

OCORRÊNCIA E SEVERIDADE DA CONTAMINAÇÃO DE GRÃOS DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.) POR FUNGOS DO GÊNERO *ASPERGILLUS* EM DIVERSAS PROPRIEDADES DO SUL DE MINAS GERAIS¹

Renil Franklin de FREITAS, UFLA, e-mail reilff@ufla.br, Ludwig Heinrich PFENNING, UFLA; Sára Maria CHALFOUN, EPAMIG-CTSM; Luís Roberto BATISTA, UFLA; Terezinha de Jesus Abenassiff Ferreira MAIA, UFLA; Angela de Fátima Carvalho SANTOS, UFLA.

RESUMO: Muitos fungos infectam os grãos de café alterando a qualidade quanto ao sabor e aroma. Várias espécies do gênero *Aspergillus* tem a habilidade de produzir toxinas deletérias à saúde humana como a ocratoxina. Um total de 68.000 grãos de café foram analisados com o objetivo de estudar a ocorrência e a severidade de contaminação por espécies do gênero *Aspergillus*. Amostras de 200 grãos de café coletadas em 170 propriedades localizadas na região sul de Minas Gerais foram desinfestadas com hipoclorito de sódio a 1%, permitindo assim a identificação de fungos contaminantes do interior dos grãos. Os grãos de café foram incubados segundo a técnica *blotter test*. As colônias formadas na superfície dos grãos foram expressas pelo Índice de Severidade de Contaminação (ISC) de acordo com uma escala de notas. Foram identificadas as espécies *Aspergillus niger*, *Aspergillus tamarii*, *A. flavus*, *A. parasiticus*, *Aspergillus ochraceus*, *A. sclerotiorum*, *A. sulphureus* e *A. melleus*. Entre os isolados do grupo do *Aspergillus glaucus* foram identificados os teleomorfos *Eurotium herbariorum* e *Eurotium amstelodami*. A diferenciação dos *Aspergillus* foi baseada na coloração e no aspecto visual das colônias. Todos os isolados de esporulação marrom café a negra foram identificados como *A. niger*. Todos isolados de esporulação marrom esverdeado foram identificados como *A. tamarii*. Para estas duas espécies houve correspondência entre a leitura direta das colônias formadas nos grãos de café. Colônias com massa de conídios amarelos formaram o grupo de *A. ochraceus*, as de conídios verdes o grupo do *A. flavus* e as de conídios de cor cinza o grupo *A. glaucus*. A espécie *A. niger* apresentou maior severidade de contaminação interna dos grãos de café com valor médio de 14,76%, em seguida os grupos de *A. glaucus* e de *A. ochraceus*, com 2,81% e 1,83%, respectivamente. Ocupando menores ISC interna aparece o grupo de *A. flavus* com 0,36% e a espécie *A. tamarii* com 0,26%. Foi determinada diferença altamente significativa ($p < 0,001$) com relação à contaminação de *Aspergillus niger*, espécies do grupo *A. ochraceus* e do *A. glaucus*, podendo dizer que existe influência do efeito do local de cultivo. Houve diferença entre os períodos de colheita com relação aos ISC da espécie *A. niger*, das espécies do grupo *A. ochraceus* e do grupo *A. glaucus*. A espécie *A. niger* e o grupo *A. ochraceus* tiveram maiores ISC durante o período de seca. O grupo *A. glaucus* teve maior ISC na fase inicial do período de colheita C/S, quando comparada com outras fases as chuvas.

PALAVRAS-CHAVE: Café, Fungos, *Aspergillus*, Severidade de Contaminação, Qualidade, Ocratoxina

ABSTRACT: Many fungi infect the grains of coffee altering the flavor and aroma quality. Several species of *Aspergillus* genus have the ability to produce deleterious toxins to the human health as the ochratoxina. A total of 68,000 green coffee beans were analyzed with the objective of studying the occurrence and severity of contamination by species of *Aspergillus*. Samples of 200 green coffee beans collected in 170 properties located in the south region of Minas Gerais were superficially desinfested in order to allow the identification of the inner fungi contaminants of coffee beans. The coffee beans were incubated according to the technical *blotter test*. The colonies formed in the surface of the grains were expressed by the Index of Severity of Contamination (ISC) in agreement with a scale of notes. The species *Aspergillus niger*, *Aspergillus tamarii*, *A. flavus*, *A. parasiticus*, *Aspergillus ochraceus*, *A. sclerotiorum*, *A. sulphureus* and *A. melleus* were identified. Among the isolates of the group of *A. glaucus* were identified the teleomorphs the *Eurotium herbariorum* and *Eurotium amstelodami*. The differentiation of *Aspergillus* spp. was based on the coloration and visual aspect of the colonies. All isolated of brown coffee to black sporulation were identified as *A. niger*. All isolated of green-brown sporulation were identified as *A. tamarii*. Colonies with yellow conidia mass formed the *A. ochraceus* group, and one with green conidia mass formed *A. flavus* group and one with gray conidia formed *A. glaucus* group. The specie *A. niger* showed larger severity of internal contamination of green coffee beans with medium value of 14,76%, the *A. glaucus* group and the *A.*

¹poio financeiro: CONSÓRCIO BRASILEIRO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DO CAFÉ, PROGRAMA DE REGIONALIZAÇÃO DA QUALIDADE DO CAFÉ DA REGIÃO SUL DE MINAS GERAIS-BIOEX-CNPq

ochraceus group had values of 2,81% and 1,83%, respectively. The *A. flavus* group lower ISC, with 0,36%. There differences were highly significant ($p < 0,001$) with relationship to the contamination of *A. niger*, species of *A. ochraceus* group and *A. glaucus* group, suggesting the effect of the cultivation place. Differences between crop periods and ISC of the specie *A. niger*, *A. ochraceus* group and *A. glaucus* was observed group. The specie *A. niger* and the group *A. ochraceus* had larger ISC during dry period. The *A. glaucus* group had larger ISC during initial crop phase than other phases.

INTRODUÇÃO

Os fungos podem produzir substâncias prejudiciais à qualidade de bebida do café. O sabor e aroma do café podem ser alterados pela presença de espécies de *Aspergillus* responsáveis pelo sabor amargo desagradável. Muitos dos fungos que infectam os grãos de café podem produzir componentes tóxicos que provocam diversos problemas de saúde no homem e em animais. Espécies toxigênicas podem ser encontradas em todos os principais grupos de fungos, sendo o gênero *Aspergillus* o mais importante. Entre as micotoxinas produzidas pelas espécies desse gênero está a ocratoxina A (OTA). O grau de contaminação interna pode ser um indicador do nível de risco já existente nos grãos de café. Qualquer variação ambiental favorável ao desenvolvimento dos fungos terá como consequência algum prejuízo cuja gravidade dependerá da espécie fúngica envolvida. Várias espécies produtoras de esporulação amarela tipificado por *Aspergillus ochraceus* são potencialmente produtoras de ocratoxina A, tais como *Aspergillus mellus*, *A. petraki*, *A. ochraceus*, *A. alliaceus*, *A. sclerotiorum*, *A. sulphureus*, *A. albertensis*, *A. auricomus* e *A. wentii*. Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de se conhecer a ocorrência e grau de severidade da infestação de fungos do gênero *Aspergillus* em grãos de café de diversas propriedades cafeeiras.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de café beneficiado foram coletadas em 170 propriedades cafeeiras de 17 municípios da região Sul de Minas Gerais. Cada amostra foi constituída de 400 grãos de café. Um total de 68.000 grãos de café foram analisados individualmente quanto à contaminação por *Aspergillus* spp. De cada amostra 200 grãos foram desinfestados superficialmente com hipoclorito de sódio 1%, permitindo assim, identificar os fungos que realmente invadiram os grãos e, 200 grãos sem desinfestação permitiram conhecer a população fúngica externa representando a fonte de inóculo em potencial presente na superfície dos grãos de café. Para exteriorização dos fungos nos grãos de café foi utilizada a técnica *Blotter test* (Tempe, 1963). As observações das colônias formadas pelos fungos foram realizadas a olho nú ou quando necessário com ajuda de lupa. Os resultados foram expressos em Índice de Severidade de Infestação (ISC). A severidade de infestação se refere à área da superfície do grão de café ocupada pela colônia do fungo e foi determinada através da escala de notas de Prabhu e Bedendo (1988) adaptada para este estudo. Nota 0 = sem formação de colônias evidentes, nota 1 = colônias ocupando até 25% da superfície do grão; nota 2 = colônias ocupando 26 a 50%, nota 3 = colônias ocupando 51 a 75% e nota 4 = colônias ocupando mais de 75% da superfície do grão. Foi calculado o ISC pela seguinte fórmula:

$$ISC = \frac{\sum (\text{Nota} * IO)}{n * \text{Nota máxima}}$$

ISC = índice de severidade de infestação

I.O = índice de ocorrência de sementes contaminadas

n = número de grãos analisados

A presença de fungos juntamente com o grau de severidade de contaminação das colônias nos grãos, foram determinadas pelo ISC. Os dados necessitaram de transformação do tipo \sqrt{x} , afim de que fossem normalizados. Os valores do ISC para cada espécie assinalada foram considerados como uma variável. Os testes de hipótese para cada fator foram conduzidos por meio de análises de variância. Considerando os efeitos principais desses fatores, o modelo adotado não incluía nenhuma espécie de controle local, como bloco, por trata-se essencialmente de um trabalho de observação. Após a análise de variância, com vistas a ordenar os níveis dos fatores avaliados, foi realizado o teste de comparação múltipla de Duncan, assim eleito devido à própria natureza dos dados, já que estes foram provenientes de contagens e sensibilidade. O nível de significância, tanto para as análises de variância quanto para os testes de comparação múltipla, obedeceram ao nível de significância de 5%.

Para a identificação, os isolados do gênero *Aspergillus* foram incubados em meios CYA (*Czapek yeast agar*) a 25 e 37°C, MEA (*malt extract agar*) e CY20S (*Czapek yeast agar*, com 20% de sacarose), ambos a 25°C. A classificação de *Aspergillus* tem como base a presença ou ausência de métulas, o arranjo das métulas na

vesícula e a cor das colônias dada pela massa de conídios (Klich & Pitt, 1988). Para determinação das espécies foram utilizadas características micromorfológicas como formato e tamanho dos conídios, textura da parede dos conidióforos e dos conídios, disposição dos conídios em relação à vesícula, tamanho das vesículas e características macromorfológicas como taxa de crescimento em vários meios de cultura e diferentes temperaturas, coloração e textura das colônias em meio de cultura e formação de escleródios (Klich & Pitt, 1988; Raper & Fennell, 1965) Varga *et al.*, 1996).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A diferenciação de *Aspergillus* dos outros gêneros exteriorizados nos grãos de café foi realizada com base na coloração e aspecto superficial das colônias. Todos os isolados de esporulação marrom café a negra foram identificados como *Aspergillus niger*. Todos isolados de esporulação marrom esverdeado foram identificados como *Aspergillus tamarii*. Entre os isolados de coloração verde a verde amarelada foram identificadas as espécies *A. flavus*, *A. parasiticus*. Entre os isolados de coloração ocre a amarela foram identificadas as espécies *Aspergillus ochraceus*, *A. sclerotiorum*, *A. sulphureus* e *A. melleus*. Entre os isolados do grupo de *Aspergillus glaucus* foram identificados os teleomorfos *Eurotium herbariorum* e *Eurotium amstelodami*. A distinção das colônias nos grãos de café não foi possível para as de coloração verde, amarela e cinza, sendo agrupadas de acordo com as espécies de maior ocorrência. Colônias com massa de conídios amarelos foram designadas como grupo de *A. ochraceus*, as de coloração verde como do grupo de *A. flavus* e as de coloração cinza como do grupo de *A. glaucus*. Considerando 5% de contaminação interna dos grãos de café beneficiado como referência, foi observado que, para cada fungo, os percentuais foram 88,7%; 39,9%; 39,3%; 10,7% e 5,3% para *A. niger*, grupo *A. glaucus*, grupo *A. ochraceus*, grupo *A. flavus* e *A. tamarii*, respectivamente. A espécie *A. niger* apresentou maior severidade de contaminação interna dos grãos de café com valor médio de 14,76%, em seguida os grupos *A. glaucus* e *A. ochraceus*, com 2,81% e 1,83%, respectivamente. Ocupando menores ISC interna aparece o grupo *A. flavus* com 0,36% e a espécie *A. tamarii* com 0,26% (Tabela 1).

FUNGOS	Índice de Severidade de Contaminação- ISC (%) Média±EP
<i>A. niger</i>	14,76±0,69
Grupo <i>A. glaucus</i>	2,81±0,26
Grupo <i>A. ochraceus</i>	1,83±0,19
Grupo <i>A. flavus</i>	0,36±0,08
<i>A. tamarii</i>	0,26±0,08

Tabela 1. Médias acrescidas de erro padrão e índice de severidade de contaminação (%) para as amostras desinfestadas.

Foi determinada diferença altamente significativa ($p < 0,001$) com relação à contaminação das diversas espécies e grupos de fungos, podendo dizer que existe influência do efeito do local de cultivo.

Para *A. niger* os municípios de Santa Rita do Sapucaí, Lavras, Machado, Campos Gerais e Botelhos apresentaram índices de ISC mais elevados, em média 28%. Para o grupo *A. glaucus*, os municípios de Guaxupé, Ouro Fino, São Sebastião do Paraíso e Santa Rita do Sapucaí apresentaram os maiores ISC, em torno de 6,5%. Para o grupo *A. ochraceus*, os municípios de Machado, Lavras, Nepomuceno e Boa Esperança apresentaram os maiores ISC em torno de 5% (Figura 1). Os fungos *A. tamarii* e o grupo *A. flavus* apresentaram ISC mais reduzidos, o primeiro obteve maiores valores no município de Machado e o último nos municípios de Machado, Botelhos e Lavras (dados não mostrados).

Houve diferença entre os períodos de colheita com relação aos ISC da espécie *A. niger*, do grupo *A. ochraceus* e do grupo *A. glaucus*. *A. tamarii* não apresentou diferença significativa para índices de severidade de contaminação entre os períodos de colheita. A espécie *A. niger* e o grupo *A. ochraceus* tiveram maiores ISC durante o período seca. O grupo *A. glaucus* teve maior ISC na fase inicial do período de colheita C/S, quando comparada com outras fases as chuvas (Figura 2).

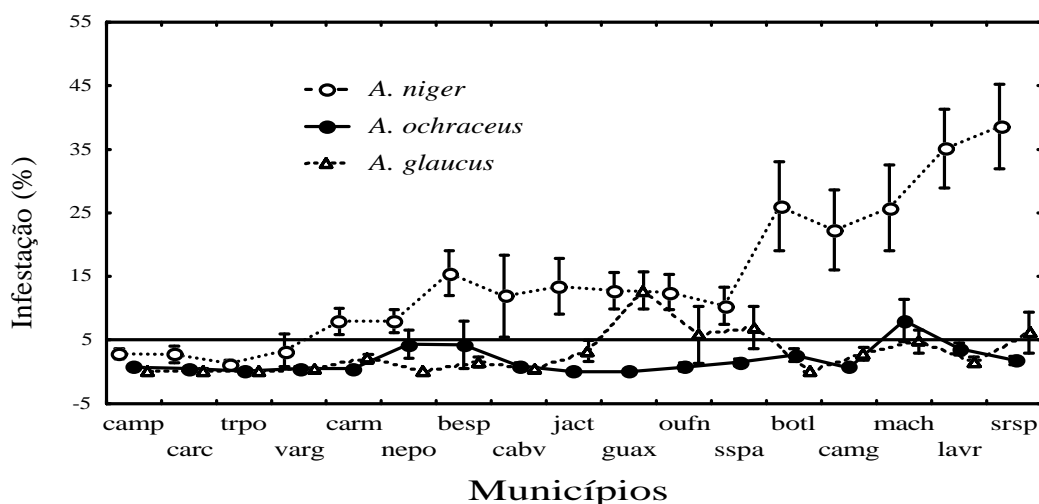


Figura 1. Valores médios e intervalo de confiança de 95% para os municípios avaliados, quanto ao grau de severidade de contaminação (%) de *A. niger*, *A. ochraceus* e *A. glaucus*.

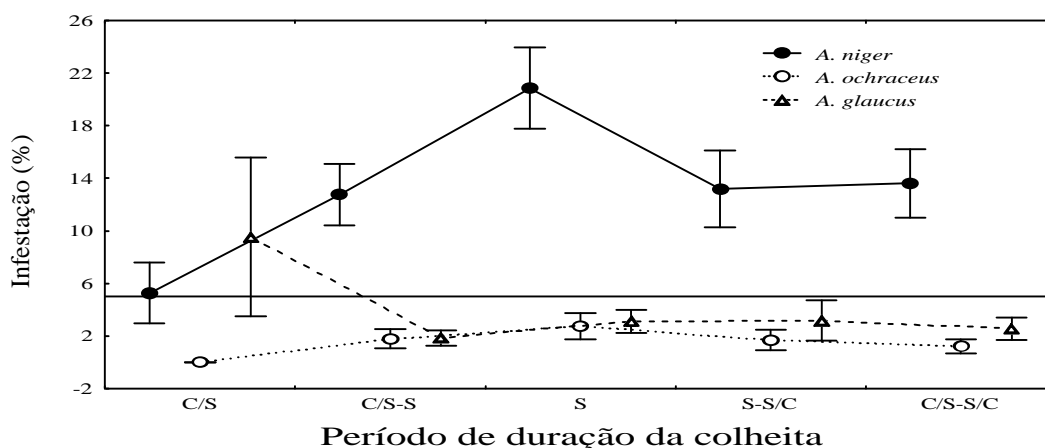


Figura 2. Valores médios e intervalo de confiança de 95% para os períodos de pluviosidade na época da colheita, quanto ao grau de severidade de contaminação (%) de *A. niger*, *A. ochraceus* e *A. glaucus*.

CONCLUSÕES

A contaminação interna dos grãos de café por *Aspergillus* é variável, havendo alternância de predominância de espécies ou grupos, porém não é possível detectar correlação com alguma características da colheita ou do manejo pós colheita do café. Por outro lado, é observado que maiores ISC para todas espécies e grupos de fungos estudados ocorrem nas propriedades amostradas em Boa Esperança, Lavras, São Sebastião do Paraíso, Machado, Campos Gerais e Santa Rita do Sapucaí. Os menores ISC ou nenhuma contaminação ocorrem em Três Pontas, Carmo do Rio Claro, Varginha e Campestre. A subdivisão do período de colheita do café em fases de acordo com a intensidade de chuvas evidencia que o grupo *A. glaucus* apresenta maior ISC no início do período de colheita quando ainda há maior umidade no ambiente, e *A. niger* e o grupo *A. ochraceus* apresenta maior ISC no período de colheita com menor umidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- KLICH, M.A.; PITT, J.I. A Laboratory guide to common *Aspergillus* species and their teleomorphs. North Ryde, Australia: CSIRO, 1988. 116 p.
- RAPER, K.B.; FENNELL, D.I. The Genus *Aspergillus*. Baltimore, MD: Williams & Wilkins.1965. 645p.
- VARGA, J.; KEVEI, E.; RINYU, E.; TEREN, J.; KOZAKIEWICZ, Z. Ochratoxin production by *Aspergillus* species. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v.62, n.12, p.432-488, 1996.
- PRABHU, K.B.; BEDENDO, I.P. Glume blight of rice in Brazil: etiology, varietal reaction and loss estimates. Tropical Pest Management, London, v.34, n.1, p.85-88, Jan/Mar. 1988.

AVISO

ESTA PUBLICAÇÃO PODE SER ADQUIRIDA NOS
SEGUINTE ENDEREÇOS:

FUNDAÇÃO ARTHUR BERNARDES

Edifício Sede, s/nº. - Campus Universitário da UFV
Viçosa - MG
Cep: 36571-000
Tels: (31) 3891-3204 / 3899-2485
Fax : (31) 3891-3911

EMBRAPA CAFÉ

Parque Estação Biológica - PqEB - Av. W3 Norte (Final)
Edifício Sede da Embrapa - sala 321
Brasília - DF
Cep: 70770-901
Tel: (61) 448-4378
Fax: (61) 448-4425