total

Determinada por titulação com NaOH 0.1 N, de acordo com técnica descrita pela AOAC (1990) e expressa em ml de NaOH 0.1 N por 100 gramas de amostra.

2.3.8 Ácido clorogênico

A determinação do ácido clorogênico contido nas amostras, foi realizada segundo metodologia proposta por Menezes (1990).

Pesou-se 0.5 gramas da amostra previamente moída, adicionando-se em seguida 100 ml de isopropanol 70%, sendo então colocado em refluxo por 4 horas a 50 ° C. Posteriormente, a mistura foi filtrada e o volume completado para 100 ml com isopropanol 70%. Retirou-se 1 ml do extrato misturado ao reagente metaperiodato a 0.25 % , este extrato permaneceu por 10 minutos a 27° C. A amostra de referência foi constituída de 1,0 ml de isopropanol 70% e 10 ml do reagente metaperiodato a 25%. Na seqüência, realizou-se a leitura em espectro fotômetro a 406 nm.

2.4 Análise estatística

Para avaliação dos fungos exteriorizados pelos grãos de café cru, utilizaram-se quatro repetições de 25 sementes de 6 cultivares distintas.

Para a realização das análises químicas, fez-se uma amostragem de 200 gramas de grão cru, de cada cultivar, processada pelas vias seca e úmida.

A análise estatística foi realizada utilizando-se o procedimento GLM (General Liner Models) do sistema estatístico SAS[®] (SAS Institute, 1992). Utilizou-se análise de variância com covariáveis, sendo os fungos presentes nos grãos as covariáveis quantitativas e as cultivares e tegumentos (grãos despolidos e não despolidos), os fatores qualitativos. As respostas dos componentes químicos dos grãos em relação à presença dos fungos foram determinadas por equações de regressão. Foram construídos gráficos para as equações de regressão quando detectados efeitos significativos ($P \leq 0.05$) de respostas em relação à ocorrência fúngica.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A incidência dos fungos associados aos grãos nas diferentes cultivares está apresentada na tabela 2. Observa-se que, nas condições deste ensaio, foram detectados os fungos *Fusarium semitectum*, *Fusarium equiseti*, *Penicillium rugulosum*, *Penicillium funiculosum*, *Penicillium variable*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus niger* e *Cladosporium cladosporioides*. É importante ressaltar que apenas os fungos detectados nas amostras analisadas sofreram a análise de covariância para a verificação da influência destes nas características químicas nas diferentes análises realizadas.

Fungos dos gêneros *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus* e *Cladosporium* se encontram comumente associados aos grãos de café, e diversos trabalhos relacionam a ocorrência dos fungos *Fusarium* sp. e *Aspergillus* aos cafés classificados como bebida “rio” e “riada”. Já o fungo do gênero *Cladosporium* sp. predomina nos cafés classificados como bebida “mole” e “dura” (Carvalho et al., 1989; Meirelles, 1990; Alves, 1996). Entretanto, nenhum trabalho relaciona a microflora associada aos grãos com as características químicas dos grãos.

Dentre os fungos do gênero *Aspergillus*, neste estudo detectaram-se apenas as espécies *Aspergillus ochraceus* e *Aspergillus niger*, o que está de acordo com o trabalho de Silva et al. (1998), que verificaram predominância desta duas espécies em cafés beneficiados.

TABELA 2 Incidência de fungos associados aos grão de café processados por via seca, em diferentes cultivares. UFLA, Lavras/MG, 2000

Cultivares	<i>Fusarium semitectum</i>	<i>Fusarium equiseti</i>	<i>Penicillium rugulosum</i>	<i>Penicillium variable</i>	<i>Penicillium funiculosum</i>	<i>Aspergillus ochraceus</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Cladosporium cladosporioides</i>
Apoatã	92,0	0,0	70,0	0,0	0,0	99,0	4,0	85,0
Acaiaá	0,0	57,0	0,0	95,0	0,0	18,0	2,0	87,0
MN	0,0	0,0	0,0	72,0	0,0	9,0	4,0	92,0
Icatu	83,0	87,0	0,0	0,0	79,0	8,0	2,0	92,0
Catuai	0,0	77,0	0,0	37,0	0,0	12,0	12,0	86,0
Rubi	0,0	74,0	82,0	0,0	0,0	16,0	2,0	87,0

3.1 Atividade enzimática da polifenoloxidase

Os resultados referentes a atividade da polifenoloxidase (U/min/g de amostra) determinada em grãos crus provenientes de diferentes cultivares estão apresentados na tabela 3. Observa-se que nas condições deste estudo, as cultivares estudadas apresentaram diferenças estatísticas significativas ($P \leq 0.05$).

Lopes (2000), quando comparou diferentes cultivares com relação à polifenoloxidase, incluindo as cultivares Mundo Novo, Catuai Amarelo, Acaia Cerrado, Icatu Amarelo e Rubi, não verificou diferenças estatísticas significativas ($P \leq 0.01$) entre elas. Já Oliveira et al.(1976) não observaram diferenças entre as cultivares Mundo Novo, Catuai Amarelo e Bourbon Amarelo quanto à atividade desta enzima quando submetidas ao mesmo tratamento, porém foram constatadas diferenças quando as mesmas cultivares avaliadas foram provenientes de diferentes locais, evidenciando que o local de cultivo tem maior relevância na atividade enzimática da polifenoloxidase que a variação genética.

TABELA 3 Atividade enzimática da polifenoloxidase (U/min/g de amostra) de grãos de diferentes cultivares de café (*Coffea arabica* e *C. canephora*). Lavras-MG, UFLA, 2000

Cultivares	Atividade enzimática da polifenoloxidase (U/min/ g de amostra)
Mundo Novo	65.79 a
Acaia Cerrado	65.21 b
Rubi	64.74 c
Icatu Amarelo	63.63 d
Catuai Amarelo	63.50 d
Apoatã	54.67 e
CV(%)	0.65

Médias seguidas pela mesma letra são estatisticamente iguais pelo teste Tukey ($P \leq 0.05$).

Neste estudo, as cultivares Mundo Novo, Catuai Amarelo, Icatu Amarelo, Rubi e Acaiá Cerrado foram enquadradas quanto à bebida, como padrão mole/apenas mole, segundo a classificação proposta por Carvalho et al. (1994) apesar de apresentarem diferenças significativas ($P \leq 0,05$). A cultivar Apoatã, além da grande divergência genética com as outras cultivares, já que se trata de uma variedade de *Coffea canephora*, foi também proveniente de outra localidade. Este fato pode ter contribuído para baixa atividade desta enzima, enquadrando-a com bebida “rio” na classificação proposta por Carvalho et al (1994). Outro fator importante que deve ser considerado é que esta cultivar foi a que apresentou maior incidência de *Aspergillus ochraceus*.

Pelos resultados obtidos neste estudo, dentre os fungos detectados nas amostras analisadas, apenas o fungo *Aspergillus ochraceus* influenciou nos valores da atividade enzimática da polifenoloxidase, evidenciando que este fungo, além de produzir metabólitos secundários, como a OTA, pode interferir na composição química do grão, especialmente na atividade da polifenoloxidase (Tabela 4).

Através da análise da figura 1, pode-se constatar que a cada aumento de 4% de ocorrência de *Aspergillus ochraceus*, há uma tendência a redução de 1.1534 na atividade desta enzima. Carvalho et al. (1994) estudaram a relação entre a classificação do café pela bebida e composição química e microflora associada ao grão beneficiado e concluíram que a determinação da atividade da polifenoloxidase permite avaliar de modo mais objetivo a qualidade do café. Chalfoun (1996) afirma, ainda, que a atividade desta enzima é um parâmetro seguro para avaliação qualitativa do café, já que os cafés que apresentam bebida de pior qualidade apresentam também menor atividade enzimática da polifenoloxidase

TABELA 4 Resumo da análise de variância dos dados referentes à atividade da polifenoloxidase em amostras de café .UFLA-Lavras/MG, 2000.

Fonte de variação	GL	Quadrado médio	Valor de F
Cultivares	5	19.2798	108.95**
Tegumento	1	69.8845	394.92**
<i>F. semitectum</i>	1	0.33620	0.3643n.s.
<i>F. equiseti</i>	1	0.1473	0.0959 n.s.
<i>P. variable</i>	1	0.50242	2.84 n.s.
<i>P. rugulosum</i>	1	0.4750	2.70 n.s.
<i>P.funiculosum</i>	1	0.4140	2.34 n.s.
<i>Cladosporium</i>	1	0.5733	0.32n.s.
<i>A.ochraceus</i>	1	1.81765	10.27*
<i>A.niger</i>	1	0.42909	2.45 n.s.
<i>Rhizopus</i>	1	0.01612	0.09 n.s.
Modelo	15	15.3816	86.92**
Erro	80	0.1769	
CV (%)	0.65		

**P≤ 0.01

*P≤ 0.05

Este resultado confirma, em parte, o que foi proposto por Carvalho et al. (1989) quando estudaram a relação entre a classificação do café através da análise sensorial e a composição físico química, química e microflora de grãos beneficiados, e concluíram que as amostras de cafés classificadas como de bebida mole e dura apresentaram índices de infecção dos fungos *Fusarium roseum*, *Aspergillus ochraceus* e *Aspergillus flavus* acentuadamente menores em relação aos cafés classificados como de bebida riada e rio. Entretanto, os índices de *Fusarium* sp e *Penicillium* sp não diferiram entre os cafés classificados nos diferentes tipos de bebida. O fungo do gênero *Cladosporium cladosporioides* predominaram nos cafés classificados como de bebida mole e dura. Neste estudo, a ocorrência dos fungos *Fusarium roseum* e *Aspergillus flavus* não foi

verificada nas amostras analisadas, não sendo possível, portanto, estabelecer qualquer relação entre estes fungos e a atividade enzimática da polifenoloxidase. No entanto, o fungo *Cladosporium cladosporioides*, apesar de detectado nas amostras, não exerceu nenhuma influencia direta na atividade desta enzima.

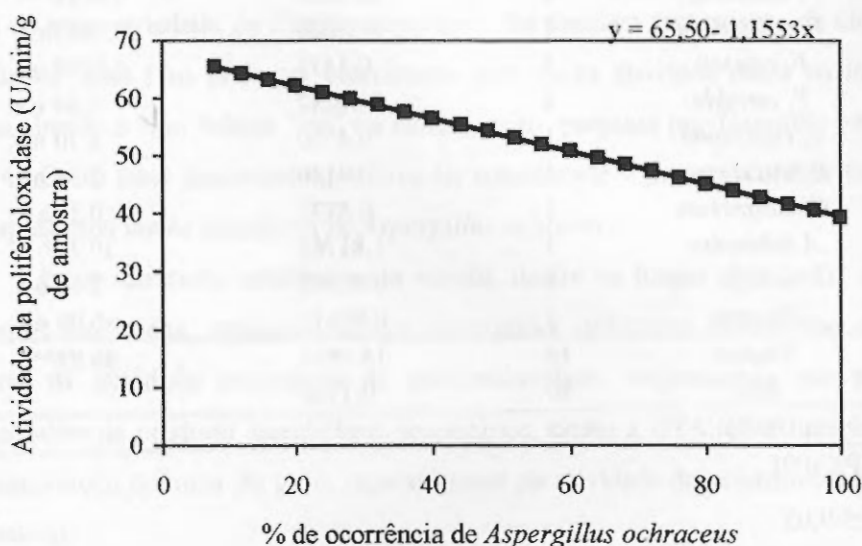


FIGURA 1 Efeito da incidência (porcentagem média de ocorrência) do fungo *Aspergillus ochraceus* na atividade enzimática da polifenoloxidase (U/min/g de amostra) em grãos de *Coffea arabica* L. Lavras-MG, UFLA, 2000.

Alves (1996) também demonstrou haver uma relação entre a maior incidência dos fungos dos gêneros *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium* e as bebidas de qualidade inferior. Neste estudo, apesar da ocorrência do fungo *Aspergillus niger* ter sido verificada, a incidência foi baixa, não sendo detectado em algumas amostras. Este fato possivelmente interferiu na atuação deste fungo na atividade enzimática da polifenoloxidase. Neste ensaio, verificou-se também

a incidência dos fungos *Fusarium semitectum* e *F. equiseti*; entretanto, estes fungos também não influenciaram a atividade da polifenoloxidase, mesmo apresentando, em algumas amostras, alta incidência, ou seja, para o *F. semitectum* a porcentagem média encontrada foi de 83% nas amostras da cultivar Mundo Novo. Para o *F. equiseti*, observou-se a porcentagem de 57, 87, 77 e 74% em amostras de café em coco para as cultivares Acaiá, Icatú, Catuai e Rubi, respectivamente. Comportamento similar foi observado pelas espécies do gênero *Penicillium*. As espécies deste gênero encontradas nas diferentes cultivares, com porcentagem média de ocorrência variando de 37 a 96%, não interferiram na atividade enzimática da polifenoloxidase. Meirelles (1990); Alves e Castro (1993) e Chalfoun et al. (1994) também não constataram nenhuma relação entre a maior ocorrência deste gênero e cafés de bebida inferior.

3.2 Ácido Clorogênico

Os resultados obtidos para o ácido clorogênico (%) nas amostras de grãos crus, em diferentes cultivares, estão apresentados na tabela 5.

TABELA 5 Teor de ácido clorogênico (%) em grãos de diferentes cultivares de café (*Coffea arabica* e *C. canephora*). Lavras-MG, UFLA, 2000

Cultivares	Ácido clorogênico (% MS)
Apoatã	7.46 a
Rubi	6.41 b
Icatu Amarelo	6.01 c
Catuai Amarelo	5.78 cd
Acaiá cerrado	5.49 de
Mundo Novo	5.26 e
CV(%)	4.99

Médias seguidas pela mesma letra são estatisticamente iguais pelo teste Tukey ($P \leq 0.05$).

A concentração de ácido clorogênico observada nos grãos crus apresentou diferenças estatisticamente significativas entre as cultivares avaliadas. A variedade Apoatã foi a que apresentou maior teor. Cafés Robusta contêm grandes quantidades de ácido clorogênico, principal composto fenólico, quando comparados ao Arábica. Segundo Balayaya e Clifford (1995), a alta concentração do ácido 4,5 – dicafeoilquínico contribui para um peculiar sabor metálico, com um negativo efeito sensorial. Além disto, a variedade Apoatã apresentou maior porcentagem média de ocorrência do fungo *Aspergillus ochraceus*, o qual possivelmente contribuiu para uma elevação do teor destes compostos.

Os resultados referentes ao resumo da análise de variância com covariáveis, realizada para verificar a influência dos fungos associados aos grãos de café no teor de ácido clorogênico, estão apresentados na Tabela 6.

Observa-se que apenas o fungo *Aspergillus ochraceus* interferiu no teor de ácido clorogênico, sendo que, para cada aumento de 4% na incidência deste fungo, ocorre uma tendência de aumento de 0.062 no teor de ácido clorogênico (Figura 2).

O grão de café possui vários tipos de compostos fenólicos e os de maior importância, em função da quantidade encontrada no grão, segundo Amorim (1972), são os ácidos clorogênicos. Estes ácidos exercem uma ação protetora, antioxidante dos aldeídos e, geralmente, são considerados produtos secundários das plantas. A presença desses compostos no café, em quantidades superiores às verificadas para determinada espécie, é associada à desvalorização da qualidade (Amorim, 1972), o que sugere que estes compostos também podem servir para auxiliar nas avaliações de qualidade do café. Compostos fenólicos estão relacionados com a atividade enzimática de algumas enzimas, como a polifenoloxidase, atuando como principal substrato; qualquer injúria ocorrida nos grãos, inclusive as provocadas por microorganismos, pode promover a

desorganização interna da célula, levando à interação entre enzima e substrato e consequente produção de quinonas reativas, as quais subsequentemente reagem com proteínas e outras enzimas, promovendo sua inativação (Araújo, 1990).

O resultado deste estudo não confirma o que foi proposto por Amorim et al. (1974) quando sugeriram que o teor do ácido clorogênico é mais elevado em cafés de qualidade mais baixa em função do ataque do fungo *Fusarium* sp, indicando que a presença deste fungo induz a produção de maiores teores desse ácido.

TABELA 6 Resumo da análise de variância dos dados referentes ao teor de ácido clorogênico (%) em amostras de café de diferentes cultivares. UFLA-Lavras(MG),2000.

Fonte de variação	GL	Quadrado médio	Valor de F
Cultivares	5	5.9332	64.38**
Tegumentos	1	4.3169	46.84**
<i>F.semitectum</i>	1	0.1004	1.09 n.s.
<i>F. equiseti</i>	1	0.2639	2.86 n.s.
<i>P.variable</i>	1	0.1255	1.36n.s.
<i>P.rugulosum</i>	1	0.0025	0.03n.s.
<i>P.funiculosum</i>	1	0.060	0.61n.s.
<i>Cladosporium</i>	1	0.0001	0.00 n.s.
<i>A.ochraceus</i>	1	0.3803	4.13*
<i>A.niger</i>	1	0.0093	0.10n.s.
<i>Rhizopus</i>	1	0.0092	0.10 n.s.
Modelo	15	3.69	40.09**
Erro	80	0.092	
CV (%)	4.99		

**P≤ 0.01

*P≤ 0.05

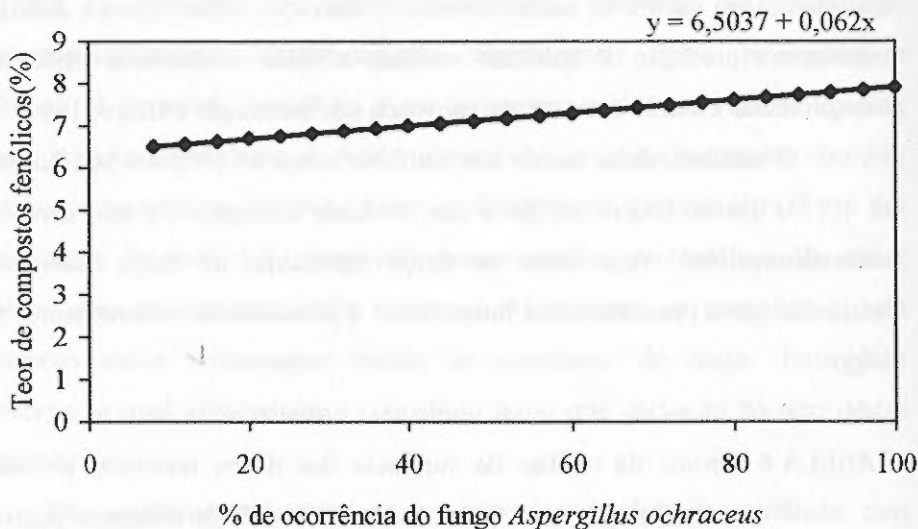


FIGURA 2 Efeito da incidência (porcentagem média de ocorrência) do fungo *Aspergillus ochraceus* no teor do ácido clorogênico (%) em grãos de café UFLA- Lavras/MG,2000

Como o teor desse composto, e consequentemente o teor de fenólicos totais, está associado à perda da qualidade, todo trabalho que relacione a maior porcentagem de ocorrência de fungos em cafés de qualidade inferior pode sugerir que estes fungos alterem também o teor de fenólicos totais.

Alves (1996) relacionou a ocorrência de *Fusarium* com as bebidas de pior qualidade. Nesse estudo, em algumas amostras analisadas, verificou-se a ocorrência de *Fusarium equiseti* e *Fusarium semitectum*, em porcentagem de ocorrência em torno de 99%; no entanto, este fungo, nas condições deste estudo, não influenciou o teor deste componente químico, mesmo em condições de alta incidência. No entanto, Carvalho et al.(1989) citam que os fungos *Fusarium* sp e *Penicillium* sp. apresentam índices igualmente elevados em diferentes classificações de café proposta por Garruti e Conagin (1961),estes resultados

confirmam o que foi verificado nesse estudo, no entanto, os autores relatam que o fungo do gênero, *Cladosporium* sp predominou nos cafés classificados como de bebida “mole” e “dura”. Neste trabalho, o fungo *Cladosporium* não exerceu influência no teor desse ácido.

Vários autores citam haver uma relação entre alta incidência do fungo *Aspergillus ochraceus* e amostras de café classificadas com bebida de pior qualidade (Carvalho et al., 1989; Alves e Castro, 1993; Alves, 1996). Esse estudo confirma haver uma relação entre esse fungo e o teor de ácido clorogênico, um dos fatores depreciativos da qualidade da bebida.

3.3 Lixiviação de Potássio e Condutividade elétrica

Os valores referentes aos valores médios de lixiviação de K^+ (ppm) e condutividade elétrica ($\mu/S/g$) estão apresentados na tabela 7

TABELA 7 Valores médios de Lixiviação de K^+ (ppm) e Condutividade elétrica ($\mu/S/g$) de grão de diferentes cultivares de café (*Coffea arabica* e *C. canephora*) Lavras- MG, UFLA, 2000.

Cultivares	Lixiviação de Potássio (ppm)	Condutividade elétrica ($\mu/S/g$)
Apoatã	64.24 a	249.21 a
Icatú Amarelo	55.55 b	225.44 a
Catuai Amarelo	54.74 b	212.40 a
Rubi	52.78 b	171.87 b
Acaiá Cerrado	48.31 bc	171.72 b
Mundo Novo	44.28 c	166.51 b
CV(%)	4.46	10.06

Médias seguidas pela mesma letra são estatisticamente iguais pelo teste Tukey ($P \leq 0.05$).

A maior lixiviação de Potássio e condutividade elétrica ocorreu nos grãos da cultivar Apoatã e os menores valores foram encontrados para a cultivar Mundo Novo. Lopes (2000) encontrou maiores valores para a cultivar Mundo Novo. Desta forma, não é possível concluir que cultivares distintas exerçam alguma influência nestas variáveis, outros fatores podem atuar, como procedimentos nas operações de colheita e pós-colheita, estágio de maturação dos grãos e ataque de microorganismos, os quais influenciam também diretamente na qualidade do café, considerando as modificações que tais injúrias podem promover nos grãos. Desta forma, os melhores cafés seriam provenientes de melhores condições de manejo e processamento dos grãos.

Neste estudo, os maiores valores destas variáveis foram observados na cultivar em que se verificou maior incidência do fungo *Aspergillus ochraceus*, a análise de variância com covariáveis indicou uma tendência de aumento destas variáveis com o aumento de ocorrência deste fungo, porém, isto também foi verificado para o fungo *Cladosporium cladosporioides*, para o qual não se observaram diferenças acentuadas entre as cultivares avaliadas.

Os resultados referentes à influência dos fungos associados aos grãos de café beneficiado, nos valores de lixiviação de K^+ e condutividade elétrica, estão apresentados nas tabelas 8 e 9.

Dentre os fungos detectados nas amostras, constatou-se que apenas os fungos *Aspergillus ochraceus* e *Cladosporium cladosporioides* exerceram efeito direto sobre estas variáveis. (Tabelas 8 e 9).

Observa-se que a cada aumento de 4% do fungo *Aspergillus ochraceus*, houve uma tendência de incremento de 1.10 no valor da lixiviação de potássio e 3.592 no valor da condutividade elétrica. (Figuras 3 e 4)

TABELA 8 Resumo da análise de variância dos dados referentes à lixiviação de Potássio (ppm) em amostras de café cru beneficiado. UFLA-Lavras (MG),2000.

Fonte de variação	GL	Quadrado médio	Valor de F
Cultivares	5	2.2679	15.03**
Tegumento	1	5.9735	39.58**
<i>F.semitectum</i>	1	0.01971	0.13 n.s.
<i>F. equiseti</i>	1	0.0283	0.02 n.s.
<i>P.variable</i>	1	0.01183	1.41 n.s.
<i>P.rugulosum</i>	1	0.17773	1.18 n.s.
<i>P.funiculosum</i>	1	0.0003	0.00 n.s.
<i>Cladosporium</i>	1	1.0118	7.32*
<i>A.ochraceus</i>	1	1.0347	6.86*
<i>A.niger</i>	1	0.0070	0.05n.s.
Rhizopus	1	0.0062	0.04 n.s.
Modelo	15	1.965	13.02**
Erro	80	0.1509	
CV (%)	4.46		

**P ≤ 0.01 *P ≤ 0.05

Para o fungo *Cladosporium cladosporioides*, a cada 4% de aumento na incidência desse fungo, ocorreu uma tendência de elevação de 0.558 nos valores de Lixiviação de Potássio e 0.96 nos valores de condutividade elétrica.(Figuras 3,4,5 e 6).

Testes de lixiviação de K⁺ foram realizados por Amorim (1978), com objetivo de avaliar a integridade da membrana. O autor verificou maiores índices de lixiviação de potássio em amostras de cafés de qualidade inferior. Isso evidencia que os cafés que sofreram deteriorações de qualidade tiveram suas membranas afetadas. Uma vez rompida a estrutura da membrana, há um maior contato entre as enzimas e componentes intra e extracelulares o que provoca

reações com modificações na composição e conseqüentemente na qualidade dos grãos.

As membranas, segundo Amorim (1978), são as primeiras a serem afetadas pelas condições adversas ao café, sendo comum ocorrerem danos na fase pré e pós-colheita, devido ao ataque de insetos e infecções microbianas. Nesse estudo, ficou evidenciado que apenas os fungos *Aspergillus ochraceus* e *Cladosporium cladosporioides* aumentaram a quantidade de íons de potássio lixiviado. (Figuras 3 e 4)

TABELA 9 Resumo da análise de variância dos dados referentes à Condutividade elétrica ($\mu\text{S/g}$) em amostras de café cru beneficiado UFLA-Lavras(MG), 2000.

Fonte de variação	GL	Quadrado médio	Valor de F
Cultivares	5	0.2951	17.20**
Tegumento	1	0.1261	7.35**
<i>F.semitectum</i>	1	0.0253	1.49 n.s.
<i>F. equiseti</i>	1	0.0089	0.52 n.s.
<i>P.variable</i>	1	0.0091	0.63 n.s.
<i>P.rugulosum</i>	1	0.0099	0.58 n.s.
<i>P.funiculosum</i>	1	0.0121	0.71 n.s.
<i>Cladosporium</i>	1	0.1185	6.91**
<i>A.ochraceus</i>	1	0.0969	5.65**
<i>A.niger</i>	1	0.0006	0.04n.s.
<i>Rhizopus</i>	1	0.0053	0.31 n.s.
Modelo	15	0.1265	7.37**
Erro	80	0.01716	
CV (%)	10.06		

** $P \leq 0.01$

* $P \leq 0.05$

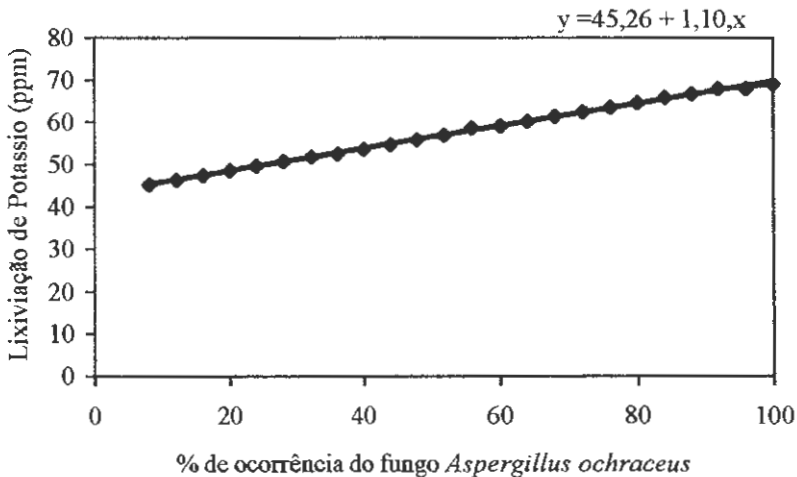


FIGURA 3 Efeito da incidência (porcentagem média de ocorrência) do fungo *Aspergillus ochraceus* no valor de lixiviação de potássio em grãos de café beneficiados. UFLA- Lavras/MG,2000

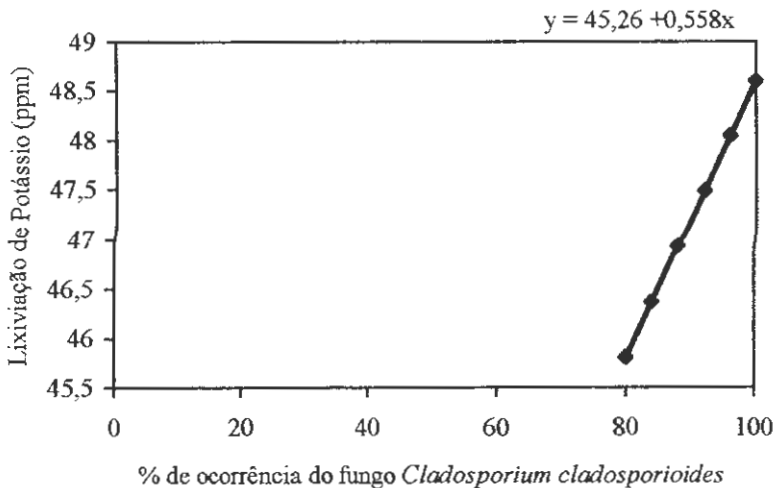


FIGURA 4 Efeito da incidência (porcentagem média de ocorrência) do fungo *Cladosporium cladosporioides* no valor de lixiviação de potássio em grãos de café beneficiados. UFLA- Lavras/MG, 2000

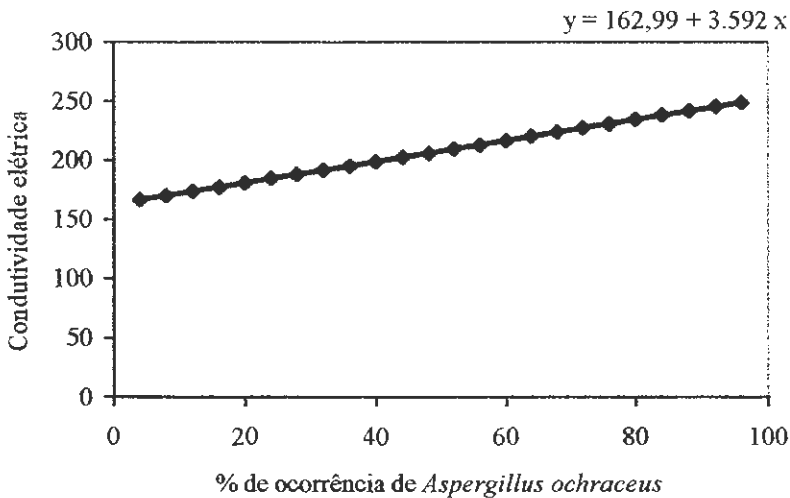


FIGURA 5 Efeito da incidência (porcentagem média de ocorrência) do fungo *Aspergillus ochraceus* no valor de condutividade elétrica ($\mu\text{S/g}$) em grãos de café beneficiados. UFLA- Lavras/MG,2000

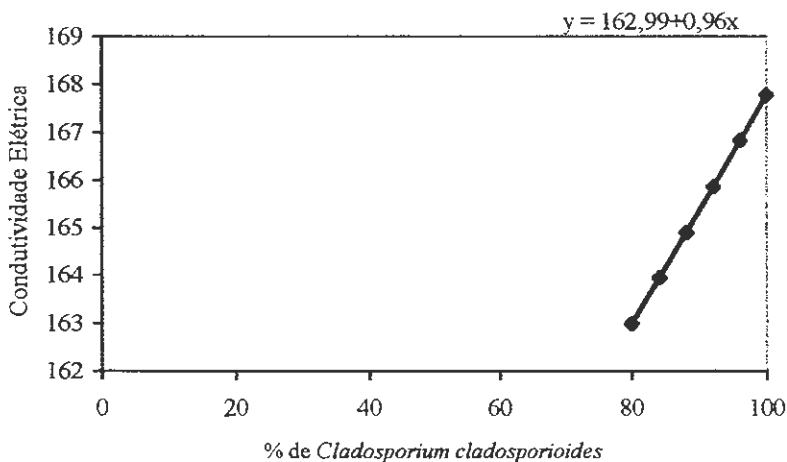


FIGURA 6 Efeito da incidência (porcentagem média de ocorrência) do fungo *Cladosporim cladosporioides* no valor de condutividade elétrica ($\mu\text{S/g}$) em grãos de café beneficiado. UFLA- Lavras/MG, 2000.

O resultado desse estudo não confirma o que foi verificado por Carvalho et al.(1998), Meirelles (1990) e Alves (1996) quando concluíram que o fungo do gênero *Cladosporium* sp predominou nos cafés classificados como de bebida de qualidade superior. Verificou-se que, na presença deste fungo, os valores de lixiviação de potássio apresentam uma tendência a um aumento e maiores índices de lixiviação deste íon são encontrados em amostras de cafés de qualidade inferior, indicando que suas membranas foram afetadas.

Trabalhos anteriores demonstram haver uma relação positiva entre a lixiviação de potássio e a condutividade elétrica, considerando-se que a maior condutividade elétrica foi encontrada em grãos que sofreram maior lixiviação de potássio (Prete, 1992; Lopes, 2000).

Maiores valores para a condutividade elétrica evidenciam, de acordo com Lopes (2000), uma menor rigidez da membrana celular e que, devido a uma maior suscetibilidade às injúrias, tiveram uma maior translocação de íons citoplasmáticos para o meio líquido. Considerando ainda a relação do estado de organização do sistema de membranas do grão cru com a qualidade, o teste de condutividade elétrica do exudato dos grãos demonstra que quanto pior a qualidade da bebida, maiores serão os valores determinados (Prete, 1992).

Dentre os fatores que contribuem para uma maior lixiviação de íons de potássio e maiores valores de condutividade elétrica, está o ataque de microrganismos (Lopes, 2000; Prete, 1992). Este estudo comprova a influência de *Aspergillus ochraceus* *Cladosporium cladosporioides* nos valores de condutividade elétrica (Figura 5). Entretanto, os outros fungos detectados nos grãos amostrados não influenciaram nessas variáveis

3.4 Cafeína, Açúcares, Acidez Titulável

Os resultados referentes aos teores de cafeína, açúcares totais, redutores e não redutores e acidez titulável dos grãos crus nas diferentes cultivares

avaliadas estão apresentados na tabela 10. Observa-se que os valores de açúcares totais, redutores e não redutores apresentaram diferenças estatísticas significativas entre as cultivares. A cultivar Rubi foi a que apresentou maiores teores de açúcar. Valores mais elevados de açúcares podem indicar a presença de uma maior quantidade de frutos no estágio cereja e seco/passa, representando um potencial de melhor qualidade para o café.

Os teores de cafeína também diferiram entre as cultivares estudadas, sendo o maior teor, apresentado pela cultivar Apatã.

A acidez titulável também foi mais elevada na cultivar Apatã e menor na cultivar Catuaí. As demais cultivares não apresentaram diferenças estatísticas significativas ($P \leq 0,05$).

TABELA 10 Totais médios de açúcares totais (% MS), açúcares redutores e açúcares não redutores, acidez titulável e cafeína de grão crus em diferentes cultivares de café (*Coffea arabica* e *C. canephora*). Lavras(MG), UFLA, 2000

Cultivares	Açúcares totais (%)	Açúcares redutores (%)	Açúcares não redutores (%)	Acidez Titulável (ml NaOH 0.1N)	Cafeína (% MS)
Apatã	4.79 c	4.27 c	0.28 b	243.75 a	1.07 a
Acaiaí Cerrado	5.85 b	5.21 b	0.36 a	225.00 b	1.03 ab
Mundo Novo	5.93 b	5.37 b	0.37 b	237.50 a	0.98 bc
Icatu Amarelo	5.94 b	5.35 b	0.38 a	212.50 c	1.00 b
Catuaí Amarelo	6.19 b	5.51 b	0.29 b	225.00 b	1.00 b
Rubi	7.14 a	6.44 a	0.35 a	243.75 a	0.93 c
CV(%)	8.76	12.93	8.96	3.62	5.40

Médias seguidas pela mesma letra são estatisticamente iguais pelo teste Tukey ($P \leq 0.05$).

Diferenças entre as cultivares Acaía, Mundo Novo, Icatú, Catuai e Rubi também foram observadas por Lopes (2000) para estas variáveis, sugerindo que o material genético é um dos fatores que podem interferir em alguns componentes químicos nos grãos de café, além da região de cultivo, manejo e processamento dos grãos.

Os fungos associados aos grãos nas amostras das diferentes cultivares não influenciaram estas variáveis. Nas condições em que este estudo foi realizado, as diferenças encontradas entre elas se restringem as características inerentes as cultivares avaliadas.

Os resultados referentes aos teores de cafeína, açúcares totais, açúcares redutores, açúcares não redutores e acidez titulável total estão apresentados na Tabela 11. Pode-se observar que não houve efeito significativo ($P \leq 0.05$) dos fungos detectados nas amostras em nenhuma dessas variáveis, sugerindo que a cafeína e açúcares componentes químicos presentes nos grãos de café não são alterados em função de fungos associados aos grãos.

A acidez em vários alimentos e bebidas é fator determinante na formação e propriedades do flavor. O teor de acidez titulável em grãos de café pode variar de acordo com os níveis de fermentações que ocorrem nos grãos e também com os diferentes estádios de maturação deles, podendo servir como suporte para auxiliar a avaliação da qualidade da bebida do café. (Costa e Chagas, 1997). Nas condições desse estudo, ficou evidenciado que os fungos detectados nas amostras analisadas, em diferentes cultivares e diferentes vias de processamento, não influenciaram na acidez titulável total do grão.

TABELA 11 Resumo da análise de variância dos dados referentes aos teores de cafeína (% na MS), açúcares totais, redutores e não redutores(% MS), e valor da acidez titulável total (mlNaOH 0.1N) em amostras de café cru UFLA -- Lavras/MG, 2000.

Fonte de variação	GL	Quadrado médio				
		Cafeína	Açúcares totais	Açúcares não redutores	Açúcares redutores	Acidez titulável
Variedade	5	0.017 **	5.816**	5.0125 **	0.0147**	1287.82 **
Tegumento	1	0.022 n.s	17.058**	13.8194**	0.0005 n s	10051.09 **
<i>F. semitectum</i>	1	0.0005ns	0.0514 ns	0.0565 ns	0.0010 ns	27.0166 ns
<i>F. equiseti</i>	1	0.0003 ns	0.0043 ns	0.0017 ns	0.0001 ns	3.7869 ns
<i>P. variable</i>	1	0.0044 ns	0.0517 ns	0.0153 ns	0.0971 ns	7.1939 ns
<i>P. rugulosum</i>	1	0.0053 ns	0.1075 ns	0.0875 ns	0.0040 ns	0.8086 ns
<i>P. funiculosum</i>	1	0.0032 ns	0.0035 ns	0.0077 ns	0.0013 ns	13.4337 ns
<i>Cladosporium sp</i>	1	0.0025 ns	0.2716 ns	0.0103 ns	0.0152 ns	59.7312 ns
<i>A. ochraceus</i>	1	0.0002 ns	0.3012 ns	0.0164 ns	0.0141 ns	4.9241 ns
<i>A. niger</i>	1	0.0007 ns	0.1584 ns	0.0108 ns	0.0049 ns	1.8065 ns
Modelo	15	0.01553	4.2507	3.5656	0.0132	1541.8647
Erro	80	0.0029	0.2747	0.2309	0.0019	70.2753
CV(%)		5.400	8.76	8.96	12.93	3.62

A cafeína é um dos componentes químicos mais estudados, devido aos seus efeitos fisiológicos, principalmente como estimulante. O conhecimento dos teores de cafeína é de interesse principalmente para os mercados que exigem cafés com baixos teores destes alcalóides, ou até mesmo café descafeínados (Carvalho,1997). Nas condições deste estudo, verificou-se que os fungos associados aos grãos, nas amostras de café cru, não afetaram os teores destes constituintes.

Dentre os açúcares constituintes do café, predominam os não redutores, particularmente a sacarose, sendo que os redutores apresentam-se em pequenas quantidades. Durante o processo de torração, os açúcares, particularmente os redutores, reagem com aminoácidos, formando compostos coloridos desejáveis, responsáveis pela cor e aroma do produto final (Costa e Chagas, 1997).

O teor de açúcar pode estar relacionado com as condições climáticas das diferentes regiões onde é produzido o café (Costa e Chagas, 1997) e com presença de grãos defeituosos, os quais reduzem os teores destes constituintes. Chagas (1994) associou menores teores de açúcares redutores em grãos crus, em que os frutos foram expostos a condições adversas, como injúrias mecânicas, microbianas e fermentativas, já que a maior quantidade desses açúcares é encontrada na mucilagem e constituem substratos para fermentações e desenvolvimento de fungos. Entretanto, nas condições deste estudo, não foi observado redução ou incremento nos teores de açúcares, em função da ocorrência dos fungos detectados nas amostras analisadas.

4 CONCLUSÕES

Nas condições em que este estudo foi realizado e fundamentando-se nos resultados obtidos, pode-se concluir que:

1. Verificou-se uma tendência de redução da atividade da polifenoloxidase e aumento nos valores de lixiviação de potássio e condutividade elétrica dos grãos na presença do fungo *Aspergillus ochraceus*.
2. Na presença do fungo *Cladosporium cladosporioides*, verificou-se uma tendência no incremento nos valores de condutividade elétrica e lixiviação de potássio nos grãos provenientes das diferentes cultivares.
3. Os fungos dos gêneros *Fusarium* e *Penicillium* detectados nas amostras não interferiram em nenhum dos componentes químicos analisados deste estudo.
4. Não houve tendência de alteração para os açúcares totais, redutores, não redutores, acidez titulável e cafeína na presença dos fungos detectados nas amostras das diferentes cultivares.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, E. **População fúngica associada ao café (Coffea arabica L.) beneficiado e às fases pré e pós colheita-relação com a bebida e local de cultivo.** Lavras :UFLA, 1996. 48p. (Dissertação - Mestrado em Fitossanidade).
- ALVES, E.; CASTRO, H. A. de **Fungos associados ao café (Coffea arabica L.) e sua relação com a bebida.** In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 26.,1993 Aracajú. **Resumos...**Brasília: SBF, 1993. p. 329.
- AMORIM, H. V. **Aspectos bioquímicos e histoquímicos do grão de café verde relacionados com a deterioração da qualidade.** Piracicaba: ESALQ, 1978. 85 p. (Tese – Livre Docência em Bioquímica).
- AMORIM, H. V. **Relação entre alguns compostos do grão de café verde com a qualidade da bebida.** Piracicaba: ESALQ,1972. 136p. (Tese –Doutorado em Bioquímica).
- AMORIM, H. V.; TEIXEIRA, A. A.; GUERCIO, M. A.; CRUZ, V. F.; MALAVOLTA, E. **Chemistry of Brazilian green coffee anal the quality of the beverage : II-Phenolic compounds.** Turrialba, San Jose, v.24, n.2, p.217-221, abr./jun. 1974
- ARAÚJO, J. M. de **Escurecimento enzimático em alimentos: [aspectos químicos e controle].** Viçosa : UFV, 1990. 14p. (Revisão,231).
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMIST. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists.** 15 ed Washigton,1990. 2v.
- BALALAYA,K,J.; CLIFFORD,M.N. **Individual chlorogenic acids and caffeine contents in commercial grades of wet and dry processed Indian green robusta coffee.** **Journal of Food Science and Technology**, Chicago, v.32, n.2, p.104-108,1995.
- CARVALHO, V. D. **Cafeicultura empresarial: [produtividade e qualidade – qualidade] do café.** Lavras : UFLA/FAEPE, 1997. 73p.

- CARVALHO, V. L. de; CHAGAS, S. J. de R.; CHALFOUN, S.M.; BOTREL, N.; JUSTE JÚNIOR, E. S. G. J. Relação entre a composição físico-química e química do grão beneficiado e a qualidade da bebida do café. I. Atividade de polifenoloxidase peroxidase, índice de coloração e acidez. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.27, n.3, p.449-454. mar. 1994.
- CARVALHO, V. D. de; CHALFOUN, S. M. Aspectos qualitativos do café. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.11, n.126, p.79-92. 1985.
- CARVALHO, V.D. de; CHALFOUN, S.M.; COSTA COUTO, A.; CHAGAS, S. J. de R.; VILELA, E. R. Efeito do tipo de colheita e local de cultivo na composição físico-química e química do grão beneficiado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 15., 1989, Maringá. **Resumos ...Rio de Janeiro: MIC/IBC, 1989. p.23-24.**
- CHAGAS, S. J. de R. **Caracterização química e qualitativa de cafés de alguns municípios de três regiões produtoras de Minas Gerais.** Lavras:UFLA, 1994. 83p. (Dissertação – Mestrado em Ciências de Alimentos).
- CHALFOUN, S. M. **O café(*Coffea arabica* L.) na região Sul de Minas Gerais – relação da qualidade com fatores ambientais, estruturais e tecnológicos.** Lavras: UFLA, 1996. 154p. (Tese- Doutorado em Fitotecnia).
- CHALFOUN, S. M.; CARVALHO, V. L. de; CHAGAS, S. J. de R.; COSTA, L. Controle de microflora associada a frutas e grãos de café (*Coffea arabica* L.) nas fases pré e pós colheita. **Informe Fegatex**, São Paulo, v.1, 4-10. 1994.
- COSTA, L.; CHAGAS, S. J. R. de Gourmets - uma alternativa para o mercado de café. **Informe Agropecuário**, Belo horizonte, v.18, n.187, p.63-67, 1997.
- DRAETTA, I. S.; LIMA, D. C. Isolamentos e caracterização das polifenoloxidases do café. **Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.7, p.3-28, jun.1976.
- FREITAS, R.F. **Fungos associados a grãos de café (*Coffea arabica* L.) beneficiado de diversos municípios da Região Sul de Minas Gerais..** Lavras:UFLA, 2000. 71p. (Dissertação – Mestrado em Ciências de Alimentos).

- GARRUTI, R. dos S.; GONAGIN, A. Escala de valores para a avaliação da qualidade da bebida do café. *Bragantia*, Campinas, v. 20, n.18, p.557-62, maio, 1961.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas, métodos químicos e físicos para análise de alimentos.** 3 ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1985. v.1, p.190-192.
- KRUG, H.P. Cafés duros. *Revista do Instituto do Café*, São Paulo, v.25, p.636-638, 1940.
- LOEFFLER, T. M.; TEKRONY, D. M.; EGLI, D. B. The bulk conductivity test as na indicator of soybean quality. *Journal of Seed Technology*, Lansing, v.12, n.1, p.37-53, 1988.
- LOPES, L. M. V. **Avaliação da qualidade dos grãos crus e torrados de cultivares de cafeeiros (*Coffea arabica* L.).** Lavras: UFLA, 2000.110p. (Dissertação - Mestrado em Ciências de Alimentos).
- MAZZANI, C. Hongos associados a granos de cereales almacenados en venezuela. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE MICOTOXICOLOGIA, 1.; ENCONTRO NACIONAL DE MICOTOXINAS, 8., 1994, Rio de Janeiro. *Anais ...* Rio de Janeiro: Editora, 1994.p.58-60.
- MEIRELLES, A M. A. **Ocorrência e controle da microflora associada aos frutos de café (*Coffea arabica* L.) provenientes de diferentes localidades do estado de Minas Gerais.** Lavras :UFLA, 1990, 71p.(Dissertação - Mestrado em Fitotecnia)
- MENEZES, H.C. **Variação dos monoisômeros e diisômeros do ácido cafeoilquímico com maturação de café.** Campinas: UNICAMP, 1990. 171p. (Tese -Doutorado em Ciências de Alimentos)
- MISLIVEC, P. B.; BRUCE, V. R.; GIBSON, R. Incidence of toxigenic and other molds in green coffee beans. *Journal of Food Protection*, Washington, v.46, n.11, p.969-973,1983.
- NEERGAARD, P. **Seed pathology.** London: MacMillan Press, 1977. 2v. 1191p.

- NELSON, N. A photometric adaptation of Somogy method for determination of glucose. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.153, n.1, p.375-384, 1944.
- OLIVEIRA, J. C.; AMORIM, H. V.; SILVA, D. M.; TELXEIRA, A. A. Atividade enzimática da polifenoloxidase de grãos de quatro espécies de café durante o armazenamento. **Científica**, Jaboticabal, v.4, n.2, p.114-119, 1976.
- PONTING, J. D.; JOSLYNG, M. A. Ascorbic acid oxidation and browning in apple tissue extracts. **Archives of Biochemistry**, New York, v.19, p.47-63, 1948.
- PRETE, C. E. C. **Condutividade elétrica do exsudado de grãos de café (*Coffea arabica* L.) e sua relação com a qualidade da bebida**. Piracicaba: ESALQ, 1992. 125p. (Tese - Doutorado em Fitotecnia).
- SAMSON, R. A.; HOEKSTRA, E. S.; FRISVAD, J. C.; FILTENBORG, O. **Introduction to foodborne fungi**. 4.ed. Baam, Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 1995. 332p.
- SAS Institute. **SAS technical report SAS/TAT software: changes and enhancement release 607**. Cary Nc.: SAS Institute, 1992.
- SILVA, C. F. **Diversidade microbiana em grãos de café (*Coffea arabica* L.) processados por via seca nas fases pré e pós colheita**. Lavras: UFLA, 2000. 125p. (Dissertação - Mestrado em Ciências de Alimentos).
- SILVA, F. A. N.; FREITAS, R. F.; MACHADO, J.C.; CHALFOUN, S.M. População fúngica associada a frutos de café (*Coffea arabica* L.) durante as fases pré e pós colheita, e sua relação com a qualidade de bebida. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 24.**, 1998, Poços de Caldas. **Resumos...** Poços de Caldas: IBC, 1998.p.23-24.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Analisando o trabalho como uma pesquisa única, a qual objetivou fornecer informações que possam contribuir para a melhoria da qualidade do café brasileiro, podemos concluir que certas espécies fúngicas associadas aos grãos podem afetar algumas características químicas do produto final, diminuindo conseqüentemente a qualidade do café, confirmando a importância de se conhecer a associação entre fungos e grãos e estudar maneiras de controlá-los.

Verificou-se que os micronutrientes cobre, boro, zinco e manganês, aplicados isoladamente, podem reduzir a incidência de fungos associados aos grãos, entretanto, por se tratar de um ensaio de campo sujeito as variações ambientais, como chuva ou estiagem no período da floração e frutificação; chuva de granizo no período de frutificação; ataque de insetos os quais podem predispor às plantas à associação fúngica; ou mesmo a presença de outros microorganismos patogênicos, sugerimos que este ensaio seja repetido por pelo menos três anos agrícolas, testando inclusive novas dosagens dos micronutrientes utilizados neste ensaio.

Com relação ao estudo dos fungos associados aos grãos de café em diferentes cultivares, um próximo passo para elucidar as diferenças observadas entre as cultivares seria realizar a inoculação dos fungos comumente detectados em associação com grãos de café em lavouras instaladas para este fim, especialmente os fungos potencialmente toxigênicos e aqueles que exercem influência direta no sabor, aroma e odor, afetando sobremaneira a qualidade final do produto.

Pode-se verificar também que o despulpamento, de uma maneira geral, não reduziu a ocorrência dos fungos associados aos grãos, evidenciando que esta via de processamento não constitui condição essencial para produzir cafês de qualidade superior.

Neste estudo a ocorrência de Ocratoxina A não foi verificada nas diferentes amostras analisadas, mesmo quando se verificou a ocorrência de fungos potencialmente toxigênicos. Entretanto, para um próximo trabalho seria recomendável o estudo do potencial toxigênico destes fungos.

Observou-se, neste trabalho, alta incidência de *Aspergillus ochraceus* na cultivar Apoatã, uma variedade de *Coffea canephora* L. Este fato pode sugerir que esta espécie de café é mais suscetível a um fungo potencialmente toxigênico. Sugerimos maiores investigações quanto a este aspecto.

ANEXOS

CAPÍTULO II

ANEXO 1	Página
<p>TABELA 1 A Resumo da análise de variância dos dados referentes à incidência fúngica em amostras de grãos de café beneficiado, pulverizados com micronutrientes sob a transformação de $\sqrt{x+0,5}$</p>	148
<p>TABELA 2 A Resumo da análise de variância dos dados referentes à incidência fúngica em amostras de grãos de café beneficiado, desinfestados com NaOCl, pulverizados com micronutrientes sob a transformação de $\sqrt{x+0,5}$</p>	148
<p>TABELA 3 A Resumo da análise de variância para lixiviação de potássio, condutividade elétrica, atividade da polifenoloxidase (PFO) e fenólicos totais em amostras de grãos de café crus de beneficiados pulverizados com micronutrientes.....</p>	148

TABELA 1A Resumo da análise de variância dos dados referentes à incidência fúngica em amostras de grãos de café beneficiado, pulverizados com micronutrientes, sob a transformação $\sqrt{x + 0,5}$.

Fonte de variação	GL	Quadrado Médio			
		<i>F. semitectum</i>	<i>P.variable</i>	<i>A.ochraceus</i>	<i>C. cladosporioides</i>
Tratamentos	11	2.368022 *	3.758153*	23.85051**	1.012732*
Erro	36	0.712275	1.616693	1.05570	0.263925
CV (%)		10.76	16.32	21.83	5.71

** Teste F significativo a 1% de probabilidade

* Teste F significativo a 5% de probabilidade

TABELA 2A Resumo da análise de variância dos dados referentes à incidência fúngica em amostras de grãos de café beneficiado, desinfetados com NaOCl pulverizados com micronutrientes, sob a transformação $\sqrt{x + 0,5}$.

Fonte de variação	GL	Quadrado Médio			
		<i>F. semitectum</i>	<i>P.variable</i>	<i>A.ochraceus</i>	<i>C. cladosporioides</i>
Tratamentos	11	12.269013 *	13.55614*	28.85051**	11.012732*
Erro	36	1.032264	1.616693	2.05562	1.243936
CV (%)		12.74	6.42	11.63	8.65

** Teste F significativo a 1% de probabilidade

* Teste F significativo a 5% de probabilidade

TABELA 3A Resumo da análise de variância para lixiviação de potássio, condutividade elétrica, atividade da polifenoloxidase (PFO) e fenólicos totais em amostras de grãos crus beneficiados de café (pulverizados com diferentes micronutrientes).

Fonte de variação	GL	Quadrado Médio			
		Lixiviação de Potássio	Condutividade elétrica	Atividade PFO	Fenólicos Totais
Tratamentos	11	58.78005**	3883.901**	8.31547 **	1.02352**
Erro	36	1.35544	26.664	0.275377	0.029319
CV (%)		2.45	2.56	0.84	12.31

* Teste F significativo a 1% de probabilidade

CAPÍTULO III

ANEXO 2

Página

TABELA 1 A	Resumo das análises de variância para incidência dos fungos associados a amostras de café cru, não desinfestados com NaOCl, processadas por via seca e úmida, em 5 cultivares de café, dados transformados $\sqrt{x + 0,5}$	150
TABELA 2 A	Resumo das análises de variância para incidência dos fungos associados a amostras de café cru, desinfestados com NaOCl, processadas por via seca e úmida, em 5 cultivares de café, dados transformados $\sqrt{x + 0,5}$	151
TABELA 3 A	Resumo das análises de variância referentes a incidência dos fungos associados aos grãos de café em cada cultivar, dados transformados $\sqrt{x + 0,5}$	152

TABELA 1A Resumos das análises de variância para incidência dos fungos associados a amostras de café cru, não desinfestados com NaOCl, processadas por via seca e úmida, em 5 cultivares de café. Dados transformados $\sqrt{x + 0,5}$.

Fonte de variação	GL	Quadrado Médio							
		<i>Fusarium semitectum</i>	<i>Fusarium equiseti</i>	<i>Penicilium variable</i>	<i>Penicillium rugulosum</i>	<i>Penicillium Funiculosm</i>	<i>Aspergillus ochraceus</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Cladosporium</i>
Cultivar	4	62.870**	61.745**	95.39**	83.64**	63.97**	25.39**	1.86 *	20.14 ns
Tegumento	1	71.810**	156.9 **	32.68**	16.46 ns	9.81*	71.87 **	1.27 ns	59.17 *
Cul*Teg	4	5.8535 ns	3.98 ns	8.09 ns	8.86 ns	9.81 *	10.41 ns	1.15 ns	18.03 ns
Blocos	3	0.2300 ns	9.18 ns	1.22 ns	0.32 ns	0.04 ns	2.39 ns	0.72 ns	0.791 ns
Tratamentos	12	29.412**	36.38***	39.55 **	34.28 **	27.06 **	18.43 **	1.10 ns	18.02 ns
Erro	57	5.0502	8.2278	6.59	4.59	2.40	5.36	0.73	15.25 ns
CV(%)		60.90	58.72	78.09	88.98	94.03	70.73	76.10	69.03

** Teste F significativo a 1% de probabilidade

* Teste F significativo a 5% de probabilidade

TABELA 2A Resumos das análises de variância para incidência dos fungos associados a amostras de café cru, desinfestados com NaOCl, processadas por via seca e úmida, em 5 cultivares de café. Dados transformados $\sqrt{x + 0,5}$.

Fonte de variação	GL	Quadrado Médio							
		<i>Fusarium semitectum</i>	<i>Fusarium equiseti</i>	<i>Penicilium variable</i>	<i>Penicillium rugulosum</i>	<i>Penicillium Funiculosum</i>	<i>Aspergillus ochraceus</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Cladosporium</i>
Cultivar	4	82.860*	62.625**	65.27**	94.74**	73.57**	25.49**	0.86 *	30.14 ns
Posição	1	92.511**	187.5 **	62.59**	36.56 ns	10.51*	41.47 **	0.97 ns	47.17 *
Cul*Posição	4	35.8535 ns	6.98 ns	11.84 ns	13.46 ns	12.83 *	12.61 ns	0.35 ns	28.13 ns
Blocos	3	0.2300 ns	12.18 ns	2.32 ns	0.85 ns	0.84 ns	3.49 ns	0.22 ns	0.781 ns
Tratamentos	12	47.423**	66.47**	49.45 **	44.37 **	36.06 **	22.33 **	0.80 ns	18.02 ns
Erro	57	5.1911	9.3254	5.49	5.29	3.50	4.26	0.33	15.25 ns
CV(%)		49.90	48.62	48.09	58.68	44.13	40.73	36.20	69.03

* Posição: Desinfecção superficial com hipoclorito de sódio (1%)

** Teste F significativo a 1% de probabilidade

* Teste F significativo a 5% de probabilidade

TABELA 3A Resumos das análises de variância referentes a incidência dos fungos associados aos grãos de café em cada cultivar, dados transformados $\sqrt{x + 0,5}$.

Fonte de variação	GL	Quadrado Médio				
		Acaiá	Mundo Novo	Icatu	Catuaí	Rubi
Modelo	7	65.23**	88.96 **	72.58**	87.45**	45.67**
Erro	57	4.56	5.32	4.68	5.21	5.11
CV(%)	52.9	56.3	47.02	54.2	49.3	48.4

- Teste F significativo a 1% de propabilidade

ANEXO 3

ANEXO 3

Página

1 Determinação de açúcares totais redutores e não redutores.....	154
1.1 Extração.....	154
1.2 Desproteínização do amido, glicose e sacarose.....	154
1.3 Determinação do amido, glicose e sacarose.....	154
2 Cafeína.....	155
3 Acidez titulável.....	155
4 Lixiviação de potássio e condutividade elétrica.....	155
5 Atividade enzimática da polifenoloxidase.....	156
6 Fenólicos totais.....	156
7 Determinação da ocratoxina A.....	157
7.1 Extração.....	157
7.2 Purificação.....	157
7.3 Separação detecção e quantificação.....	158

1 Determinação de açúcares totais, redutores e não redutores:

1.1 Extração:

- ⇒ Pesar 2 gramas da amostra de café, colocar 50 ml de H₂O destilada e levar por 2 horas no agitador
- ⇒ Da extração da glicose retirar 5 ml, coloca-los em um erlenmeyer de 125 ml, adicionar 0.5 de HCl concentrado, deixar em banho maria fervente durante 15 minutos
- ⇒ Esfriar e neutralizar com solução de carbonato de sódio, completar o volume para 50 ml de água destilada
- ⇒ Usar a solução para desprotenização

1.2 Desprotenização do Amido, Glicose e Sacarose

- ⇒ Retirar 3 ml da extração, e pipetá-los em 3 tubos de ensaio
- ⇒ Adicionar 1,2 ml de solução de ZnSO₄ (0.5%)
- ⇒ Adicionar 1.2 ml de solução de Ba(OH)₂ (3N)
- ⇒ adicionar 9 ml de água destilada
- ⇒ Filtrar

1.3 Determinação do Amido, Glicose e Sacarose

- ⇒ Colocar 2 ml do filtrado em tubos de ensaio, em seguida adicionar 1 ml do Reativo cúprico e cobrir com papel alumínio
- ⇒ Deixar em banho Maria Fervente por 20 minutos
- ⇒ Colocar 1 ml de arsenomolibdato e esfriar com banho de gelo
- ⇒ Adicionar 6 ml de água destilada
- ⇒ Fazer a leitura a 510 nm

2 Cafeína

- ⇒ Pesar 2 g da amostra e adicionar lentamente 4 ml de H_2SO_4
- ⇒ Aquecer em banho maria a 60°C por 15 minutos
- ⇒ Adicionar 50 ml de água destilada fervente
- ⇒ Aquecer por 15 minutos
- ⇒ Filtre a quente e coloque o filtrado em um funil de separação
- ⇒ Adicionar 50 ml de clorofórmio, após a separação em camadas, filtrar o clorofórmio que está na camada inferior, repita este procedimento por 3 vezes
- ⇒ Evaporar no rota-vapor, em seguida na estufa
- ⇒ Após secagem retire os balões da estufa e lave com água quente, a água da lavagem deverá ser colocada em balão de 1000ml
- ⇒ Fazer a leitura a 274 nm com a água da lavagem

3 Acidez titulável

- ⇒ Pesar 2 g da amostra e adicionar 50 ml de H_2O destilada
- ⇒ Agitar por 1 hora, filtrar em papel de filtro
- ⇒ Retirar 5 ml do filtrado, coloca-lo em erlenmeyer e adicionar 50 ml de H_2O destilada
- ⇒ Acrescentar 3 gotas de fenolftaleína
- ⇒ Titular com NaOH 0.1 N

4 Lixiviação de Potássio e Condutividade Elétrica

- ⇒ Contar e pesar 50 grãos de café, acondicioná-los em recipientes plásticos, sobre suporte contendo água deionizada
- ⇒ Colocar de 10 em 10 amostras na estufa ventilada a 25°C
- ⇒ Após 30 minutos fazer a leitura no Fotômetro de Chama e Condutivímetro.
- ⇒ As análises devem ser realizadas de 30 em 30 minutos durante 5 horas.

5 Atividade enzimática da polifenoloxidase

- ⇒ Pesar 5 g da amostra
- ⇒ Adicionar 40 ml do tampão fosfato de potássio 0.1 M pH 6.0 agitando por 5 minutos (manter sob refrigeração)
- ⇒ Filtrar a vácuo utilizando papel Whatman n^o 1
- ⇒ Colocar em um tubo de ensaio 1 ml da amostra, 1 ml de glicina e 3 ml de Dopa
- ⇒ Preparar o Branco com 1 ml de amostra e 4 ml de H₂O
- ⇒ Colocar as amostras em banho maria a 60 ° C por 60 minutos
- ⇒ Fazer a leitura a 420 nm

6 Fenólicos Totais

- ⇒ Pesar 1 g da amostra de café
- ⇒ Adicionar 50 ml de metanol 50%
- ⇒ Levar a chapa aquecedora, após entrar em ebulição marcar 15 minutos, deixar até que a temperatura reduza de 200 para 100 ° C.
- ⇒ Filtrar em papel de filtro whatman n^o 12
- ⇒ Retornar o resíduo dopaple para o erlenmeyer, adicione 40 ml de metanol, levando novamente até a chapa aquecedora
- ⇒ Repetir este procedimento por mais 2 vezes
- ⇒ Após realizada as 3 repetições levar os Becker onde foram recolhidos os filtrados e conduzi-lo a chapa aquecedora até atingir o volume de 5 ml, completar para 200 ml de água destilada.
- ⇒ Tomar 0,1 ml do filtrado obtido , acrescentar 8.4 ml de água, 0.5 ml de Folen Denis e 1,0 ml de Carbonato de sódio
- ⇒ Para o preparo do branco, utilizar : 8.5 ml de H₂O, 0.5 de Folen Denis, e 1, ml de carbonato de Sódio, aguardar 30 minutos antes de realizar a leitura
- ⇒ Fazer a leitura a 760 nm

7 Determinação de Ocratoxina A

7.1 Extração

- ⇒ Pesar 25 g da amostra de café, previamente triturada em frasco tipo Mason
- ⇒ Adicionar 200 ml de solução de metanol bicarbonato de sódio 3% (1:1)
- ⇒ Incorporar a solução com agitação por 10 minutos em homogenizador de amostras
- ⇒ Filtrar em papel de filtro tipo Whatman no 4 plegado
- ⇒ Recolher e filtrar através de membrana de fibra de vidro Whatman à vácuo
- ⇒ Pipetar 10 ml do filtrado e transferir para um balão de 100 ml
- ⇒ Completar o volume com solução tampão PBS e homogeneizar

7.2 Purificação

- ⇒ Adaptar uma seringa de plástico de 50 ml à coluna de imunoafinidade Ochratest, utilizando um adaptador, conectá-la a um sistema de filtração à vácuo com controle individual de fluxo.
- ⇒ Transferir todo o conteúdo do balão para a coluna e deixar passar através desta com fluxo de 2 a 3 ml por minuto.
- ⇒ Lavar a coluna com 10 ml de água deionizada, utilizando pipeta Pasteur.
- ⇒ Eluir a ocratoxina com 4 ml de metanol grau HPLC, utilizando pressão positiva, controlando o fluxo através do embolo da seringa (2-3 ml/min)
- ⇒ Evaporar em banho maria a 40 °C sobre fluxo de nitrogênio

7.3 Separação Detecção e Quantificação

- ⇒ Recuperar os resíduos obtidos na purificação com 300 ml de metanol/ á acético e homogeneizar com agitador
- ⇒ Injetar com microsseringas no cromatógrafo líquido as soluções padrões ocratoxina nas condições cromatográficas específicas para determinação ocratoxina A.
- ⇒ Com base na curva padrão de calibração, calcular as concentrações ocratoxinas presente nas amostras.