



***INFLUÊNCIA DA SEPARAÇÃO DE GRÃOS DE CAFÉ
(Coffea arabica L.) POR TAMANHO
NA QUALIDADE E OCORRÊNCIA DE OCRATOXINA A***

PATRÍCIA PRADO NASSER

2001

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

Nasser, Patrícia Prado

Influência da separação de grãos de café (*Coffea arabica* L.) por tamanho na
qualidade e ocorrência de ocratoxina A / Patrícia Prado Nasser. --Lavras : UFLA,
2001.

128 p. : il.

Orientadora: Sara Maria Chalfoun de Souza.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Peneira. 2. Micotoxina. 3. Ocratoxina A. 4. Café – Qualidade. 5. *Aspergillus
ochraceus*. 6. Bebida. 7. Cor. 8. Identificação fúngica. I. Universidade Federal
de Lavras. II. Título.

CDD-576.163

-633.73

-663.93

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

Nasser, Patrícia Prado

Influência da separação de grãos de café (*Coffea arabica* L.) por tamanho na qualidade e ocorrência de ocratoxina A / Patrícia Prado Nasser. --Lavras : UFLA, 2001.

128 p. : il.

Orientadora: Sara Maria Chalfoun de Souza.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Peneira. 2. Micotoxina. 3. Ocratoxina A. 4. Café – Qualidade. 5. *Aspergillus ochraceus*. 6. Bebida. 7. Cor. 8. Identificação fúngica. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-576.163

-633.73

-663.93

52584

117137238

PATRÍCIA PRADO NASSER

**INFLUÊNCIA DA SEPARAÇÃO DE GRÃOS DE CAFÉ
(*Coffea arabica* L.) POR TAMANHO NA
QUALIDADE E OCORRÊNCIA DE OCRATOXINA A**

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

Orientadora: Dra Sara Maria Chalfoun de Souza
Co-orientadores: MSc Eugênia Azevedo Vargas
PhD. Mário Lúcio Vilela de Resende

LAVRAS
MINAS GERAIS-BRASIL

2001

PATRÍCIA PRADO NASSER

**INFLUÊNCIA DA SEPARAÇÃO DE GRÃOS DE CAFÉ
(*Coffea arabica* L.) POR TAMANHO NA
QUALIDADE E OCORRÊNCIA DE OCRATOXINA A**

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

APROVADA em 30 de agosto de 2001

Prof Dr^a Rosemary G. F. A. Pereira

UFLA

Prof. PhD. Mário Lúcio Vilela de Resende

UFLA


Dra. Sara Maria Chalfoun de Souza
EPAMIG/Lavras-MG
(Orientadora)

LAVRAS

MINAS GERAIS-BRASIL

$$\frac{T_c}{5} = \frac{T_F - 32}{9}$$

À memória dos vovôs Nasser, Linda, Maria e Lulu.
Ofereço

Vovô Lúcio,
Eu sou muito mais feliz porque você existe!
Obrigada por me incentivar e acreditar tanto em mim!
Dedico

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

A Universidade Federal de Lavras em especial ao Departamento de Ciência dos Alimentos pela grande oportunidade.

A FAPEMIG pela concessão de bolsa durante a execução do curso de mestrado.

A EPAMIG e aos Laboratórios de Fitopatologia e Qualidade do Café Dr. Alcides Carvalho / EPAMIG pelo apoio técnico e por viabilizar a realização deste estudo.

Ao Laboratório de Qualidade e Segurança Alimentar do Ministério da Agricultura pela oportunidade de treinamento e realização das análises de OTA.

A VICAM do Brasil, em especial ao Sr. Ricardo Nery, pela doação das colunas de imunoafinidade utilizadas nas análises de OTA.

Ao Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café pelo apoio.

AGRADECIMENTOS PESSOAIS

Acima de tudo a Deus, a meus pais José Nasser e Berenice que com amor iluminam minha vida!

Aos meus queridos mestres Dr^a. Sara Chalfoun (em especial pela segura orientação), Dalvino Schineider, Hudson Bianchini, Vânia Déa e Maria Helena de Oliveira, pelo carinho, por passarem suas preciosas experiências profissionais!

Aos meus irmãos José Lúcio e Eduardo a minha afilhada Maria Cristina e a meus padrinhos Tia Iêda, Tio Marco Túlio e tio Güi pelo amor, pelo apoio e dedicação que foram imprescindíveis para que eu chegasse até aqui.

A toda minha família pela atenção e incentivo (em especial a tia Cândida) e aos meus amigos: Ana Amélia, Yara, Duda, Rodrigo, Flávia, Lillian, Marinella, Karina, Gustavo, Silvestre, Mariane, Natália, Rodrigo César, Regina, Fabiana, Raquel, Sabrina, Sheila, Nádia, Rica, Marília e D. Sabininha!

A Dra. Eugênia Azevedo Vargas pela co-orientação, (Eliene, Rose, Lu, Cris, Thaís, Silésia, Lillian, Vi) cujo apoio e ensinamentos me foram de valor inestimável.

Ao querido professor Mário Lúcio pela co-orientação e amizade.

Aos professores Daniel Furtado, Nilson Salvador, Rose, Nazareno, Rubinho, Paulo Clemente, Luiz Carlos, Luis Ronaldo, Maria Cristina, Flávio Borém., Fátima Piccolo, Mário Sobral e Eduardo Valério por todo apoio e conhecimento que me ofereceram durante meus estudos em Lavras.

Aos amigos da EPAMIG, Marcelo Cláudio, Carol, Luís, Ygor, Vicentina, Renil, Marcelo, Odair, Everaldo, Samuel, Gilmar, Dr. Elifas, Dr. Gabriel, Dr. Vicente, Dr. Rodrigo, Dra. Lenira, Dra. M^o Inês, Dra. Miralda, Dr. Adalto e Dr. Sílvio que muito contribuíram com seu apoio.

Ao Sílvio Leite e ao Mr. George Howell pela inesquecível oportunidade de degustar com especialistas do mundo inteiro.

A Dra. Mirna Sabino, pela presteza em auxiliar durante a execução do trabalho.

Ao Dr. Guilherme Prado pelo apoio e disponibilidade de material técnico.

Aos amigos que fiz em Lavras: Giovani, Fábria, Patrícia Rodrigues, Rodrigo, Ana Paula, Régis, Didil, Vanessa, Marta, Dani, Gustavo, Josi, Edin, Gil, Maria, Mary, Laurinha, João Paulo, Poli, Rubinho, Tati, Mí, Alex, Bus, Virgílio, Barone, Jane, Sr. José e família, D. Geni e família, D. Maria Chalfoun e família, Shampoo e a você Jú que esteve presente na maioria dos momentos... já sinto saudades!

Aos funcionários do COMUT da biblioteca e secretaria (em especial a Gicelda) pela atenção.

Ao meu querido Peter, por ter me dado tanta atenção mesmo estando “tão longe”, sempre me incentivando e por ter me ensinado a não mais negligenciar coisas que são realmente importantes. Sua visão além do alcance me faz acreditar que tudo é possível!

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	I
ABSTRACT.....	Ii
CAPÍTULO 1.....	01
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	01
2 REFERÊNCIAL TEÓRICO.....	03
2.1 Significância da cafeicultura mineira e brasileira no contexto mundial.....	03
2.2 Classificação por tipos.....	04
2.3. Tamanho dos grãos.....	05
2.4 Análise sensoria (Degustação ou “Prova de Xicara”).....	05
2.5 Qualidade da bebida do café.....	06
2.6 Polifenoxidase (PFO).....	10
2.7 Fungos toxigênicos associados a grãos de café.....	11
* 2.7.1 Fatores que influenciam o crescimento dos Fungos.....	12
2.7.2 Interação entre microrganismos.....	14
* 2.8 Ocratoxina A em grãos de café.....	18
2.9 Ocratoxina A na saúde humana.....	20
2.10 Termoestabilidade de OTA.....	20
2.11 Formas de contaminação.....	22
2.12 Fatores que interferem na produção de micotoxinas.....	23
2.12.1 Fatores intrínsecos.....	24
2.12.2 Fatores extrínsecos.....	24
* 2.13 Determinação de ocratoxina A em café verde.....	25
2.14 Amostragem de grãos de café para exame de micotoxinas.....	25

2.15 Validação e escolha dos métodos analíticos.	26
2.16 Utilização da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência CLAE. . .	28
2.17 Saúde publica.	29
2.18 Legislação.	29
★2.19 Prevenção e controle de OTA. <i>O OTA não se degrada com a torrefação.</i>	30
2.20 Descontaminação.	31
2.21 Perspectivas em relação a micotoxinas para este século.	32
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
CAPÍTULO 2: Identificação, quantificação e avaliação do potencial ocratoxigênico de espécies de <i>Aspergillus</i> da seção <i>Circundati</i> e <i>Penicillium</i> spp. associados a grãos de café (<i>Coffea arabica</i> L.) separados em peneiras.	42
RESUMO	42
ABSTRACT.	43
1 INTRODUÇÃO	44
2 MATERIAL E MÉTODOS.	45
2.1 Obtenção de amostras.	45
2.2 Plaqueamento dos grãos.	45
2.2.1 Plaqueamento com desinfecção.	46
2.2.2 Plaqueamento sem desinfecção.	46
2.3 Distribuição.	46
2.4 Isolamento e identificação dos fungos.	46
2.4.1 Procedimento para a identificação de espécies de <i>Penicillium</i>	47
2.4.2 Procedimento para a identificação de espécies de <i>Aspergillus</i>	47
2.5 Índice de ocorrência e de severidade de contaminação fúngica.	48
2.6 Potencial ocratoxigênico.	48
2.7 Análise estatística para índice de Ocorrência (IO) e índice de Severidade de Contaminação (ISC).	49

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
3.1 Identificação.....	51
3.1.1 Descrição das espécies de fungos identificados.....	54
3.2 Quantificação.....	56
3.2.1 índice de ocorrência (IO).....	56
3.2.2 índice de severidade de contaminação (ISC).....	58
3.3 Potencial ocratoxigênico.....	61
4 CONCLUSÕES.....	64
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65
CAPÍTULO 3: Eficiência da separação de café (<i>Coffea arabica L.</i>) de acordo com o tamanho dos grãos na redução da incidência de ocratoxina A.....	67
RESUMO.....	67
ABSTRACT.....	68
1 INTRODUÇÃO.....	69
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	70
2.1 Amostras.....	70
2.1.1 Amostragem.....	70
2.1.2 Preparo das amostras.....	70
2.2 Padrões de ocratoxina A.....	71
2.3 Controle de qualidade analítica.....	71
2.4 Procedimentos.....	72
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	75
3.1 Resultados da porcentagem de recuperação da metodologia utilizada para análise de OTA em grãos de café beneficiados.....	75
3.2 Distribuição de ocratoxina A em amostras naturalmente contaminadas e riscos para saúde humana.....	77

3.3 Risco de intoxicação para o consumidor com relação as amostras analisadas.	79
4 CONCLUSÕES.	80
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.	81
CAPÍTULO 4: Influência da separação de café (<i>Coffea arabica L.</i>) de acordo com o tamanho dos grãos na Qualidade de bebida e no espectro de coloração.	83
RESUMO.	83
ABSTRACT.	84
1 INTRODUÇÃO.	85
2 MATERIAL E MÉTODOS.	87
2.1 Descrição das amostras.	87
2.2 Análises.	87
2.2.1 Grau de umidade.	87
2.2.2 Análise da enzima polifenoloxidase (U/min/g de amostra).	88
2.3 Análise sensorial (Degustação ou “Prova de Xícara”).	89
2.4 Análise de espectro de coloração.	89
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.	94
3.1 Análise da atividade da enzima polifenoloxidase e análise sensorial	94
3.2 Grau de umidade.	96
3.3 Análise de espectro de coloração.	98
4 CONCLUSÕES.	102
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	103
CAPÍTULO 5: Efeito da interação entre o fungo <i>Aspergillus niger</i> var. <i>niger</i> sobre o crescimento de isolados de <i>Aspergillus</i> da seção <i>Circundati</i> e produção de ocratoxina A.	105
RESUMO.	105

ABSTRACT.....	106
1 INTRODUÇÃO.....	107
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	109
2.1 Primeiro ensaio: Interação entre fungos produtores de OTA x <i>Aspergillus niger</i> var. <i>niger</i> EcoCentro 1181T-01.....	109
2.2 Segundo ensaio: Avaliação do efeito inibitório do filtrado do fungo <i>Aspergillus niger</i> var. <i>niger</i> EcoCentro 1181T-01 sobre o crescimento de <i>Aspergillus</i> da seção <i>Circundati</i>	110
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	113
3.1 Primeiro ensaio. Primeiro ensaio: Interação entre fungos produtores de OTA x <i>Aspergillus niger</i> var. <i>niger</i> EcoCentro 1181T-01.....	113
3.2 Segundo ensaio. Avaliação do efeito inibitório do filtrado do fungo <i>Aspergillus niger</i> var. <i>niger</i> EcoCentro 1181T-01 sobre o crescimento de <i>Aspergillus</i> da seção <i>Circundati</i>	115
4 CONCLUSÕES.....	120
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	121
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	123
ANEXOS.....	124

1703

RESUMO GERAL

NASSER, Patrícia Prado. **Influência da separação de grãos de café (*Coffea arabica* L.) por tamanho na qualidade e ocorrência de ocratoxina A.** 2001. 128 p. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

O presente estudo teve como objetivo isolar, quantificar e identificar a população fúngica de *Penicillium* spp. e *Aspergillus* da seção *Circundati* de grãos de café beneficiados, separados por peneiras antes e após desinfecção superficial, avaliar o potencial ocratoxigênico destes isolados, avaliar a incidência de ocratoxina A (OTA), analisar por dois métodos diferentes a bebida, comparar o espectro da coloração das amostras de mesma procedência e avaliar o efeito de substrato produzido pelo fungo *Aspergillus niger* var. *niger* sobre o crescimento e produção de OTA por espécies de *Aspergillus* da seção *Circundati*. Entre os fungos isolados, identificados e quantificados verificou-se a presença dos fungos *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus sulphureus*, *Aspergillus sclerotiorum* (seção *Circundati*) e *Penicillium brevecompactum*, sendo que entre 58 isolados, 50% apresentaram um potencial ocratoxigênico positivo. A seleção dos grãos em peneiras mostrou-se eficaz na redução do índice de severidade de contaminação (ISC), bem como do número de isolados com potencial ocratoxigênico positivo. Das 12 amostras analisadas, 7 apresentaram níveis de OTA que variaram de 0,120 a 0,591 ng/g; uma amostra apresentou traços de contaminação e em 4 amostras não se registrou a presença de OTA. A relação entre ocorrência de OTA e diferentes tamanhos de grãos indicou que a seleção de grãos também reduz o risco de contaminação por OTA, embora todas as classes de grãos (peneiras) tenham apresentado níveis da OTA inferior àqueles propostos pelas legislações Européias para grãos de café e cereais (5 ppb). Esta separação proporcionou melhoria na qualidade da bebida tanto na análise da atividade da enzima (Polifenoloxidase) PFO, quanto na análise de degustação e contribuiu também para maior homogeneização da cor dos grãos. O método de controle biológico, com a utilização de um isolado do fungo atoxigênico *Aspergillus niger* var. *niger* mostrou-se promissor na redução do índice de velocidade de crescimento micelial e produção de ocratoxina A por fungos toxigênicos do gênero *Aspergillus* da seção *Circundati*.

Comitê Orientador: Dr^a. Sara Maria Chalfoun de Souza – EPAMIG (Orientadora)
Msc. Eugênia Azevedo Vargas – LAQCASA/LAV-MG (Co-orientador)
PhD. Mário Lúcio Vilela de Resende – UFLA (Co-orientador)

ABSTRACT

NASSER, Patricia Prado. Influence of separation of coffee beans (*Coffea arabica* L.) by size on quality and occurrence of ochratoxin A. 2001. 128 p. Dissertation (Master's degree in Food Science) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

The present study was designed to isolate, quantify and identify the fungal population of *Penicillium* spp. and *Aspergillus* of the section *Circundati* of processed coffee beans separated by sieves before and after surface disinfection and to evaluate the ochratoxigenic potential of those isolates, evaluate the incidence of ochratoxin A, analyze by two different methods the beverage, compare the spectrum of the coloration of the samples of the same origin and evaluate the effect of substrate produced by the fungus *Aspergillus niger* var. *niger* upon the growth and production of OTA by species of *Aspergillus* of the section *Circundati*. Among the fungi isolated, identified and quantified, the presence of the fungi *Aspergillus sulphureus*, *Aspergillus sclerotiorum* (section *Circundati*) and *Penicillium brevecompactum* was found, out of 58 isolates. 50% of those presented a positive ochratoxigenic potential. Bean screening in sieves proved efficient in reducing the contamination severity index (CSI) as well as the number of isolates with a positive ochratoxigenic potential. From the 12 surveyed analyses, 7 presented levels of OTA which ranged from 0.120 to 0.591ng/g, a sample presented only traces of contamination and on 4 samples no presence of OTA was recorded. The relationship between occurrence of OTA and different sizes of beans pointed out that bean screening also reduce the risk of contamination by OTA although all the classes of beans (sieves) have presented levels of OTA lower than those proposed by European Legislations for coffee beans and grains (5 ppb). This separation provided improvement in the beverage quality, both, in the analysis of the activity of the PPO enzyme and in the analysis of tasting and also contributed to an increased homogenization of bean color allowing for greater toasting uniformity. The biological control method with the use of an isolate of the atoxigenic fungus *Aspergillus niger* var. *niger* proved promising in reducing the mycelial growth velocity index and production of ochratoxin A by toxigenic fungi of the genus *Aspergillus* of the section *Circundati*.

Guidance Committee: Dr^a. Sara Maria Chalfoun de Souza – EPAMIG (Adviser professor) Msc. Eugênia Azevedo Vargas – LAQCASA/LAV-MG (Co-adviser) and Ph.D. Mário Lúcio Vilela de Resende – UFLA (Co-adviser)

CAPITULO 1

19.13

1 INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil, maior país cafeeiro do mundo, busca uma melhor participação no mercado de cafés finos, segmento que cresce em todos os grandes centros de consumo. As oportunidades nesse terreno são grandes, porque seu imenso território abriga regiões produtoras climaticamente diversas, proporcionando a obtenção de cafés de diferentes características.

Além da cafeicultura e atividades relacionadas fornecerem a principal fonte de emprego no país, o Brasil é altamente dependente de sua comercialização por suas receitas financeiras gerarem a continuidade do desenvolvimento de seus programas sociais e econômicos.

Cuidar do aprimoramento das qualidades químicas, físicas, sensoriais e de segurança do café é pré-requisito para o país tornar-se mais competitivo.

A presença de alguns fungos nesses grãos além de causar graves defeitos e influenciar no sabor produzindo bebidas com gostos de bolor e terra, pode produzir toxinas que comprometem a segurança para o consumo humano.

Uma dessas toxinas é a ocratoxina A (OTA), e os principais fungos produtores em grãos de café são dos gêneros *Aspergillus* da seção *Circundati* e *Penicillium verrucosum*.

Segundo a FAO (1997) regulamentações quanto a presença de OTA em alimentos têm sido propostas e/ou adotadas por alguns países, sendo que o limite de tolerância varia de 1 a 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$. A União Européia tem proposto o estabelecimento do limite para OTA em café de 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Stegen et al., 1997).

Sabendo-se que remoção seletiva e controle biológico são citados na literatura como técnicas de redução de micotoxinas e tendo em vista a importância da cafeicultura para o país e a preocupação de países importadores

com a segurança de alimentos. O presente trabalho se propôs a: isolar, identificar e quantificar a população fúngica de *Penicillium* spp. e *Aspergillus* da sessão *Circundati* de grãos de café beneficiados separados por peneiras antes e após desinfecção superficial; avaliar o potencial ocratoxigênico destes isolados; avaliar a incidência de ocratoxina A; analisar por dois métodos diferentes a bebida do café; comparar o espectro da coloração das amostras de mesma procedência e avaliar o efeito de substrato produzido pelo fungo *Aspergillus niger* var. *niger* sobre o crescimento e produção de OTA por espécies de *Aspergillus* da seção *Circundati*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Significância da cafeicultura mineira e brasileira no contexto mundial

Segundo Floriani (1999), atualmente o Brasil contribui com uma fatia de 25,8 % do café produzido no mundo, seguido pela Colômbia com 11,7 %, Indonésia com 6,7%, Vietnã com 5,6%, México com 5,3% e Costa do Marfim, Etiópia, Uganda, Guatemala e Índia todos com 4% aproximadamente, e os demais países produtores ficam com 25% do restante da produção mundial, sendo este percentual representado por milhões de sacas de 60 kg durante um período de 1994/95 a 1999/00. Os principais países produtores também são os maiores exportadores de café, sendo uma vantagem expressiva do Brasil que representa cerca de 22,2 %, seguido da Colômbia com 13,9 %, Indonésia com 6,3 %.

O mesmo autor relata que o maior consumidor de café é os Estados Unidos da América com 18,4% da média anual, seguido pelo Brasil com 10,9 %, Alemanha com 10,0 % Japão com 6,0 %, França com 5% e Itália com 4,3 %. Estes países consomem juntos aproximadamente 54,5 % do café produzido no mundo. Já os maiores importadores de café são os Estados Unidos da América com 18,8 %, Alemanha com 13,5 %, Japão com 6,0 %, França com 6,6 %, Itália com 5,7 %, Espanha com 3,4 % e Reino Unido com 3,1 %. O consumo “per capita” de café é liderado pela Alemanha, com 7,31 kg/ habitante /ano.

Um total de 510 municípios no estado de Minas Gerais contribui para um parque cafeeiro que já superou 2,5 bilhões de pés plantados e 1 milhão de hectares. O estado de Minas Gerais contribui com 50 % da produção nacional com quatro regiões produtoras: Cerrado de Minas, Vales de Minas, Montanhas de Minas e o Sul de Minas (Floriani 1999).

Minas Gerais é o estado brasileiro que mais produz café e sua relevância pode ser traduzida pelo seu papel no mercado como gerador de emprego e como fixador de mão-de-obra no meio rural (Chalfoun, 1996).

Entre as tendências do “negócios café” a níveis mundiais e brasileiros, influenciadoras do setor cafeeiro de Minas Gerais, encontram-se o fato de que o café como mercadoria (commodity) parece estar perdendo importância como um dos maiores negócios do mundo. Há uma crescente importância da segmentação dos mercados em termos de bebidas, origens dos cafés e forma de preparo. A competitividade centrada em custos de matéria prima pouco diferenciada, sendo que a qualidade do produto vem se tornando aspecto chave na conquista dos mercados (Minas Gerais, 1995).

A cafeicultura tem posição ímpar na nossa economia dado o número de pessoas que emprega. Estimativas apontam a atividade como empregadora de 4 milhões de pessoas na produção e de 10 milhões, se considerados os outros segmentos, tais como comércio, indústria e serviços (Souza, 1996).

A demanda do café tradicional está estagnada, enquanto a de cafés finos cresce 5% ao ano no mundo. Desse segmento, a Colômbia ocupa uma parcela de 30%, seguida pela Jamaica, Costa Rica e México. O Brasil participa com apenas 1%, devido a qualidade inferior do café produzido (Illy et al., 1995).

2.2 Classificação por tipos

A classificação por tipos consiste em classificar o café segundo o número de grãos defeituosos e imperfeitos, apresentados numa certa quantidade de café beneficiado (amostras de 300 g).

Os defeitos podem ser de natureza intrínseca (grãos imperfeitos) que são grãos avariados pela imperfeita aplicação de processos agrícolas de secagem e beneficiamento (pretos, ardidos, verdes, mal granados, quebrados, brocados, etc.) e extrínseca (impurezas) que são os elementos estranhos ao café

beneficiado (cascas, paus, pedras, etc.) e possuem valores variados de acordo com a tabela de equivalência. O café pode ser classificado nos tipos 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 que apresentam, respectivamente, 4, 12, 26, 46, 86, 160 e 360 defeitos por amostra.

2.3 Tamanho dos grãos de café

Os grãos de café antes de serem separados no classificador tem o nome de “bica corrida”. Ao passarem pelo crivo das diferentes peneiras vão sendo classificados.

A separação do café por peneiras tem como objetivo a formação de lotes homogêneos ao tamanho das favas, a fim de que o produto apresente maior uniformidade quanto ao aspecto e para que seja evitada uma torração desuniforme, em que os grãos pequenos se queimariam antes que os maiores sejam torrados.

O café classificado por peneiras, ficou sujeito as seguintes divisões e denominações: 22, 21, 20 – Maragogipe, 19, 18, 17 - Chato Graúdo, 16,15 - Chato Médio, 14, 13, 12 – Chatinho, 14 - Moca de Maragogipe, 13, 12, 11 - Moca Graúdo, 10 - Moca Médio, 09, 08 – Moquinha.

2.4 Análise sensorial (Degustação ou “Prova de Xícara”).

A análise sensorial é um dos processos mais importantes na determinação da qualidade do café. A bebida é determinada através de teste sensorial conhecido como “prova de xícara”, a análise é feita por degustadores, baseada nos sentidos de gosto e olfato. Além disso, os provadores devem possuir um bom conhecimento das demais formas de classificação. Esta prova foi adotada oficialmente em 1917 e embora sofra restrições ainda prevalece até os dias atuais.

Para a degustação, o café não deve ser excessivamente torrado, pois deverá haver a volatilização dos componentes aromáticos. Deverá ser torrado conforme a torrefação “Americana”, que é mais clara e permite uma melhor apreciação por parte do degustador. O café torrado deverá também ser moído em um granulado médio, não devendo ser nem muito fino nem muito grosso. O ideal é a moagem com mais de 14 fios por cm².

A classificação oficial brasileira apresenta 7 escalas de bebidas a saber: Estritamente Mole: bebida de sabor muito suave e adocicado; Mole: bebida de sabor suave e adocicado; Apenas Mole: bebida de sabor suave, mas com leve adstringência; Dura: bebida com sabor adstringente; Riada: bebida com leve sabor de iodofórmio; Rio: bebida com sabor forte e desagradável de iodofórmio; Rio-Zona: bebida de sabor e odor intolerável ao paladar e olfato.

À bebida básica, expressa na classificação oficial, o degustador deve acrescentar as nuances, acidez e gostos estranhos.

2.5 Qualidade da bebida do café

Na comercialização do café, a qualidade de bebida tem sido o fator determinante no valor alcançado pelo produto, cuja preferência pelo consumidor mais exigente torna a bebida de melhor qualidade responsável por maiores cotações no valor do produto ofertado.

No Brasil, o café tem sido colhido por vários métodos. Normalmente a derriça é feita colhendo-se todos os frutos juntos (verdes, cerejas, passas e secos) e, posteriormente postos a secar em terreiros por dias consecutivos. Este longo período de secagem pode vir a favorecer a contaminação e a proliferação de microrganismos prejudiciais à bebida, e com isso conferir baixa qualidade ao produto final. A bebida Rio tem sido associada às regiões úmidas com altitude geralmente abaixo de 800 m e estádios finais de desenvolvimento e maturação dos frutos que coincide com chuvas frequentes no outono e inverno, época em

que normalmente ocorrem operações de colheita, secagem e preparo do café para armazenamento. Esta bebida também tem sido encontrada em regiões onde lavouras são implantadas próximas a represas e lagos, o que reforça a hipótese de que a alta umidade pode favorecer o desenvolvimento de fungos (Chalfoun et al., 1992).

A uniformidade dos grãos é fator muito importante. Por isso recomenda-se realizar a colheita quando a maior parte dos frutos estiver no estágio de cereja. Entretanto essa uniformidade nem sempre é possível porque, muitas vezes, a florada é desuniforme, fazendo com que o café que chega da lavoura seja uma mistura de grãos ainda verdes e grãos já secos. O uso de lavadores é uma forma de reduzir a desuniformidade, por permitir separar a parcela de grãos de menor densidade da parcela dos cerejas e verdes (Agrifoglio, 2000).

Espécies de *Fusarium* sp., *Penicillium* sp. e de *Aspergillus* sp. têm sido isoladas de frutos de café em fase final de maturação e têm sido associados a bebida “rio” em determinadas regiões (Bittancourt, 1957a; Chalfoun et al., 1992; Carvalho et al., 1989). A associação da bebida Rio, a baixas altitudes, sugere que há um período de condições favoráveis para a infecção do patógeno.

Cafeeiros cultivados em altitudes elevadas maiores que 800 m, com predominância de períodos secos no outono e inverno, normalmente não desenvolvem a bebida Riado ou Rio, indicando que as bebidas superiores a essas podem estar associadas à ausência de infecção por fungos prejudiciais e aos processos de fermentação indesejáveis (Carvalho & Leite, 1994).

A região Sul de Minas Gerais, segundo Camargo et al. (1992), encontra-se entre as “regiões de bebida mole” onde a fermentação da polpa de café se encerra nas fases alcoólica e acética o que é benéfico para a qualidade do café.

Por outro lado, existem observações de ocorrência de algumas variações quanto à qualidade do café dentro de regiões produtoras comuns conforme encontrado por Leite (1991) e Chagas (1994).

A qualidade inferior do café produzido em determinadas regiões do Estado de Minas Gerais e do país justifica-se, em parte pela ocorrência de condições ambientais mais favoráveis à incidência de deteriorações microbianas dos frutos que ocorrem tanto na fase pré como na pós-colheita (Carvalho et al., 1997)

Sabendo-se que microrganismos liberam substâncias que penetram no grão de café, torna-se necessário determinar a influência destas substâncias na composição do grão. Vários microrganismos liberam substâncias tóxicas que além de alterarem a qualidade da bebida, podem ser altamente prejudiciais a saúde do consumidor (Krug, 1945).

O mesmo autor observou que quanto maior a incidência de fungos pior a qualidade da bebida e que café de varrição já atacado por fungos deterioram rapidamente após uma chuva. Isso resulta em alterações acentuadas na bebida, devido à difusão de metabólitos e/ou secreções dos fungos da polpa para a semente.

Diferentes fungos filamentosos são relatados por crescerem em grãos de café verde sujeitos a certas condições e causa em geral perda de qualidade, produzindo odor e sabor desagradável bem como em alguns casos podem produzir micotoxinas (Naidu, 1996).

E imprescindível uma sólida interação da qualidade à produção, fato este que influencia decisivamente na melhoria da colheita e, conseqüentemente, nos lucros aferidos pelo produtor. A qualidade é inerente à competitividade de mercado. Devido a isso, faz-se essencial sua aplicação desde o plantio até a efetiva comercialização do café, a fim de se obter um produto de qualidade (Carvalho et al., 1997).

Conforme Carvalho et al. (1997), no Brasil, poucos produtos agrícolas têm seus preços baseados em parâmetros qualitativos e, dentre eles destaca-se o

café cujo valor acresce-se significativamente com a melhoria da qualidade que é também um fator limitante para a exportação.

Atualmente, à semelhança do que acontece com o vinho, a tendência do mercado de café é de ser ter marcas brasileiras, por tipo de bebida e área de produção.

Existem sugestões de que determinados fungos estariam envolvidos na fermentação indesejável dos frutos do café em determinados ambientes, o que acarretaria o surgimento das bebidas Riado e Rio (Bittancourt, 1957a; Krug, 1941). Estudo de Spadone et al. (1990) sobre a provável causa da ocorrência desta bebida sugere que halocompostos como 2,4,6-triclorofenol (TCF) são convertidos a 2,4,6-tricloroanisol (TCA) por microrganismos em processos de fermentação. Espécies de fungos dos gêneros *Fusarium*, *Penicillium* e *Aspergillus* têm sido apontadas como possíveis responsáveis pela síntese de 2,4,6-tricloroanisol. A capacidade de percepção sensorial do ser humano de 2,4,6-triclorofenol é de $8 \cdot 10^{-9}$ g/ml, enquanto que para 2,4,6-tricloroanisol é de cerca de 1 milhão de vezes maior ($8 \cdot 10^{-15}$ g/ml). Acredita-se que a bebida Dura esteja associada com a presença de 2,4,6-triclorofenol e a bebida Rio com a presença do 2,4,6-tricloroanisol em grãos de café. Parte da quantidade presente de TCA é perdida durante a torra do café.

Para produzir cafés finos nas regiões que normalmente produzem cafés de qualidade inferior, parece haver duas soluções, afirmou Bittancourt (1957b): a primeira consistiria em tratar o café com substâncias que impeçam o desenvolvimento de fungos, bactérias e leveduras, e a outra, em modificar as condições ambientais de forma a torná-las desfavoráveis a estes microrganismos.

2.6 Polifenoloxidase (PFO)

Leite (1991) e Chagas (1994) observaram que a análise sensorial (prova de xícara) tem considerado a bebida dura como valorização máxima do café, o que dificulta as avaliações em trabalhos de pesquisa onde se exige maior precisão na definição dos diferentes padrões de qualidade. Trabalhos demonstram a necessidade de complementar os testes sensoriais com as avaliações químicas para se ter maior segurança na classificação dos cafés quanto a qualidade (Chalfoun, 1996).

A polifenoloxidase é uma enzima presente no café cru, sendo a única conhecida capaz de catalisar a oxidação de compostos fenólicos, que influenciam na qualidade do café (Amorim & Silva, 1968).

Amorim (1978) verificou que qualquer fator ambiente que altere a estrutura da membrana, por exemplo, ataque de insetos, infecções por microrganismos, alterações fisiológicas e danos mecânicos, provoca uma rápida deterioração dos grãos de café. Uma vez rompida a membrana celular ocorre um maior contacto entre as enzimas e os compostos químicos presentes intra e extracelular no grão. Isto ocasiona reações químicas que modificam a composição química original do café verde e em consequência as propriedades organolépticas da infusão preparada com este.

Esta seqüência sugere, na verdade, que a qualidade inferior dos cafés com baixa atividade da PPO está relacionada com os danos às membranas celulares, sendo então a diminuição da PPO uma consequência disto.

Pereira (1997) constatou que a inclusão de defeitos verde, ardido e preto em café “estritamente mole” reduz a qualidade do café, podendo refletir-se nas características sensoriais do café após a torração. A redução na atividade enzimática, observada tanto através da adição crescente do defeito verde como da comparação deste defeito com o controle (estritamente mole), pode ser explicada pelo fato de que este defeito encontra-se principalmente em frutos

colhidos no estágio de maturação verde, tendo o desenvolvimento incompleto, principalmente em relação aos teores de seus diferentes compostos químicos. Quanto à adição de grãos ardidos e pretos, a redução na atividade da polifenoloxidase observada pelo autor pode ser justificada por prováveis danos às membranas celulares, com conseqüente intensificação dos processos catabólicos.

A deterioração dos grãos de café envolve, certamente, complexos mecanismos reativos, difíceis de serem elucidados sem a identificação precisa dos componentes químicos envolvidos. Vários autores consideram, como um dos principais eventos deste processo, a degradação de membranas celulares com a conseqüente perda de controle na permeabilidade (Berjack & Villers, 1972; Villers, 1973; Woodstock, 1988).

2.7 Fungos toxigênicos associados a grãos de café

A infestação de fungos em grãos de café pode ser o resultado de condições inadequadas de estocagem, conduzindo à perda de qualidade (Bucheli et al., 1998).

Os principais fungos produtores de ocratoxina A são pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, sendo que os mais citados na literatura são o *Aspergillus ochraceus* e *Penicillium verrucosum*.

Apesar de vários trabalhos citarem *P. viridicatum* como responsável pela produção de OTA, *P. verrucosum* é a única espécie conhecida, de modo seguro, produtora de OTA (Pitt & Hocking, 1999).

A ocratoxina A é produzida pelo *Penicillium verrucosum* em climas temperados e por um número de espécies de *Aspergillus* nas partes quentes e tropicais do planeta. A espécie mais conhecida por produzir a ocratoxina A é o *A. ochraceus* mas outras, incluindo *A. sulphureus*, *A. aliaceus*, *A. ostianus*, *A.*

petrakii, *A. sclerotiorum* e *A. melleus*, têm sido citadas (Smith & Ross, 1991; Moss, 1996a; Walker, 1997).

Diferentes fungos filamentosos são relatados por crescerem em grãos de café verde sujeitos a certas condições e causarem, em geral, perda de qualidade, produzindo odor e sabor desagradável, bem como, em alguns casos, poderem produzir micotoxinas. A toxina mais comumente presente em café, porém em baixa quantidade, é a ocratoxina A (Naidu, 1996).

Dados na literatura mostram que a minoria dos isolados de *A. ochraceus* são produtores de ocratoxina A. De 27 isolados de *A. ochraceus* analisados 33% foram produtores de ocratoxina A, sendo dois destes isolados de grãos de café provenientes de Uganda-África. Neste mesmo experimento, sete isolados de *A. ochraceus* de grãos de café do Zaire não produziram a toxina (Varga et al., 1996). Dos 17 isolados de *A. ochraceus*, 29,4% foram ocratoxigênicos no estudo realizado por Ciegler (1972). No estudo de Abarca et al. (1997), 16,6% dos 12 isolados de *A. ochraceus* foram produtores de ocratoxina A

Outras espécies pertencentes à Seção *Circundati* (grupo *A. ochraceus*) já foram relacionadas por produzirem ocratoxina A, como o *A. sclerotiorum* (1 de quatro isolados analisados), *A. aliaceus* (dois isolados analisados), *A. melleus* (três dos cinco isolados) e *A. sulphureus* (o único isolado analisado foi produtor de ocratoxina A), conforme Ciegler, 1972.

2.7.1 Fatores que influenciam o crescimento dos fungos

Os fatores mais importantes que influenciam o crescimento dos fungos sobre um substrato intrinsecamente susceptível são a atividade de água e a temperatura, a micotoxina pode ser formada como um resultado deste crescimento (Moss, 1996b). A temperatura tem um papel dominante no crescimento do micélio, bem como na formação e germinação dos esporos (Moreau, 1979).

(A temperatura ótima para o crescimento e produção de micotoxinas para os fungos do gênero *Penicillium* varia de 25^o a 30^oC, enquanto, para os do gênero *Aspergillus*, é de 30^o a 40^oC, sendo que a temperatura máxima de crescimento de *Penicillium* varia de 28^o a 35^oC, e para a maioria dos *Aspergillus*, de 37^o a 45^oC (Samson et al., 1995))

É essencial notar que, embora muitas vezes semelhantes, as temperaturas de crescimento e de esporulação podem ser diferentes. Assim, ao observar uma temperatura ótima para a esporulação, esta pode ou não ser menor que a temperatura de crescimento. Além de desempenhar um importante papel no crescimento e morfologia dos fungos, a temperatura também influencia na quantidade e natureza dos metabólitos que eles produzem. E não necessariamente a temperatura ótima de crescimento é igual à temperatura para a produção de todos os metabólitos (Moreau, 1979).

A maioria do fungos que contaminam em grãos estocados cresce muito bem em temperaturas de 30 a 32 °C aproximadamente, e o crescimento destes fungos diminui à medida que decresce a temperatura. Algumas espécies de *Penicillium* que requerem alta umidade, podem crescer em temperaturas próximas do congelamento (Christensen & Kaufmann, 1969).

Tão necessária quanto a temperatura é a disponibilidade de água para o microrganismo que pode ser expressa como umidade relativa ou atividade de água que também possui um papel muito importante para o crescimento dos fungos, principalmente quando estes estão prestes a se instalarem em grãos estocados.

A atividade de água (a_w) é a água disponível para o crescimento dos fungos e outros microrganismos em um substrato; diminuindo a atividade de água do produto, irá diminuir também a disponibilidade de água para o fungo. Todos os fungos, independente da espécie, possuem uma máxima, ótima e

mínima atividade de água para o seu crescimento, sendo que estas variam de espécie para espécie (Miller & Trenholm, 1994).

As espécies de *Aspergillus* diferem em sua necessidade de a_w ; portanto a presença de uma espécie em particular, em um determinado alimento, é igualmente indicada como um prévia das condições de estocagem. As espécies de *Aspergillus ochraceus* requerem 0,75 de a_w (Smith & Kozakiewicz, 1994).

Os efeitos da a_w e temperatura sobre a produção de micotoxinas são diferentes das mencionadas para a germinação dos esporos e crescimento dos fungos. Além disso, o efeito desses dois fatores pode ser diferente para a produção de duas toxinas pela mesma espécie e também da mesma toxina por espécies diferentes (Smith & Kozakiewicz, 1994).

As duas maiores espécies de fungos produtoras de ocratoxina A diferem nas condições de temperatura e atividade de água a_w ótimas para o crescimento e a produção de micotoxinas. Assim, a a_w mínima para o crescimento de *Penicillium verrucosum* é 0.81 e para *A. ochraceus*, 0.76, mas o mínimo para a produção de ocratoxina A é 0.85 para ambas as espécies e a a_w ótima é acima de 0.97. Em a_w ótima, a temperatura para a produção de ocratoxina A varia de 4-31°C (24°C é a temperatura ótima) para *P. verrucosum* e 12-37°C (25° C temperatura ótima) para o *A. ochraceus* (Moss, 1996b).

2.7.2 Interação entre microrganismos

A colonização dos grãos estocados é um processo complexo, envolvendo mais do que o antagonismo dos fungos. Como os metabólitos não se difundem entre os grãos, a taxa de crescimento pode tornar-se mais importante do que em culturas sintética. Também os fatores nutricionais, temperaturas ou atividade de água também podem fazer parte. O contato entre as hifas de diferentes espécies de fungos certamente ocorre em grãos estocados em menor proporção do que em meios de cultura. As interações são prováveis para fazer o papel na

determinação de qual espécie será dominante no ecossistema dos grãos estocados sob um conjunto de fatores ambientais (Magan & Lacey, 1984).

A atividade de água e a temperatura irão influenciar na microbiota dominante, o *Aspergillus ochraceus* foi dominante sobre o *Aspergillus flavus* em milho com a_w 0,95 a 18 °C, mas a 30 °C, o *Aspergillus flavus* foi dominante. O *Eurotium amstelodami* foi dominante sobre o *Aspergillus ochraceus* em ambas as temperaturas, a 18 e a 30°C, com uma atividade de água de 0,95. Com o aumento da atividade de água (0,995 – água livre), o *Aspergillus ochraceus* foi dominante sobre *Aspergillus candidus* e *Eurotium amstelodami* a 18 °C, e a 30°C contra *Alternaria alternata*. O crescimento do *Aspergillus ochraceus* foi significativamente reduzido pela presença de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* e *Eurotium amstelidami*, a 30 °C, com uma a_w de 0,95, o *Aspergillus niger* e *Aspergillus flavus* inibiram o crescimento do *Aspergillus ochraceus* com a_w de 0,995 (Lee & Magan, 2000).

É esperado que a competição entre os microrganismos afete profundamente a produção de metabólitos secundários, visto que estes microrganismos em culturas competem por todos os fatores ambientais essenciais, incluindo o espaço e os nutrientes. A presença de microrganismos competidores pode resultar na inibição ou estimulando a produção de micotoxinas (Pettersson et al., 1998).

Peterson et al. (1998) relatam que os fungos toxigênicos durante o controle biológico não têm mostrado um aumento na produção das micotoxinas. Porém, não se pode descartar a possibilidade do antagonismo destes microrganismos resultarem numa maior produção de metabólitos secundários e, conseqüentemente, das micotoxinas; esta situação dependerá das espécies envolvidas e das condições ambientais.

O *Aspergillus ochraceus* teve os níveis de produção ocratoxina significativamente reduzidos na presença de *Aspergillus niger* e *Eurotium*

amstelodami a 30°C em ambas as a_w ; de 0,95 e 0,995; a presença do *Aspergillus flavus* reduziu a produção de ocratoxina A com a_w 0,95. Já o *Aspergillus candidus* influenciou a redução de ocratoxina A em ambas as a_w (0,95 e 0,995) a 18°C (Lee & Magan, 2000).

O estudo desenvolvido por Lee & Magan (2000) mostra que alguns fungos inibem significativamente o crescimento e a produção de ocratoxina A por *Aspergillus ochraceus* em temperaturas e a_w ótimas.

Devido à competição entre a microbiota natural e produtos inoculados com micotoxinas, ambos, crescimento do fungo e produção de micotoxinas, são reduzidos. A redução do crescimento, causada pela presença de espécies específicas de bactérias e leveduras, podem também influenciar na produção de micotoxinas, certas substâncias produzidas por estes microrganismos podem reduzir a produção de toxinas pelos fungos toxigênicos (Pettersson et al., 1998).

Um dos processos que têm sido estudados com atenção é a detoxificação microbiana das micotoxinas produzidas em cereais. Alguns microrganismos possuem habilidade de degradar as micotoxinas, transformando-as em substâncias menos tóxicas.

As espécies de *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus fumigatus* conseguem degradar a ocratoxina A em meios de cultura YES. O *Aspergillus niger* foi encontrado por ser efetivo na eliminação de ocratoxina A e também na decomposição da ocratoxina A em meios líquidos e meios sólidos. Esta observação é promissora porque pode permitir uma eliminação biológica desta micotoxina de substratos sólidos, tais como grãos de café e cereais (Varga et al., 2000).

O *Acinetobacter calcoaceticus* possui a capacidade de degradar a ocratoxina A em ocratoxina em meio EMSM (ethanol-minimal salts medium), com uma redução significativa da concentração da toxina no período de tempo entre 24 e 48h; entretanto, o *Acinetobacter calcoaceticus* não cresce em meio

com o mínimo de sal sem etanol. Isto indica que o *Acinetobacter calcoaceticus* é incapaz de usar a ocratoxina A como única fonte de carbono (Hwang & Draughon, 1994).

A *Pichia anomala* e *Saccharomyces cerevisiae* apresentaram a propriedade de inibir tanto a produção de ocratoxina A como o crescimento de dois isolados de *Penicillium verrucosum* no teste *in vitro*. Já no substrato natural utilizado (trigo), apenas em um dos isolados foi observada a redução no crescimento e na produção da toxina (Petersson et al., 1998).

Os métodos de controle biológico de fungos não podem ser considerados seguros, a menos que a interação microbiana em níveis necessários para que ocorra o antagonismo seja entendida. Além disso, é necessário um total conhecimento do microrganismo escolhido como agente controlador. Este microrganismo não pode produzir resíduos tóxicos, não pode alterar a qualidade do substrato e sua presença não pode colocar em risco a saúde do homem e de outros animais.

Outros fatores têm sido relatados por serem de vital importância para o crescimento do fungo e, conseqüentemente, a produção de micotoxina, tais como o tempo em que o produto será estocado; o tempo de crescimento do fungo e de produção de micotoxinas que difere para cada espécie de fungo, dependendo do substrato e das condições de estocagem; a concentração da relação CO_2/O_2 . Na maioria dos casos, a produção de micotoxinas e o crescimento do fungo sofrerão uma redução quando menor for a concentração de O_2 e/ou maior for a concentração de CO_2 . Outros fatores de grande importância são grau de contaminação por esporos dos fungos, uso de fungicidas, materiais estranhos aos produtos armazenados, como fragmentos de plantas e de insetos, ciscos e torrões de terra e, por final, a localização geográfica.

2.8 Ocratoxina A em grãos de café

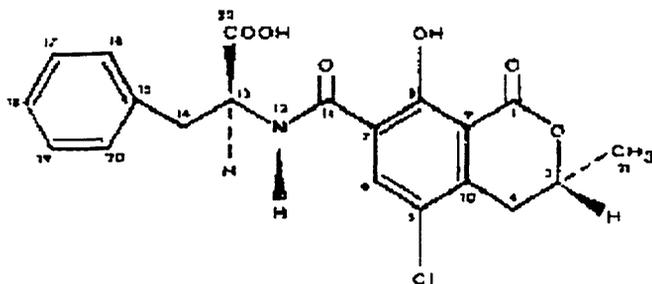


FIGURA 1 Estrutura química da ocratoxina A (Cole & Cox, 1981).

A ocratoxina A foi identificada pela primeira vez em 1965, por Merwe et al., como sendo um metabólito tóxico do *Aspergillus ochraceus*. Esta descoberta foi realizada através da indução da micotoxicose em animais de laboratório, isto é, não ocorrendo naturalmente, diferente de uma micotoxicose natural, como ocorreu com a descoberta da aflatoxina.

As primeiras tentativas para fiscalizar a presença de micotoxinas em grandes lotes de café verde comercial começaram no fim dos anos 70 (Petracco, 1999).

Os estudos sobre ocratoxina A no Brasil vêm aumentando nos últimos três anos; porém, ainda há poucos dados disponíveis para um levantamento da ocorrência desta toxina no país.

Ainda que limitados, os resultados parecem bastante favoráveis, com poucas amostras contaminadas e teores baixos de ocratoxina A. Dados colhidos pela UNICAMP mostram uma contaminação média de 2,4 µg/Kg em 142 amostras de grãos de café (Soares, 1999).

Furlani et al. (1999) avaliaram a incidência de ocratoxina A em grãos de café verde destinados ao consumo interno, proveniente de várias regiões produtoras do país. Das 69 amostras de *Coffea arabica* analisadas, 10

apresentaram contaminação com ocratoxina A em níveis que variaram de 1,7 a 12,7 ng/g. Em 10 amostras de *Coffea canephora*, duas amostras estavam contaminadas com níveis que variaram de 5,5 a 114,2 ng/g. Para os autores, a influência da diferença entre o valor comercial das duas espécies e a consequente diferença no trato agrícola que recebem não pode ser descartada na avaliação dos resultados.

Leoni et al. (1999) avaliaram a presença de ocratoxina A em 14 amostras de café solúvel normal e 2 amostras de café solúvel descafeinado, todas adquiridas em pontos de comércio a varejo na cidade de Campinas-SP. Das amostras analisadas, todas apresentaram contaminação que variou de 0,53 a 5,12 ng/g, com uma contaminação média de 2,17 ng/g. Segundo os autores, o valor médio de contaminação representa 8% da ingestão diária provisória estabelecida pelo Codex Alimentarius para a ocratoxina, levando em consideração o consumo de 5 xícaras de café por um consumidor adulto de 70Kg.

Prado et al. (2001) examinaram amostras de café torrado e moído e café solúvel em Belo Horizonte - MG. Das 47 amostras de café torrado e moído analisado, 41 estavam contaminadas, em uma faixa de contaminação que variou de 0,99 a 5,87 ng/g e uma média de 1,75ng/g. Das 10 amostras de café solúvel, 8 apresentaram contaminação variando de 0,31 a 1,78 ng/g, com uma média de 0,73 ng/g. De acordo com os autores, os produtos de café não são a maior fonte de ocratoxina A na dieta do consumidor brasileiro, chegando a contribuir com cerca de 0,68% (café solúvel) e 4,9% (café torrado e moído) do nível estimado pelo JECFA (Joint European Committee for Food Administration).

✳Apesar de poucos dados sobre a presença de ocratoxina A no café consumido no Brasil, os resultados concordam no aspecto mais importante. A concentração da toxina encontrada nos produtos do café é muito baixa, oferecendo um risco muito pequeno de intoxicação para os consumidores.

2.9 Ocratoxina A na saúde humana

Com relação à ocratoxina A, o JECFA (Joint European Committee for Food Administration) usou o menor efeito observado no porco para calcular um ISPT - Ingestão Semanal Provisória Tolerável - (Provisional Tolerable Weekly Intake - PTWI) para homem, aplicando um fator de segurança de 500, chegando a um ISPT de 112 ng/kg. Assim, para um adulto de 60 kg, o ISPT seria 6000ng/semana (Walker, 1997). Pelos cálculos do JECFA, o nível de ingestão diária ocratoxina A é de 14ng/Kg de peso corpóreo. Grupos de pesquisadores, trabalhando separadamente têm sugerido valores diferenciados de doses de Ingestão Diária Tolerada Provisória – IDTP. Para um grupo de pesquisadores canadenses, o valor de IDTP para a ocratoxina A deve ficar entre 1,2 - 5,7 ng/Kg p.c., para um nível de risco de 10^{-5} . Já um grupo de toxicologistas nórdicos propôs um valor de 5 ng/Kg p.c. (Sabino, 1999).

Studer-Rohr et al. (1995) afirmaram que o consumo regular de café pode contribuir para a exposição da ocratoxina A aos seres humanos. A conclusão deste trabalho foi contraditória a de vários estudos que demonstraram que o café torrado não é a principal fonte de ocratoxina A na dieta, e que os níveis encontrados estão muito abaixo dos limites de segurança (Pittet et al., 1996; Patel et al., 1997; Stegen et al., 1997).

2.10 Termoestabilidade de OTA

A molécula da OTA é bastante ativa, graças a vários grupos funcionais. É solúvel em solventes polares e apolares, e a água é um bom extrator tanto em ambiente ácidos como alcalinos. É intensamente fluorescente sob luz UV a 335 nm, mas em café verde essa fluorescência é impedida pela presença maciça de escopoletina, um parente do “Moiety cumáric” de OTA (Petracco, 1999).

(Esta molécula é termicamente estável, o que explica em parte sua persistência depois de ser aquecida a temperaturas de até 270°C, como relata

Studer-Rohr et al. (1995). Dados obtidos em laboratórios são muitas vezes conflitantes, como citado por Viani (1996). Em escala maior, Blanc et al. (1998) mostraram que, em processo de torrefação industrial, somente 16% da OTA original permaneceu no café torrado.

(Tsubouchi et al. (1987) relatam que o café sendo torrado a 200° C por 10 a 20 minutos tem um pequeno efeito sobre o nível de ocratoxina A. A destruição da OTA ficou entre 0 a 12% das amostras naturalmente contaminadas; além disso, toda a toxina presente no café torrado pode ser incluída na bebida.)

Em quatro de cinco trabalhos feitos por Studer-Rohr et al. (1994), eles observaram uma variação de destruição de ocratoxina entre 50-100%, sendo que em outro estudo, a destruição ficou em torno de 10%. Em seu trabalho, das 25 amostras analisadas 13 estavam contaminadas com concentrações variando de 1, 2 e 56 Mg/Kg. Foi observada mínima redução da OTA durante a torração.

Cantáfora et al. (1983) analisaram 40 amostras de grãos de café cru utilizando CLAE, destas amostras 9 apresentaram contaminação que variou de 0,5 a 23,0 µg/Kg. Das amostras brasileiras, 10 de grãos de café e 7 de café torrado descafeinado, nenhuma apresentou contaminação com a toxina. Na avaliação do destino da ocratoxina A após a torração, 90% da toxina foram destruídas. Os autores concluíram que os níveis detectados e a porcentagem de destruição da toxina após a torração suportam a hipótese de que o risco do consumo de ocratoxina pelo café é muito pequeno.

Blanc et al. (1998) avaliaram a presença de ocratoxina em um lote de 50 sacos de grãos de café Robusta naturalmente contaminados e o destino da toxina após a torração. A faixa de contaminação ficou entre 4,0 e 22,1 µg/Kg com uma média de 6,7 µg/Kg. A quantidade de ocratoxina A foi drasticamente reduzida durante a fabricação de café solúvel. Uma pequena quantidade de ocratoxina é reduzida durante a limpeza do café, mas a maior parte foi eliminada durante a torração. Apenas 16% da toxina originalmente presente no café foi detectada

após a fabricação do café solúvel. Em dados não publicados, os autores afirmam que 80% da ocratoxina presente no café torrado podem ser transferidos para a xícara. Eles concluem ainda que a torração dos grãos de café e o café solúvel são as menores fontes de ocratoxina A na dieta, igualmente quando preparados com grãos de café altamente contaminado.

Micco et al. (1989) avaliaram a presença de ocratoxina A em 29 amostras de grãos de café. Destas amostras, 17 (58%) apresentaram contaminação com ocratoxina. Das 14 amostras brasileiras analisadas 10 apresentaram contaminação que variou de 0,2 a 5,5 $\mu\text{g}/\text{Kg}$. Na avaliação do destino da ocratoxina durante a torração dos grãos de café nas amostras artificialmente contaminadas, a destruição da ocratoxina A variou de 47 a 87%; já nas amostras naturalmente contaminadas, a destruição foi ainda maior, ficando entre 90 a 100%. A migração da ocratoxina A para a bebida também foi avaliada em amostras de café torrado artificialmente, contaminado com 6,0 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, não sendo detectada a toxina na bebida.

2.11 Formas de contaminação

A ocorrência das micotoxinas na cadeia alimentar humana e animal pode se dar direta ou indiretamente. Na contaminação direta, o substrato para o crescimento do fungo toxigênico é o próprio alimento, podendo acontecer em diferentes estágios da produção, beneficiamento, transporte e/ou armazenamento. Já a contaminação indireta ocorre quando ingredientes do alimento recebem a micotoxina ou no caso de produtos de origem animal, em que tenha ocorrido a ingestão de ração contaminada (Carvalho, 1995). Entretanto, deve-se considerar que a presença do fungo num dado substrato não fica necessariamente que as micotoxinas estejam presentes.

2.12 Fatores que interferem na produção de micotoxinas

Os produtos agrícolas estão susceptíveis à contaminação por fungos, em qualquer etapa da produção, sempre que as condições necessárias favoreçam seu desenvolvimento e a formação de micotoxinas (Kamimura, 1996). —A contaminação por micotoxinas é um processo dinâmico entre a fisiologia da planta, do fungo e do meio (Resnik, 1993), sendo que fatores intrínsecos e extrínsecos afetam a sua produção.

A capacidade de sintetizar uma micotoxina não depende somente da espécie do fungo, mas também da cepa em questão, podendo diferir no tipo e quantidade de micotoxinas produzidas. Outra variável importante é a concentração do inóculo, ou seja, a quantidade de conídios presentes tanto no solo e na atmosfera, quanto no substrato propriamente dito, sendo maior a probabilidade de contaminação quanto maior for a concentração. O ecossistema microbiano pode interferir estimulando ou prejudicando o crescimento fúngico e a produção de micotoxinas, dependendo das interações entre as diferentes formas presentes. Quando vários fungos invadem simultaneamente um alimento, pode existir competição entre eles em relação ao crescimento do fungo e a produção de micotoxinas (Resnik, 1993).

Recentemente foi comprovada, a absorção da toxina presente em solo por raízes. Os principais fungos produtores de ocratoxina A e que são freqüentemente isoladas de grãos de café são do gênero *Aspergillus*, com as espécies pertencentes às Seções *Circundati* e *Nigri* e o gênero *Penicillium*, representado principalmente pela espécie *Penicillium verrucosum*. Todavia, o conhecimento de como e onde ocorre a contaminação e produção da micotoxina ainda não foi totalmente esclarecido. Mantle (2000) demonstrou a possibilidade de que a presença de traços e quantidades superiores a 1 ppb de ocratoxina A podem ser absorvidas do solo pela árvore do café até o fruto. Sendo assim, a

presença no solo de substrato favorável à colonização dos fungos pode contribuir para presença da toxina em grãos de café.

2.12.1 Fatores intrínsecos

Quando uma cepa fúngica tem potencial genético para produzir uma micotoxina, seu crescimento, bem como o nível de micotoxina produzido dependerá dos nutrientes disponíveis no substrato. No caso dos fungos capazes de produzir mais de uma micotoxina, a composição também influi sobre as quantidades relativas das toxinas produzidas (Resnik, 1993).

Concentrações elevadas de carboidratos e ácidos graxos intensificam significativamente a produção de micotoxinas, como pôde ser observado em estudos com coco fresco (Arseculeratue et al., 1969). Certos microcomponentes que estimulam a produção de micotoxinas, podem não ter influência alguma sobre o crescimento do microrganismo (Resnik, 1993)

A atividade de água do alimento e o pH, entre outros, são fatores relacionados ao substrato que também determinam o crescimento fúngico e a produção de micotoxinas (Resnik, 1993).

2.12.2 Fatores extrínsecos

O meio ambiente interage não somente com o fungo, mas também com o substrato. Desta forma, temperatura, umidade relativa, aeração, luz e tempo são alguns fatores extrínsecos determinantes. Características particulares do solo se a utilização de fertilizantes, fungicidas e inseticidas afetam as inter-relações entre fungo, substrato e meio ambientes, interferindo no crescimento destes microrganismos e na produção de micotoxinas (Resnik, 1993).

2.13 Determinação de ocratoxina A em café verde

Os procedimentos analíticos para detecção de micotoxinas em alimentos seguem, geralmente, a mesma seqüência de etapas: amostragem, extração, purificação, separação, detecção, quantificação e confirmação final (Kamimura, 1996).

2.14 Amostragem de grãos de café para exame de micotoxinas

As condições climáticas das áreas produtoras de café indicam a necessidade de um controle contínuo da incidência de micotoxinas. A maioria dos estudos realizados, visando este problema, tem dado uma atenção especial às amostras de café comercial, mas nenhuma informação está disponível sobre o nível de contaminação em grandes lotes de grãos de café, obtido por um plano de amostragem baseado estatisticamente (Micco et al., 1992).

Um dos principais fatores que influenciam na variabilidade dos resultados de micotoxinas é a amostragem. O plano de amostragem consiste em três etapas independentes: amostragem, onde a amostra é coletada do lote; preparo das amostras, a amostra é moída para reduzir o tamanho das partículas aumentando assim a superfície de contato entre as partículas e o solvente de extração, reduzindo também a alíquota para a análise e, finalmente, a etapa analítica, esta relacionada com o plano de amostragem é a soma das variações.

Os resultados analíticos tendem a aumentar quanto maior a massa de amostra analisada, métodos analíticos mais precisos e analistas bem preparados

Sabino (1998b) relata que um programa de exame é aquele no qual a meta é determinar se existe ou não um problema potencial em amostras selecionadas por parte de micotoxinas conhecidas. Um programa de monitoramento é aquele no qual um material (alimento) é analisado para verificação de determinada micotoxina para que se estabeleça de imediato se o problema existe. O sistema de monitoramento pode compreender alimentos

nacionais e alimentos importados e as amostras podem ser individuais e compostas. E que em função de saúde pública é necessário que os alimentos sejam controlados de maneira apropriada.

As micotoxinas são conhecidas por contaminarem produtos agrícolas em uma distribuição extremamente heterogênea. Especificamente para os grãos de café cru quase não há dados publicados sobre o padrão de homogeneidade de ocratoxina A, nem procedimentos de amostragem estatisticamente válidos (Stegen et al., 1997).

2.15 Validação e escolha dos métodos analíticos

Para Sabino (1998a) erros na análise podem ter conseqüências sérias: perdas econômicas para indústrias de alimentos, perda da credibilidade do laboratório e possíveis enfermidades, danos à população além de levar freqüentemente a tomada de decisões erradas, custos elevados e divergências entre instituições.

A disponibilidade de métodos de análises tem disputado um papel chave nos levantamentos da incidência de micotoxinas, por suas concentrações variarem de μg a mg/Kg as técnicas analíticas exigem métodos com alta sensibilidade. Um método ideal deve ser simples, rápido, sensível, seletivo, barato, automatizado ou com possibilidades de automação, além de apresentar boa precisão e exatidão. Desta forma, estes parâmetros definem a eficiência de um método (Coker, 1984).

Metodologias desenvolvidas ou padronizadas devem ser validadas, em estudos inter e/ou intralaboratoriais, objetivando o conhecimento de seu potencial aplicativo e suas limitações. Para isto são avaliados exatidão, precisão, linearidade, especificidade, limites de detecção e quantificação e alcance. A exatidão é a variação entre o valor obtido na dosagem e o valor real do analito na matriz. Pode ser determinada pela análise de amostras com quantidades

conhecidas do analito e um branco, para garantir a ausência de interferentes. A precisão indica o grau de dispersão de diversos valores individuais em torno do valor mais provável, é a conformidade ou repetibilidade e pode ser expressa em termos de coeficientes de variação ou desvio padrão relativo. Já a região de linearidade é a faixa de concentração na qual os resultados obtidos pelo sistema de quantificação são proporcionais à concentração. A especificidade é a capacidade de medir somente o analito, mesmo na presença de interferentes. O limite de detecção refere-se a menor concentração do analito que pode ser determinada, de forma segura, sob condições experimentais. O limite de quantificação é a concentração mínima que pode ser medida com um grau de confiança aceitável. Já o alcance do método é estabelecido trabalhando-se com diferentes matrizes para avaliação de sua versatilidade na dosagem do analito (Thompson & Wood, 1993; Thompson & Wood, 1995; Sabino, 1996).

Tem sido sugerido o emprego da variável reduzida z (z -score) em testes para medir a competência técnica de um determinado laboratório na quantificação de um analito específico, em estudos interlaboratoriais (Thompson & Wood, 1993). A variável reduzida z , dada pela equação $z = (x - x^*) / \sigma$, pressupõe o conhecimento de x^* , a melhor estimativa de x e de σ , que representa o valor-alvo do desvio padrão. Somente valores absolutos de z iguais ou menores que 2 são considerados satisfatórios. Quando estes valores são maiores que 2 e menores que 3 os resultados são questionáveis e quando maiores ou iguais a 3 são insatisfatórios.

Scussel em 1998, estudando vantagens e desvantagens do uso de vários métodos aponta que entre os mais utilizados em análise de micotoxina estão os de imunensaio e os cromatográficos. A mesma autora cita que a automação apresenta diversas vantagens: maior precisão da injeção; a automação aumenta a seletividade; sensibilidade; precisão acuidade; velocidade; simplicidade da

análise; melhora a produtividade do pessoal; confere retorno dos gastos com equipamentos em longo prazo.

Para isso o analista deve trabalhar com um método validado, verificando sempre que pode ser obtido resultado confiável com o método escolhido.

Atualmente, a metodologia mais precisa é baseada na extração com solventes orgânicos, uma purificação da toxina com coluna de imunoafinidade e a detecção e quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE. A maior vantagem do uso de colunas de imunoafinidade para a purificação nas análises de micotoxinas é a habilidade de extrair essencialmente a toxina produzida em diferentes matrizes, obtendo altas recuperações e produzindo um cromatograma livres de interferentes (Sharman et al., 1992).

2.16 Utilização da cromatografia líquida de alta eficiência CLAE

A cromatografia é um processo de separação de misturas moleculares, através de duas fases imiscíveis no qual uma desloca-se em relação à outra. Ocorre a separação dos componentes de uma amostra em duas fases: a fase móvel e a fase estacionária. A realização da separação ocorre devido a interação do componente com a fase estacionária/fase móvel; após a separação, é feita a identificação e a quantificação (Meyer, 1993).

Segundo Lanças (1993), os princípios gerais da cromatografia tiveram início em 1903, devido a alguns trabalhos desenvolvidos por Tswett, desde então o processo vem sendo aperfeiçoado, como a adição de alta pressão na cromatografia para melhorar a performance.

Meyer (1993), afirma que a cromatografia líquida teve início no final dos anos 60, surgindo devido a cromatografia gasosa ter tomado conta dos laboratórios, porém no caso de muitas amostras, a cromatografia gasosa não mostrava um desempenho satisfatório. A cromatografia clássica é uma técnica muito demorada, já a de alta eficiência apresenta-se distinta. A cromatografia

líquida de alta eficiência ou performance (HPLC ou CLAE), recebe esta denominação por ser feita em alta pressão, rápida e com grande eficiência na separação. De maneira geral, a abreviação HPLC é a mais utilizada pelo mundo, fato que padroniza o uso desta sigla para identificação do processo de cromatografia líquida de alta eficiência.

A cromatografia líquida de alta eficiência possui muitas vantagens em relação às demais técnicas cromatográficas, pois com uma amostra, podemos determinar diversas substâncias distintas e ainda obter a concentração em números (até 10^{-12} g/mL).

2.17 Saúde pública

Na união Européia, mercado formado por quinze países membros e uma população de 300 milhões de pessoas, procura-se proteger a saúde pública, com base em mecanismos que garantam a qualidade, segurança e eficácia de produtos que ali circulam (Agriannual, 2000).

2.18 Legislação

O primeiro limite legal contra a importação de café verde contendo OTA foi imposto pela Hungria, seguida pela Finlândia que colocou um limite de 10 ppb (Petracco, 1999).

As autoridades da União Européia, em Bruxelas, atualmente estão considerando a implementação de um limite comum para matéria-prima contaminada, incluindo o café. A possibilidade de um limite duplo também é discutida, a se estabelecer tanto no café verde importado quanto no café torrado vendido no varejo (Petracco, 1999).

As legislações para os alimentos servem para proteger a saúde dos consumidores, os interesses econômicos dos produtores e os comercializantes destes produtos (Egmond, 1998).

Sendo a micotoxina um contaminante natural de muitos produtos, e os processos que sofrem os alimentos não são capazes de eliminar completamente as micotoxinas, cabe aos órgãos oficiais de saúde pública chegar a um compromisso de decisão reguladora em face da informação limitada sobre o efeito tóxico, ou outros efeitos negativos das micotoxinas (Sabino, 1999a).

Egmond (1998), menciona que são muitos os fatos que podem interferir no limites de tolerância das micotoxinas, tanto os de natureza científica como os não científicos, entre eles disponibilidade de dados toxicológicos; disponibilidade de dados sobre a presença de micotoxinas em vários produtos básicos; conhecimento da distribuição das concentrações de micotoxinas nos lotes; disponibilidade de métodos analíticos; legislação em outros países com os quais existem contatos comerciais; e a necessidade de um abastecimento de alimentos suficiente

Poucos países possuem limites para ocratoxina A específicos para grãos e produtos de café. Na Grécia, o limite de ocratoxina A em café cru é de 20 ppb. A maioria dos países europeus estão propondo, para consumo humano, um limite entre 4 e 5ppb para ocratoxina A em cereais e grãos de uma maneira geral, sem especificação do produto (Soares, 1999).

2.19 Prevenção e controle de OTA

Como medida de controle para evitar a contaminação de ocratoxina A, serão necessárias medidas, visando entre outros fatores limitar a contaminação na lavoura. Para determinar como a contaminação de ocratoxina A surge durante as fases de produção e armazenamento de grãos verdes, as medidas efetivas estão em procedimentos do tipo APPCC (Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle), para os quais são necessárias informações fundamentais, o que inclui um conhecimento melhor das espécies não toxigênicas e das condições

ambientais que favorecem ou inibem a produção de ocratoxina A (Walker, 1997).

A eventual presença de micotoxinas em alimentos, rações e outros produtos exportáveis como café, castanha-do-pará, castanha-de-caju ou de importação como trigo, constitui problema de ordem sanitária de alta prioridade nos países participantes do comércio exterior.

Dada a pressão dos países desenvolvidos, por meio dos serviços de detecção da presença de micotoxinas, os países fornecedores são compelidos a adotarem medidas de prevenção e controle, com expectativas de grande intensificação futura no comércio destes produtos.

A prevenção pode ser feita pela redução da contaminação fúngica dos grãos ainda no campo. Todavia, tal prática não oferece garantias quando as condições de armazenamento e transporte dos produtos não forem adequados, havendo com isso o risco de se reumidecerem em razão de diversos fatores, tais como: más condições de ventilação, presença de goteiras e vazamento nos armazéns ou silos ou mesmo ganho de umidade durante o transporte.

Técnicas utilizadas na prevenção da contaminação, são de difícil execução e de resultado incerto, pois são dependentes das condições climáticas e práticas realizadas por produtores e cerealistas. Assim sendo, quando as medidas preventivas não forem eficientes deve-se utilizar técnicas de detoxificação.

O controle de micotoxinas através das técnicas de detoxificação vem sendo efetuado com relativo sucesso. Entretanto, a prevenção, por meios de práticas agrícolas adequadas ainda é a melhor maneira de se combater a problemática das micotoxinas e micotoxicose.

2.20 Descontaminação

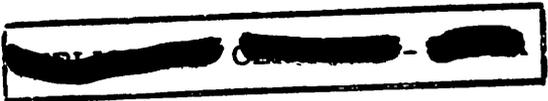
Numerosas técnicas de descontaminação têm sido testadas com obtenção de resultados diversos. Em geral, pode-se dividir os processos de

descontaminação em dois grupos: aqueles que implicam na separação do material contaminado e/ou da toxina presente e aqueles que envolvem a inativação das micotoxinas devido à exposição a fatores físicos, químicos e/ou biológicos (Ellis et al., 1991; Resnik, 1993).

2.21 Perspectivas em relação a micotoxinas para este século

Esta é uma das áreas da ciência e tecnologia em que o Brasil vem conseguindo investigações intensas e de qualidade, impulsionadas por reuniões freqüentes. São mais de 50 laboratórios trabalhando com micotoxina no país.

Dentre os estudos feitos até o momento nota-se necessidade de mais pesquisas dirigidas diretamente para a solução de problemas de contaminações e amostragens seguras para grãos de café.



3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABARCA, M. L.; BRAGULAT, M.R.; CASTELLÁ, G.; CABANES, F. J. New Ochratoxigenic Species in the Genus *Aspergillus*. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 60, n. 2, p. 1580-1582, Feb. 1997.

AGRIANUAL 2000. Anuário da Agricultura Brasileira. São Paulo: FNP, 2000. 546 p.

AMORIM, H.V. Aspectos bioquímicos e histoquímicos do grão de café verdes relacionados com a deterioração da qualidade do café. 1978. 85 f. Tese (Livre Docência em Bioquímica). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

ARSECULERATUE, S. N.; SILVA, L. M. de.; WIJESUNDERA, S.; BANDUNATHA, C. H. S. R. Coconut as a medium for the experimental production of aflatoxin. **Applied Microbiology**, Washington, v. 18, n. 1, p. 88, 1969.

ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association of Official Agricultural Chemists**. Arlington, 1999.

BERJAK, P.; VILLERS, T. A. Ageing in plant embryos. **New Phytologist**, Londres, v. 71, p. 1075-1079, 1972.

BITTANCOURT, A. A. As fermentações e podridões da cereja de café. **Boletim da Superintendência dos Serviços do Café**, v. 32, n. 359, p. 7-14, 1957a.

BITTANCOURT, A. A. O tratamento das cerejas de café para melhorar a bebida. **O Biológico**, São Paulo, v. 23, n. 1, p. 1-11, 1957b.

BLANC, M.; PITTET, A.; MUÑOZ-BOX, R.; VIANI, R. Behavior of ochratoxin A during green coffee roasting and soluble coffee manufacture. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 46, n. 3, p. 673-675, Mar. 1998.

BUCHELI, P.; MEYER, I.; PITTET, A.; VUATAZ, G.; VIANI, R. Industrial storage of green robusta under tropical conditions and its impact on raw material

quality and ochratoxin A content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 46, n. 11, p. 4507-4511, Nov. 1998.

CAMARGO, A. P.; SANTINATO, R.; CORTEZ, J. G. Aptidão climática para qualidade de bebida nas principais regiões cafeeiras de Arábica no Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 18., 1992, Araxá. **Resumos...** Araxá, 1992. p.70-74.

CANTÁFORA, A.; GROSSI, M.; MIRAGLIA, M.; BENELLI, L. Determination of ochratoxin A in coffee beans using reversed-phase high performance liquid chromatography. **La Rivista della Società Italiana di Sienza dell'Alimentazione**, Roma, n. 12, p. 103-108, 1983.

CARVALHO, E. C. Q. Micotoxinas e alimentos: implicações na saúde humana e animal. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, Niterói, v. 2, p. 27-31, 1995.

CARVALHO, V. D. de; CHAGAS, S. J. de R.; CHALFOUN, S. M. Fatores que afetam a qualidade do café. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.18, n.187, p. 5-20, 1997

CARVALHO, V. D. de; CHAGAS, S. J. R.; CHALFOUN, S. M.; BOTREL, N., JUSTE JÚNIOR, E. S. G. Relação entre a composição físico-química e química do grão beneficiado e a qualidade de bebida do café. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 3, p. 449-454, mar. 1994.

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

CARVALHO, V. D. de; LEITE, I. P. Influência do local de cultivo e do tipo de colheita nas características físicas, composição química o grão e qualidade do café. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 2, p. 299-308, fev. 1994

CHAGAS, S. J. de R. Caracterização química qualitativa de cafés de alguns município de três regiões produtoras de Minas Gerais. 1994. 83 p. Tese (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

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

CHALFOUN, S. M.; CARVALHO, V. D. de; GUIMARÃES, P. T. G. **Manual de preservação e melhoria na qualidade do café nas fases de pré e pós colheita. Programa Nacional de Qualidade Total na Produção de Café.** Belo Horizonte: EPAMIG/COOPARAÍSO, 1992.

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

CIEGLER, A. Bioproduction of ochratoxin A and penicillic acid by members of the *Aspergillus ochraceus* group. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 18, n. 5, p. 631-636, May 1972.

COKER, R. D. High performance liquid chromatography and other chemical quantification methods used in the analysis of mucotoxins in foods. In: GILBERT, J. (Ed.). **Analysis of food contaminant.** London: Elsevier, 1984. p. 207-263.

COLE, R. J.; COX, R. H. Ochratoxins. In: **Handbook of toxic fungal metabolites.** New York: Academic Press, 1981. p. 128-151.

EGMOND, H. P. Regulamentación mundial de las micotoxinas. In: **CONFERENCIA INTERNACIONAL FAO/ OMS/PMS SOBRE MICOTOXINAS**, 3., 1998, Túnez. **Anais...** Tunes, 1998. p. 1-8

ELLIS, W. O.; SMITH, J. P.; SIMPSON, B. K. Aflatoxins in foods: occurrence, biosynthesis, effects on organisms, detection, and methods of control. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Cleveland, v. 30, p. 403-439, 1991.

FLORIANI, C. G. **Café: a certificação é o caminho.** Belo Horizonte: IMA, 1999. 18 p. (Agro Técnico, Caderno Técnico - IMA, n. 1).

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Recommended practices for the prevention of mycotoxins in food, feed and their products.** Roma, 1997. p. 29-32.

FORSYTH, W. G. C. Physiological aspects of curing plant products. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 15, p. 443-450, 1964.

FURLANI, R. P. Z.; OLIVEIRA, P. L. C.; SOARES, L. M. V. Ocratoxina A em cafés verdes brasileiros: diferenças com relação a espécie . In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL SOBRE BIOTECNOLOGIA NA AGROINDÚSTRIA CAFEEIRA, 3., 2000, Londrina. **Programas e resumos...** Londrina: IAPAR/IRD, 1999. p. 19.

HWANG, C.; DRAUGHON, F. A. Degradation of ochratoxin A by *Acinetobacter calcoaceticus*. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 57, n. 5, p. 410-414, May 1994.

ILLY, A.; ILLY, E.; MACRAE, R.; PETRARCCO, M.; SONDAHL, M. R.; VALUSSI, S.; VIANI, R. **Espresso coffee: the chemistry of quality**. San Diego, Academic Press, 1995.

KAMIMURA, H. **Problems of mycotoxin in food sanitation**. 2. ed. Tokyo: JICA, 1996. 52 p. (Texto Técnico).

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

KRUG, H. P. **A origem da variação da bebida dos nossos cafés**. Campinas: Sociedade Rural Brasileira, 1941. 393 p.

LANÇAS, F. M. **Cromatografia em fase gasosa**. São Carlos: Acta, 1993. 254 p.

LEE, H. B.; MAGAN, N. Impact of environmental and interspecific interaction between spoilage fungi and *Aspergillus ochraceus* on growth and ochratoxin production in maize grain. **International Journal Food Microbiology**, Amsterdam, v. 61, p. 11-16, 2000.

LEITE, I. P. **Influência do local de cultivo e do tipo de colheita nas características físicas, composição química do grão e qualidade do café (*Coffea arabica* L.)**. 1991. 131 f. Tese (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras.

LEONI, L. A. B.; OLIVEIRA, P. L. C.; SOARES, L. M. V. Incidência de ocratoxina A em café solúvel comercializado no município de Campinas-SP. In: **SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS: educação, pesquisa e desenvolvimento**, 3., 1999, Campinas. **Anais...** Campinas: UNICAMP, 1999. p. 58.

MAGAN, N.; LACEY, J. Effect of water activity, temperature and substrate on interactions between field and storage fungi. **Transaction British Mycological Society**, Cambridge, v. 82, n. 1, p. 83-93, Jan. 1984.

MANTLE, P. G. Uptake of radiolabelled ochratoxin A from soil by coffee plants. **Phytochemistry**, St. Paul, v. 53, n. 4, p. 377-378. Apr. 2000.

MERWE, K. J. van der; STEYN, P. S.; FOURIE, L. Micotoxins. Part. II. The constitution of ochratoxins A, B, and C, metabolites of *Aspergillus ochraceus* Wilh. **Journal of the Chemical Society**, London, p. 7083-7088, 1965.

MICCO, M.; GROSSI, M.; MIRAGLIA, M.; BRERA, C. A study of the contamination by ochratoxin A of green e roasted coffee beans. **Food Additives and Contaminants**, London,, v. 6, 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 artificial y contaminated green coffe beans. **Mycotoxin Research**, Mainz, v. 8, p. 93-97, 1992.

MILLER, J. D.; TRENHOLM, H. L. **Mycotoxins in grain: compounds other than Aflatoxin**. St. Paul, Minnessota: Eagan Press, 1994.

MOREAU, C. **Moulds, toxins and food**. London: John Wiley, 1979.

MOSS, M. O. Mode of formation of Ochratoxin A. **Food Additives and Contaminants**, Hants, v. 13, p. 5-9, 1996a . Supplement.

MOSS, M. O. Mycotoxins. **Mycological Research**, Cambridge, v. 100, n. 5, p. 513-523, 1996b.

MEYER, V. R. **Pratical high-performance liquid chromatograpy**. New York: J. Wiley, 1993. 376 p.

NAIDU, R. Mycotoxins in coffee. **Indian Coffee**, Bangalore, v. 60, n. 8, p. 9-11, Ago. 1996.

PATEL, S.; HAZEL, C. M.; WINTERTON, A. G. M.; GLEADLE, A. E. Survey ochratoxin A in UK retail coffees. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 14, n. 3, p. 217-222, 1997.

PEREIRA, R. G. F. A. Efeito da inclusão de grãos defeituosos na composição química e qualidade do café (*Coffea arábica L.*) “estritamente mole”. 1997.

96 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

PETERSSON, S.; HANSEN, M. W.; AXBERG, K.; HULT, K.; SCHNÜNER, J. Ochratoxin A accumulation in cultures of *Penicillium verrucosum* with the antagonistic yeast *Pichia anomala* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 102, n. 8, p. 1003-1008, Aug. 1998.

PETRACCO, M. Influências da variedade botânica sobre a qualidade organoléptica do café expresso. In: ENCONTRO SOBRE PRODUÇÃO DE CAFÉ COM QUALIDADE, 1., 1999, Viçosa. Livro de palestras... Viçosa: UFV, 1999. p. 216-227.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. 2. ed. Cambridge: Chapman & Hall, 1999. 593 p.

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

PRADO, G.; OLIVEIRA, M. S. de; ABRANTES, F.M.; SANTOS, L. G. dos; VELOSO, T.; BARROSO, R. E. de S. Incidência de ocratoxina A em café torrado e moído e em café solúvel consumido na cidade de Belo Horizonte, MG. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 20, n. 2, p. 192-196, maio/ago. 2000.

RESNIK, S. L. **Prevencion y control de las micotoxinas durante la cadena de postcosecha**. Buenos Aires: Faculdade de Ciências Exatas e Naturales, 1993. 79 p. (Reunión Técnica sobre Secamento de Granos).

SABINO, M. Confiabilidade e reprodutibilidade das técnicas analíticas. In: CRUZ, L. C. H. **Micotoxinas: perspectiva latinoamericana**. (S.I.): Sociedade Latinoamericana de Micotoxicologia, 1996. p. 53-58.

SABINO, M. Escolha de metodologia analítica para uso na vigilância sanitária. In: ENCONTRO NACIONAL DE MICOTOXINAS, 9.; SIMPÓSIO EM ARMAZENAGEM DE GRÃOS DO MERCOSUL, 1998, Florianópolis. Livro de resumos... Florianópolis, 1998a. p. 14.

SABINO, M. Normas e níveis de tolerância de micotoxinas no Brasil, no Mercosul e no mundo. In: MOLIN, R.; VALENTIN, M. L. (Ed.). **Simpósio sobre micotoxinas em grãos**. Campinas: Fundação Cargill, 1999. 208 p

SABINO, M. Programa nacional de monitoração de micotoxinas. In: ENCONTRO NACIONAL DE MICOTOXINAS, 9.; SIMPÓSIO EM ARMAZENAGEM DE GRÃOS DO MERCOSUL, 1998, Florianópolis. **Livro de resumos...** Florianópolis, 1998b. p. 30.

SCUSSEL, V. M. **Micotoxinas em alimentos**. Florianópolis: Insular, 1998. 144 p.

SAMSON, R. A.; HOEKSTRA, E. S.; FRISVAD, J. C.; FILTENBORG, O. **Introduction to foodborne fungi**. 4. ed. Baarn, Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 1995. 322 p.

SHARMAN, M.; MacDONALD, S.; GILBERT, J. Automated liquid chromatographic determination of ochratoxina A in cereals and animal products using immunoaffinity column clean-up. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 603, p. 285-289, 1992.

SMITH, D.; KOZAKIEWISZ, Z. Physiology of *Aspergillus*. In: SMITH, J.E. **Biotechnology handbooks. 7. Aspergillus**. New York: Plenum Publishing, 1994. p. 23-40.

SMITH, J. E.; ROSS, K. The toxigenic Aspergilli. In: SMITH, J.E.; HENDERSON, R. S. (Ed.). **Mycotoxin and animal foods**. Boca Raton: CRC Press, 1991. p. 101-118.

SOARES, L. S. Ocratoxinas e aflatoxinas em café brasileiro. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL SOBRE BIOTECNOLOGIA NA AGROINDÚSTRIA CAFEEIRA, 3., 1999, Londrina. **Anais...** Londrina: IAPAR/IRD, 1999.

SPADONE, J. C.; TAKEOKA, G.; LIARDON, R. Analytical investigation Rio Off-Flavor in green coffee. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 38, n. 1, p.226-233, 1990.

STEGEN, G. van der; JÖRISSEN, U.; PITTET, A.; SACCON, M.; STEINER, W.; VINCENZI, M.; WINKLER, M.; ZAPP, J.; SCHLATTER, C. H. R. Screening of european coffee final products for occurrence of ochratoxin A (OTA). **Food Additives and Contaminants**, London, v. 14, n. 3, p. 211-216, 1997.

STUDER-ROHR, I.; DIETRICH, D. R.; SCHLATTER, J.; SCHLATTER, C. The occurrence of ochratoxin A in coffee. **Food Chemistry and Toxicology**, Oxford, v. 33, n. 5, p. 341-355, 1995.

STUDER-ROHR, I.; DIETRICH, D. R.; SCHLATTER, J.; SCHLATTER, C. Ochratoxin A and coffee. **Mitteilungen aus der Gebiete Lebensmitteluntersuchung und Hygiene**, Bern, v. 85, p. 719-727, 1994

THOMPSON, M.; WOOD, R. Harmonized guidelines for internal quality control in analytical chemistry laboratories. **Pure and Applied Chemistry**, Oxford, v. 67, p. 649-666, 1995.

THOMPSON, M.; WOOD, R. International harmonized protocol for proficiency testing of (chemical) analytical laboratories. **Journal of Association of Official Analytical Chemists International**, Arlington, v. 76, p. 926-940, 1993.

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**, Dordrecht, v. 97, p. 111-115, 1987.

VARGA, J.; KEVEL, E.; RINYU, E.; TÉREN, J.; KOZAKIEWICZ, Z. Ochratoxin production by *Aspergillus* species. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62. n.12, p. 4461-4464, Dec. 1996.

VARGA, J.; RIGÓ, K.; TÉREN, J. Degradation of ochratoxin A by *Aspergillus* species. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 59, p. 1-7, 2000.

VIANI, R. Fate of ochratoxin A (OTA) during processing of coffee. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 14, p. 29-33, 1996. Supplement.

VILLERS, T. A. Ageing and longevity of seeds in field conditions. In: HEYDECKER, W. (Ed.). **Seed ecology**. Pennsylvania: Pennsylvania State University Press, 1973. p. 2654-2880.

WALKER, R. Quality and safety of coffee. In: COLLOQUE SCIENTIFIQUE INTERNATIONAL SUR LE CAFÉ, 17., 1997, Nairobi, Kenya. Nairobi: ASIC, 1997.

WOODSTOCK, L. W. Seed inhibition: a critical period for successful germination. *Journal of Seed Science*, Lansing, v. 12, n. 1, p. 1-15, 1988.

CAPÍTULO 2

IDENTIFICAÇÃO, QUANTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL OCRATOXIGÊNICO DE ESPÉCIES DE *Aspergillus* DA SEÇÃO *Circundati* E *Penicillium* spp. ASSOCIADOS A GRÃOS DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.) SEPARADOS POR PENEIRAS

RESUMO

NASSER, Patrícia Prado. Identificação, quantificação e avaliação do potencial ocratoxigênico de espécies de *Aspergillus* da seção *Circundati* e *Penicillium* spp. associados a grãos de café (*Coffea arabica* L.) separados por peneiras. In: _____ . **Influência da separação de grãos de café (*Coffea arabica* L.) por tamanho na qualidade e ocorrência de ocratoxina A.** 2001. Cap. 2, p. 44-67. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

Com o objetivo de identificar, quantificar e avaliar o potencial ocratoxigênico das espécies de *Aspergillus* da seção *Circundati* e *Penicillium* spp. amostras de grãos de café beneficiados separados em peneiras, foram plaqueados antes e após desinfecção superficial. Cinquenta e cinco isolados de *Aspergillus* da seção *Circundati* e três de *Penicillium* spp. foram , identificados e testadas quanto a capacidade de produzir ocratoxina A. Sendo encontradas três espécies diferentes (*Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus sulphureus* e *Aspergillus sclerotiorum*) da seção *Circundati* e uma espécie de *Penicillium* (*brevecompactum*). 29 isolados (50%) foram produtores quando testados quanto á produção de ocratoxina A em meio YES. A seleção dos grãos em diferentes peneiras mostrou-se eficaz na redução dos índices de ocorrência (IO) e severidade dos fungos (ISC) e na redução do número de isolados ocratoxigênicos associados aos grãos.

Comitê Orientador: Dr^a Sara Maria Chalfoun de Souza – EPAMIG
(Orientadora)MSc Eugênia A. Vargas – LAQCASA/LAV-MG (Co-orientador) Dr Mário Lúcio Vilela de Resende – UFPA (Co-orientador)

ABSTRACT

NASSER, Patricia Prado. Identification, quantification and evaluation of the ochratoxigenic potential of species of *Aspergillus* of the section *Circundati* and *Penicillium* spp associated with coffee beans and separated by sieves. In: _____ . Influence of separation of coffee beans (*Coffea arabica* L.) by size on quality and occurrence of ochratoxin A. 2001. Chap. 2, p. 44-67. Dissertation (Master's degree in Food Science) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

With a view to identifying, quantifying and evaluating the ochratoxigenic potential of the species of *Aspergillus* of the section *Circundati* and *Penicillium* spp. samples of processed coffee beans separated by sieves were plated before and after surface disinfection. Fifty and five isolates of *Aspergillus* of the section *Circundati* and three isolates of *Penicillium* spp. were identified and tested as to the ochratoxin A producing capacity. Three different species (*Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus sulphureus* and *Aspergillus sclerotiorum*) and one species of *Penicillium* (*P.brevecompactum*) were found. When tested for the production of ochratoxin A in the YES medium, 29 isolates (50%) were producers. Bean screening in different sieves proved to be efficient in reducing the occurrence index (OI) and the fungal severity index (FSI) and in the reduction of the number of ochratoxigenic isolates associated with beans.

Guidance Committee: Dr^a Sara Maria Chalfoun de Souza – EPAMIG (Adviser professor) MSc Eugênia A. Vargas – LAQCASA/LAV–MG (Co-adviser) and Dr Mário Lúcio Vilela de Resende – UFLA (Co-adviser)

1 INTRODUÇÃO

Desde o século dezessete, mais precisamente em 1830, o Brasil é o maior produtor de café do mundo. O estado brasileiro onde mais se produz café é Minas Gerais, sua participação representando, segundo Floriani (1999), 51,40% da produção total brasileira ou 13,26% da produção mundial.

É de conhecimento secular que a atividade de fungos ocasiona alterações na qualidade dos alimentos. Às vezes estas mudanças são desejáveis, mas dependendo do tipo de microrganismo envolvido elas provocam alterações indesejáveis como no caso do café, produzindo sabores e aromas desagradáveis causados por diferentes graus de deterioração, além de colocarem em risco potencial a saúde desses consumidores com a produção de micotoxinas.

As espécies de maior expressão associadas a grãos de café incluem os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* (Mislivec et al., 1983). Entre as toxinas produzidas por fungos em grãos de café, a ocratoxina A (OTA) é a que tem gerado maior preocupação. Entretanto, dentro de uma mesma espécie considerada toxigênica, muitas linhagens não possuem esta propriedade, entre esses isolados a produção de toxina pode variar até 1000 vezes (Bars & Bars, 1999), por isso trabalhos vêm sendo realizados para melhorar o entendimento dos fatores e condições que permitem o conhecimento das espécies colonizadoras e o potencial ocratoxigênico das mesmas.

O presente estudo teve como objetivos identificar e quantificar a população fúngica de *Aspergillus* da seção *Circundati* e *Penicillium* spp. associados a grãos de café beneficiados separados em peneiras, bem como avaliar o potencial toxigênico destes isolados identificados quanto à produção de ocratoxina A.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção das amostras

Visando o isolamento, identificação e quantificação dos fungos associados a grãos de café beneficiados foram utilizadas amostras obtidas de lotes previamente classificados em diferentes peneiras através do processo de rebeneficiamento. Para tanto foram coletadas amostras procedentes de diferentes regiões do Estado de Minas Gerais, a saber: Campanha (Região Sul de Minas Gerais); Blend do Sul de Minas (Oliveira, Três Pontas, Campanha e São Sebastião do Paraíso) e Blend da Zona da Mata (Matipó, Manhumirim, Manhuaçu e Caratinga).

Lotes de 20 kg de café beneficiados foram rebeneficiados obtendo-se as seguintes peneiras: peneira 17 acima; peneira 14/16; peneira 13 acima (Sul de Minas); Bica corrida (Campanha e Blend da Zona da Mata) e "quebra", dos quais utilizou-se uma amostra de 500g para se proceder as análises.

2.2 Plaqueamento dos grãos

Para o estudo dos fungos foi utilizada a técnica Blotter Test (Tempe, 1963) adaptada segundo conceitos sobre detecção e isolamentos, uma vez que o plaqueamento direto tem sido considerado a técnica mais efetiva para análise de fungos em alimentos como grãos e castanhas (Samson et al., 1995). Este procedimento foi feito em câmara asséptica com e sem desinfecção dos grãos dando assim oportunidade para que a população fúngica interna e externa se manifestasse.

Foram preparadas placas de Petri com duas folhas de papel de filtro previamente esterilizadas e umedecidas com água destilada esterilizada.

2. 2. 1 Plaqueamento com desinfecção

Os grãos foram imersos por 1 minuto em álcool etílico a 70%. A utilização do álcool é uma garantia de desinfecção superficial quando os grãos estão muito infestados por *Aspergillus* e *Penicillium*, fungos produtores de esporos muito secos e hidrofóbico. Logo em seguida, os grãos foram imersos em hipoclorito a 1% por 2 minutos. O hipoclorito de sódio deve ser usado uma única vez porque é facilmente degradado por partículas orgânicas. E, finalmente, lavou-se três vezes esses grãos com água destilada esterilizada.

2. 2. 2 Plaqueamento sem desinfecção

Os grãos foram transferidos assepticamente para as placas com pinça flambada.

2. 3 Distribuição

Cada repetição constou de 3 placas de Petri. E a distribuição das placas na câmara de incubação foi realizada inteiramente ao acaso. O período de incubação foi de 7 dias a 25°C, até a exteriorização e desenvolvimento dos fungos (Hesseltine et al., 1981; Mazzani, 1994).

2. 4 Isolamento e identificação dos fungos

As observações referentes aos grãos colonizados por fungos foram realizadas a olho nu e, em casos de dúvida, com auxílio de microscópio estereoscópico. Os resultados foram expressos em índice de severidade de contaminação por meio de notas representadas pela percentagem da área do grão colonizada por determinado fungo.

Os fungos foram isolados diretamente dos grãos com base na cor das colônias, assim *Aspergillus ochraceus* de coloração amarela e *Penicillium* spp.

de coloração verde azulada, estes diferenciados dos *Aspergillus* pelo aspecto da colônia. Este procedimento foi feito com o auxílio de palitos de madeira esterilizados em autoclave por 20 minutos a 121°C, sendo os inóculos transferidos para placas de Petri, contendo meio de cultura Agar Malte (MA) e repicados por transferência sucessiva de conídios até a obtenção de culturas puras. Posteriormente, as espécies da sessão *Circundati* foram identificadas, de acordo com Christensen (1981) e Klich & Pitt (1988). E as espécies de *Penicillium* foram identificadas de acordo com Pitt (1988) e Pitt & Hocking (1999).

2.4.1 Procedimento para a identificação de espécies de *Penicillium*

A caracterização e identificação de espécies de gênero *Penicillium* tiveram como base à taxonomia usada por Pitt (1988) e Pitt & Hocking (1999). As culturas puras dos isolados a serem estudados foram encubadas por sete dias em dois meios de cultura Czapeck Agar Extrato de Levedura (CYA) submetido a duas temperaturas de 25°C e 37°C e Agar Extrato de Malte (MEA) submetido a 25°C. A inoculação foi realizada em três pontos equidistantes entre o centro e a borda da placa.

2.4.2 Procedimento para a identificação de espécies de *Aspergillus*

A caracterização e identificação de espécies do gênero *Aspergillus* tiveram como base a taxonomia usada por Klich & Pitt (1988) e Christensen (1981). O sistema de identificação usado para *Aspergillus* foi semelhante ao de *Penicillium*. Foram utilizados dois meios de cultura e duas temperaturas: Czapeck Agar Extrato de Levedura (CYA) incubados a 25°C e 37°C e Agar Extrato de Malte (MEA) a 25°C.

2. 5 Índice de ocorrência e de severidade da contaminação fúngica

Após a exteriorização dos fungos de cada amostra foi realizada a leitura em cada grão registrando os índices de ocorrência e de severidade da contaminação de cada fungo. O índice de ocorrência se refere à presença ou não do fungo nos grãos, dada em percentagem. A severidade da infestação se refere à área da superfície do grão ocupada por colônias do fungo e foi determinada utilizando-se a escala de Prabhu & Bedendo (1988), adaptada para este estudo, sendo: 0 = sem infestação da superfície do grão evidente; 1 = colônias atingindo até 25% da superfície do grão; 2 = colônias atingindo de 26 a 50% da superfície dos grãos; 3 = colônias atingindo de 51 a 75%; 4= colônias atingindo mais que 75% da superfície do grão. Com os dados de severidade de infestação nos grãos, foi calculado o índice de severidade de contaminação pela seguinte fórmula:

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

N x Nota máxima

ISC = Índice de severidade de contaminação

I.O. = Índice de ocorrência de grãos contaminados.

N = número de grãos analisados.

2.6 Potencial ocratoxigênico

Todos os isolados identificados foram testados quanto a capacidade de produzir ocratoxina A

O potencial ocratoxigênico foi detectado com a utilização da técnica de Plug Agar (Filtenborg & Frisvad, 1980).

*Meio utilizado: YES

*Tempo de incubação para detecção: 5 dias

*Temperatura: 25°C

*Material utilizado: Placa de sílica CCD (Merck – Sílica Gel 60, 20 x 20) previamente ativada, Cuba de vidro, fase móvel TEF (Tolueno, Acetato de Etila e Ácido Fórmico 90% (50: 40: 10), Cromatovisor CAMAG (UV – BETRACHTER) com luz ultravioleta de λ 366 nm.

*Padrão: o RF e o spot de fluorescência das amostras capazes de produzir a OTA são semelhantes ao padrão de ocratoxina A injetado.

2.7 Análise estatística para índice de ocorrência (IO) e índice de severidade de contaminação (ISC)

Foi utilizado delineamento inteiramente casualizado com parcela subdividida no espaço (" Split-plot in space") .

Considerou-se três fatores principais, locais onde foram obtidas as amostras, sendo elas oriundas da: Zona da Mata (1), Campanha (2) e Sul de Minas (3); e quatro sub-fatores, ou tamanho de peneiras, analisadas dentre cada fator principal, entre eles: quebra (1); bica corrida ou 13 acima (no caso do blend oriundo do Sul de Minas) (2), 14/16 (3) e 17 acima (4); com três repetições.

As análises estatísticas foram determinadas pelo programa SisVar versão 4.4 (Build 34). Como não foi observada uma normalidade nos dados de IO e ISC, optou-se pela transformação dos mesmos, segundo a seguinte equação em que ocorreu um melhor ajuste na homogeneidade de variância:

$$Y_{ijk} = \sqrt{(Y_{ijk} - 0,5)}$$

em que

Y_{ijk} : é a observação referente ao local i, a peneira j e a repetição k;

Procedeu-se à análise de variância para ambos os caracteres, utilizando o modelo estatístico descrito abaixo, considerando todos os componentes do modelo como aleatórios, exceto a média experimental. Na tentativa de isolar o

efeito da interação entre tratamentos secundários e repetição do resíduo b, foi utilizada uma modificação no modelo sugerido por Steel & Torrie (1980).

$$Y_{ijk} = \mu + l_i + e_{a(ik)} + p_j + (lp)_{ij} + (pr)_{jk} + e_{b(ijk)}$$

em que:

Y_{ijk} : é a observação referente ao local i, a peneira j e a repetição k;

μ : é a media geral do experimento;

l_i : é o efeito do fator principal, ou local i (sendo $i = 1, 2$ e 3);

erro $a_{(ik)}$: é o erro experimental das repetições k ao fator principal – local i,

p_j : é o efeito da peneira j (sendo $j = 1, 2, 3$ e 4);

$(lp)_{ij}$: é o efeito da interação da peneira j com o local i;

$(pr)_{jk}$: é o efeito da interação da peneira j com a repetição k;

erro $b_{(ijk)}$: é o erro experimental total desconsiderando o erro a, sendo erro $a_{(ik)} \sim (0, \sigma^2)$.

3 RESULTADO E DISCUSSÃO

3.1 Identificação

De cada procedência examinou-se 4 amostras com 3 repetições com e sem desinfecção perfazendo um total de 1080 grãos. Das amostras analisadas antes da desinfecção, todas apresentaram contaminações com fungos *Aspergillus* da seção *Circundati* e apenas uma amostra do tratamento "quebra" da Zona da Mata estava contaminada com fungo do gênero *Penicillium*. Das amostras analisadas após desinfecção, nenhuma estava contaminada com fungos *Aspergillus* da seção *Circundati* e apenas uma estava contaminada com fungo do gênero *Penicillium*.

A ocorrência de outros fungos tais como *Aspergillus niger* (33,88%), *Fusarium* (20,41%) e *Cladosporium* (7,59) além de *Mucor* sp, *Colletotrichum* sp e *Rhizopus* sp, (não quantificadas por ocorrerem em nível muito baixos), foi registrada em grãos não desinfetados. Estes não foram considerados uma vez que não se tratavam de objeto do presente estudo.

Os resultados conforme apresentados na TABELA 1, mostraram que dos 58 isolados identificados 34 foram *Aspergillus sulphureus*, 18 *Aspergillus ochraceus*, 3 *Aspergillus sclerotiorum* todos detectados em grãos antes da desinfecção e 3 *Penicillium brevecompactum*, sendo que um destes foi encontrado após desinfecção.

TABELA 1 Resultados dos fungos *Aspergillus* da seção *Circundati* e *Penicillium* spp. isolados e identificados de grãos de café separados em peneiras de diferentes procedências

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

Analisando os tratamentos (diferentes peneiras) de acordo com a procedência, verificou-se que os tratamentos constituídos do Blend do Sul de Minas se mostraram contaminados com fungos *Aspergillus ochraceus* e *Aspergillus sulphureus*.

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

Observa-se ainda uma tendência geral de os tratamentos onde se realizou a separação dos grãos através da classificação em peneiras apresentarem um menor número de isolados dos fungos identificados o que era previsível uma vez que nas parcelas "quebra" e "bica corrida" encontra-se uma maior quantidade de grãos com defeitos e nos quais existe uma maior probabilidade de ocorrência de fungos.

Com relação ao número de isolados observados em cada tratamento com e sem desinfecção, observa-se que de uma maneira geral a desinfecção reduziu o número de isolados obtidos indicando que no momento da análise estes fungos localizavam-se superficialmente nos grãos.

3.1.1 Descrição das espécies de fungos identificados

Subgênero *Circundati* Seção *Circundati*

Aspergillus ochraceus Wilhelm

As colônias sobre CYA mantidas a 25°C de 4,8 a maiores que 5,0 cm de diâmetro, apresentando coloração ocre, micelium variando de creme a esverdeado quando presente, colônias com aspecto sucadas, e reverso pálido com tons de verde-amarelado a marrom escuro; presença de escleródios vinho a púrpura em quase todos os isolados, em média após o 12 dias de incubação. Nenhum dos isolado cresceu em CYA a 37°C. Em MEA, colônias ocre mais claras, com diâmetro acima de 5,0 cm. Poucos isolados apresentaram micelium de coloração branca a esverdeada, reverso predominantemente incolor, com alguns em tons de amarelo-esverdeado no centro.

Cabeça conidial bisseriada, com métulas medindo de 10 a 14µm e as fiálides de 8 a 11µm, vesículas globosas variando de 23 a 70µm, conídios finamente rugosos, pequenos e globosos, com 2 a 3,5µm de diâmetro. Conidióforos rugosos de 400 a 1515 µm.

Aspergillus sclerotiorum Huber

As colônias sobre CYA mantidas a 25°C de 4,8 a 5,4 cm de diâmetro, apresentando coloração ocre, colônias com aspecto pouco sucado, e reverso pálido, com tons bem fracos de marrom, presença de escleródios amarelados nos primeiros dias de incubação. Em CYA a 37°C, crescimento de colônias creme com diâmetro de 0,6 cm, sendo que um isolado não cresceu nesta temperatura. Em MEA, colônias e reverso ocre, com diâmetro acima de 5,0 cm.

Cabeça conidial bisseriada, com métulas medindo de 11 a 13µm e as fiálides de 8 a 9 µm, vesículas globosas variando de 26 a 43µm, conídios finamente rugosos, globosos a subglobosos, variando de 2,5 a 3,0µm. Conidióforos rugosos de 550 a 750 µm de comprimento.

Aspergillus sulphureus (Fres.) Wehmer

As colônias sobre CYA mantidas a 25°C maiores que 5 cm de diâmetro, apresentando coloração ocre amarelado, micélio em tons de creme quando presente, colônias com aspecto suado e reverso pálido tendendo ao amarelo, presença de escleródios amarelo dourado em grande quantidade, com formação logo no primeiros dias de incubação. Crescimento CYA a 37°C variando de 0,55 a 1,0 cm, com uma coloração e reverso pálido próximo do amarelo. Em MEA, colônias ocre amarelada com diâmetro acima de 5cm, reverso predominantemente ocre com alguns em tons de amarelo.

Cabeça conidial bisseriada, com métulas medindo de 06 a 10µm e as fiálides de 07 a 12µm, vesículas globosas variando de 22 a 34µm, conídios pequenos, de forma variada (globosos, subglobosos e elipsoidal), lisos a finamente rugosos e predominantemente medindo 3 a 4µm de diâmetro. Conidióforos finamente rugosos, de 275 a 830 µm de comprimento.

Gênero *Penicillium*

Para a identificação das espécies do gênero *Penicillium*, foi utilizado “A Laboratory Guide to Common *Penicillium* Species” de Pitt (1988). Sendo assim, o nome das espécies identificadas e seus sinônimos estão de acordo esta referência que atualmente é a mais completa disponível para a identificação deste gênero fúngico.

Penicillium brevecompactum Dierckx

Sinônimo (*Penicillium stoloniferum* Thom)

As colônias sobre CYA mantidas a 25°C com diâmetro variando entre 3,8 a 4,1 cm, de coloração verde-acinzentada, aveludadas, colônias suadas com pouco micélio branco nas bordas, reverso da colônia pálido. Não cresceu em CYA a 37°C. Em MEA, colônias verde acinzentada com diâmetro em torno de

2,4 cm, colônias planas e reverso predominantemente acinzentado. Em meio YES, colônias de coloração creme amarronzado no centro e nas bordas tons de verde e reverso creme.

3.2 Quantificação

3.2.1 Índice de ocorrência (IO)

A análise da variância dos índices de ocorrência (IO) e comparação de médias provenientes das amostras dos diferentes tamanhos de peneiras de grão oriundas das 3 localidades encontram-se apresentadas nas TABELAS 1 e 2. Observou-se que somente ocorreu diferença significativa ($P \leq 0,01$) entre os tamanhos de peneiras, indicando que os fungos se manifestavam diferenciadamente entre os tamanhos de grãos.

Observa-se pela TABELA 3 que a porcentagem de ocorrência dos fungos não variou estatisticamente conforme a localidade, no entanto, pode ser observado que as amostras oriundas do município de Campanha, mostraram uma tendência em serem as mais contaminadas, ou seja, tiveram uma média de 11,1% a mais para índice de ocorrência do que em relação aos outros dois locais. O tamanho de peneira independentemente do local, como já mencionado, afetou a manifestação de ocorrência dos fungos, constatando-se que o tamanho 14/16 e 17 acima foram os menos contaminados, apresentando Índice de severidade de contaminação significativamente mais reduzido que os tratamentos “bica corrida” ou 13 acima e a “quebra”.

Com relação à análise de regressão realizada para a interação entre local x peneira, observa-se na FIGURA 1, que realmente o tipo de tratamento mais propenso ao ataque por fungos foi a "quebra". E que a medida em que os grãos foram selecionados em peneiras essa incidência decrescia significativamente.

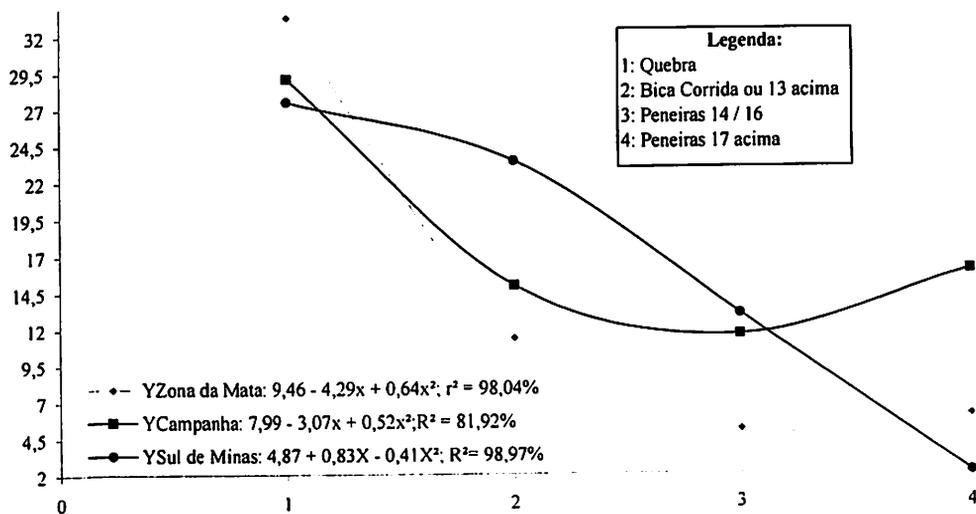


FIGURA 1 Representação das médias ajustadas obtidas a partir da análise de regressão do desdobramento da interação locais x tamanho de peneiras para os dados de índice de ocorrência (IO)

3.2.2 Índice de severidade de contaminação (ISC)

A análise da variância e comparação de média de contaminação do caráter índice de severidade encontram-se apresentadas nas TABELAS 2 e 3. Embora a precisão experimental dentro de local, tenha sido relativamente melhor do que a obtido para o caráter IO, (CV = 44,32%), verificou-se que a maioria das fontes de variação foi não-significativa. Detectou-se diferença significativa apenas em peneiras ($P \leq 0,05$), novamente não sendo detectado qualquer significância para a interação peneira x local.

Quanto as diferenças observadas para tamanho de peneira, foi notado que somente houve diferença significativa pelo teste Scott-Knott para a média da peneira quebra, apresentando uma severidade superior em 52,13, 68,44 e 80,74% respectivamente observadas para as peneiras bica corrida ou 13 acima, 14/16 e 17 acima.

Os resultados obtidos através da análise de regressão, encontram-se representados na FIGURA 2. Esses resultados demonstram a elevada correlação existente entre seleção em peneiras (tratamentos 17 acima, 14/16 e “bica corrida”ou 13 acima) e índice de severidade de contaminação por fungos, a exemplo do que ocorreu com o índice de ocorrência.

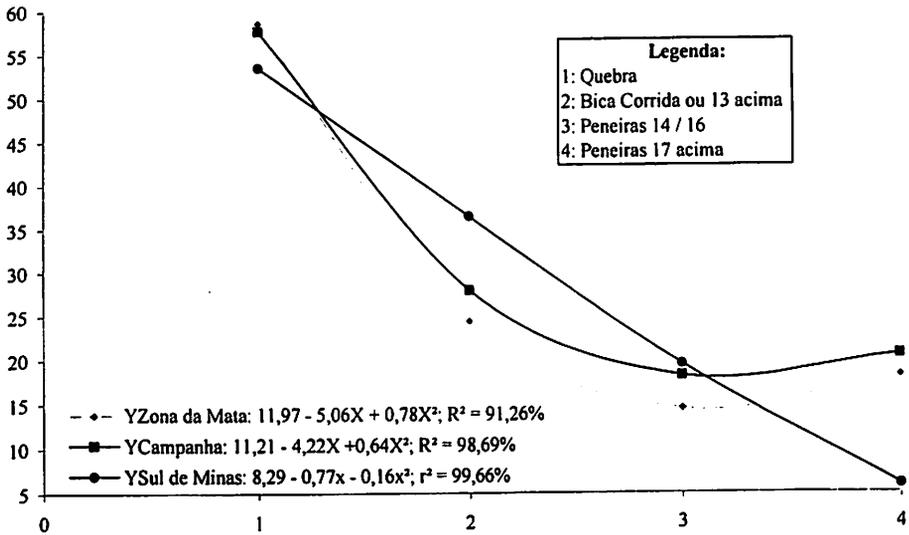


FIGURA 2 Representação das médias ajustadas obtidas a partir da análise de regressão do desdobramento da interação locais x tamanho de peneiras, para os dados de índice de severidade de contaminação (ISC).

TABELA 2 Resumo dos resultados das análises de variâncias dos caracteres analisados, índice de ocorrência (IO) e severidade de contaminação (ISC), expressos em percentuais.

FV	GL	IO		ISC	
		QM	<i>Pr>Fc'</i>	QM	<i>Pr>Fc'</i>
Local (L)	2	0,41	0,9549 Ns	1,40	0,6531 Ns
Erro a	4	8,79		2,96	
Peneira (P)	3	25,69	0,0003 **	13,72	0,0014 *
P x L	6	1,92	0,4937 Ns	2,46	0,2121 Ns
P x repetição	6	4,19	0,1236 Ns	2,35	0,2326 Ns
Erro b	14	2,03		1,51	
Total (N)	36				
CV a	%	56,25		44,32	
CV b	%	27,01		31,70	
Média geral		27,28		14,56	

^{1/} **, *: teste de F significativo aos níveis de 1% e 5% de probabilidade.

^{2/} Os dados analisados foram transformados [Raiz (Y + 0,5)], logo as médias gerais obtidas foram de: 5,27 (IO) e 3,88 (ISC).

TABELA 3 Média Geral observada para índice de ocorrência (IO) e severidade de contaminação (ISC), para os três locais e para os quatro tamanhos de peneiras.

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

^{1/} Médias seguidas pela mesma letra minúscula na vertical, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade. Dados são médias de 3 repetições.

3.3 Potencial ocratoxigênico

TABELA 4 Resultados do potencial ocratoxigênico dos fungos *Aspergillus* da seção *Circundati* e *Penicillium* spp. Isolados e identificados de grãos de café de diferentes procedências

Subgênero/espécie	Número de isolados	Isolados produtores de ocratoxina A confirmados por Plug Agar.	
		Com desinfecção	Sem desinfecção
<i>A. sulphureus</i>	34		12 (+), 22 (ND)
<i>A. ochraceus</i>	18		14 (+), 4(ND)
<i>A. sclerotiorum</i>	3		3 (+)
<i>P.brevecompactum</i>	3	1(ND)	2(ND)

(+) isolado(s) produtor(es) de ocratoxina A, (ND) não detectada

Os resultados referentes a distribuição do potencial toxigênico (DPT) apresentados na TABELA 4, indicam entre os fungos isolados e identificados, pertencentes a seção *Circundati* um percentual de isolados toxigênicos de 35%, 77,8% e 100% respectivamente para os fungos *Aspergillus sulphureus*, *Aspergillus ochraceus* e *Aspergillus sclerotiorum*. Os isolados identificados do Gênero *Penicillium* (*P. brevecompactum*) apresentaram resultado negativo quanto ao potencial ocratoxigênico, concordando com resultados anteriores obtidos por (Batista, 2000; Urbano et al., 2000).

Considerando-se o total de isolados testados (58) verificou-se que 50% destes apresentaram resposta positiva para a produção de OTA, justificando

assim a investigação das possibilidades de manifestação deste potencial toxigênico em grãos de café beneficiado.

Observando-se os resultados representados na TABELA 5, verifica-se que houve uma tendência de redução na quantidade de isolados potencialmente toxigênicos a medida em que os defeitos foram eliminados através da seleção de grãos em peneiras.

TABELA 5 Resultados da presença de fungos potencialmente ocratoxigênicos confirmados através da técnica de Plug Agar isolados e identificados de grãos de café separados em peneiras de diferentes procedências

Amostra	Presença de fungos potencialmente ocratoxigênicos
Sul de Minas Quebra	07 (03 <i>Aspergillus sulphureus</i>) (04 <i>Aspergillus ochraceus</i>)
Sul de Minas 13 acima	03 (01 <i>Aspergillus sulphureus</i>) (02 <i>Aspergillus ochraceus</i>)
Sul de Minas 14/16	02 (02 <i>Aspergillus ochraceus</i>)
Sul de Minas 17 acima	01 (01 <i>Aspergillus ochraceus</i>)
Zona da Mata Quebra	04 (02 <i>Aspergillus sulphureus</i>) (02 <i>Aspergillus sclerotiorum</i>)
Zona da Mata BC	04 (03 <i>Aspergillus sulphureus</i>) (01 <i>Aspergillus sclerotiorum</i>)
Zona da Mata 14/16	01 (01 <i>Aspergillus sulphureus</i>)
Zona da Mata 17 acima	01 (01 <i>Aspergillus sulphureus</i>)
Campanha Quebra	03 (02 <i>Aspergillus ochraceus</i>) (01 <i>Aspergillus sulphureus</i>)
Campanha BC	01 (01 <i>Aspergillus ochraceus</i>)
Campanha 14/16	01 (01 <i>Aspergillus ochraceus</i>)
Campanha 17 acima	01 (01 <i>Aspergillus ochraceus</i>)

4 CONCLUSÕES

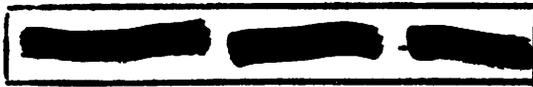
Os grãos que não são separados em peneiras tais com “bica corrida” e aqueles que constituem o resíduo da separação em peneiras “quebra” por conter grãos danificados são mais susceptíveis à invasão por fungos.

Entre os fungos isolados, identificados e quantificados verificou-se a presença dos fungos *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus sulphureus* e *Aspergillus sclerotiorum* (seção *Circundati*) e *Penicillium brevecompactum*, sendo que entre 58 isolados, 50% apresentaram potencial ocratoxigênico positivo.

A seleção dos grãos em peneiras mostrou-se eficaz na redução do índice de severidade de contaminação, bem como do número de isolados com potencial ocratoxigênico positivo.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARS, L. L.; BARS, P. L. Mycotoxigenic in grains application to Mycotoxic prevention. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL SOBRE BIOTECNOLOGIA NA AGROINDUSTRIA CAFEIRA, 3, 1999. Anais... Londrinain: IAPAR/IRD, 1999. p. 513.
- BATISTA, L. R. Identificação, potencial toxigênico e produção de micotoxinas de fungos associados a grãos de café (*Coffea arabica* L.). 2000. 188 p. Dissertação (Mestrado em ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- CARVALHO, V. D. de; CHAGAS, S. J. de R.; CHALFOUN, S. M. Fatores que afetam a qualidade do café. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, v. 18, n. 187, p. 5-20, 1997.
- CHRISTENSEN, M. A Synoptic key and evaluation of species in the *Aspergillus flavus* group. *Mycologia*, New York, v. 73, n. 6, p. 1056-1084, Nov./Dec. 1981.
- FILTENBORG, O.; FRISVAD, J. C. A simple screening - method for toxigenic moulds in pure cultures. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, London, v. 13, p. 128-130, 1980
- FLORIANI, C. G. *Café: a certificação é o caminho*. Belo Horizonte: IMA, 1999. 18 p. (Agro Técnico, Caderno Técnico - IMA, n. 1).
- HESELTIME, C. W.; ROGERS, R. F.; SHOTMELL, O. L. Aflatoxin and mold flora in North Carolina in 1977 com crop. *Mycologia*, Washington, v. 73, p. 216-228, Mar./Apr. 1981.
- KLICH, M. A.; PITTT, J. I. Differentiation of *Aspergillus flavus* from *Aspergillus parasiticus* and other closely related species. *Transaction British Mycological Society*, Cambridge, v. 94. n. 1, p. 99-108, 1988.
- MAZZANI, C. Hongos associados a granos de cereales almacenados en Venezuela. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE MICOLOGIA, 1.; ENCONTRO NACIONAL DE MICOTOXINAS, 8., 1994, Rio de Janeiro. Anais... Rio de Janeiro, 1994. p.58-60.
- MINAS GERAIS. Secretaria de Estado da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Cenário futuro do negócio agrícola de Minas Gerais*. Belo Horizonte, 1995. 49 p.



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

PITT, J. I. **A laboratory guide to common *Penicillium* species**. North Ryde, 1988. 187 p.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. 2.ed. Cambridge: Chapman & Hall, 1999. 593 p.

PRABHU, A. S., BEDENDO, I. P. Glume blight of rice in Brazil: etiology, varietal reaction and loss estimates. **Tropical Pest Management**, London, v. 34, n. 1, p. 85-88, Jan./Mar. 1988.

SAMSON, R. A.; HOEKSTRA, E. S.; FRISVAD., J. C.; FILTENBORG, O. **Introduction to food-borne fungi**. 4. ed. Baarn, Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultuur, 1995. 322 p.

STEEL, R. G. D.; TORRIE, J. H. **Principles and procedures of statistics**. 2. ed. Nova York: McGraw Hill, 1980. 633 p.

TEMPE, J. de. The blotter method for seed health testing. **Proceeding International of the Testing Association**, Copenhagen, v. 28, n. 1, p.133-151, Jan. 1963.

URBANO, G. R.; TANIWAKI, M. H.; DE BONES, A; LEITÃO, M. F. F. Incidence of toxigenic fungi and ochratoxin a detection in coffee from three brasilian regions. In: **INTERNATIONAL IUPAC SYMPOSIUM ON MYCOTOXINS AND PHYCOTOXINS**, 10., 2000, Guarujá. **Official program and abstract book**. Guarujá: Instituto Adolfo Lutz, 2000. p.164

CAPÍTULO 3

EFICIÊNCIA DA SEPARAÇÃO DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.) DE ACORDO COM O TAMANHO DOS GRÃOS NA REDUÇÃO DA INCIDÊNCIA DE OCRATOXINA A

RESUMO

NASSER, Patrícia Prado. Eficiência da separação de café (*Coffea arabica* L.) de acordo com o tamanho dos grãos na redução da incidência de ocratoxina A. In: _____. **Influência da separação de grãos de café (*Coffea arabica* L.) por tamanho na qualidade e ocorrência de ocratoxina A.** 2001. Cap. 3, p. 68-82. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a distribuição da ocratoxina A (OTA) em grãos de café beneficiados separados em peneiras. Doze amostras de 20 kg de café beneficiado foram coletadas enquanto estavam sendo rebeneficiadas em uma exportadora. Os procedimentos analíticos foram baseados nos descritos por Pittet. (1996), DOU (2000) e Varga et al. (2000). De acordo com os resultados obtidos das 12 amostras analisadas, 58% estavam contaminadas com níveis que variaram de 0,120 a 0,591 ng/g, com uma média de 0,309 ng/g, 12% das amostras apresentaram traços de contaminações e 33% não apresentaram contaminações por OTA. Verificou-se ainda uma relação entre ocorrência de OTA e diferentes tamanhos de grãos separados por peneiras, indicando que a seleção de grãos também reduz o risco de contaminação por OTA.

Comitê Orientador: Dr^a Sara Maria Chalfoun de Souza – EPAMIG (Orientadora)
MSc Eugênia A. Vargas – LAQCASA/LAV-MG (Co-orientador) Dr Mário
Lúcio Vilela de Resende – UFLA (Co-orientador)

ABSTRACT

NASSER, Patrícia Prado. Efficiency of coffee separation according to bean size in the reduction of the incidence of ochratoxin A. In: _____. **Influence of separation of coffee beans (*Coffea arabica* L.) by size on quality and occurrence of ochratoxin A.** 2001. Chap. 3, p. 68-82. Dissertation (Master's degree in Food Science) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

The objective of this work was to evaluate the distribution of ochratoxin A (OTA) on processed coffee beans separated by sieves. Twelve samples of 20 kg of processed coffee were collected while they were being re-processed in an exporting warehouse. The analytical procedures were based on those reported by Pittet et al., (1996), DOU (2000) and Vargas et al., (2000). According to the results obtained from the 12 samples analyzed, 58% were contaminated with levels ranging from 0.120 to 0.591 ng/g with a mean of 0.309ng/g, 12% of the samples presented traces of contamination and 33% presented no contamination by OTA. A relationship between occurrence of OTA and different bean sizes separated by sieves was still found, pointing out that bean screening also reduces the risk of contamination by OTA.

Guidance Committee: Dr^a Sara Maria Chalfoun de Souza – EPAMIG (Adviser professor) MSc Eugênia A. Vargas – LAQCASA/LAV–MG (Co-adviser) and Dr Mário Lúcio Vilela de Resende – UFLA (Co-adviser)

1 INTRODUÇÃO

A prevenção da formação de micotoxinas é a medida ideal, embora verifica-se que o processo de exposição dos frutos e grãos de café desde a fase pré-colheita até a comercialização é bastante longo, expondo o produto em alguma destas etapas a contaminação por fungos potencialmente toxigênicos.

A ocratoxina A (OTA) tornou-se um problema de saúde pública mundial desde que foi associada com a nefropatologia dos Balcans, uma doença nos rins do homem, podendo também atacar o fígado e intestino delgado (Krogh et al., 1977). Muitos trabalhos têm sido desenvolvidos para documentar a ocorrência de OTA em alimentos para o homem e em rações para animais.

A preocupação dos países importadores com a segurança dos produtos tende a fazer com que os mesmos proponham limites aceitáveis de micotoxinas a níveis de ppb uma vez que limitam a exportação de produtos e a comercialização interna dos mesmos. Cita-se como exemplo a proposta da União Européia em estabelecer limites aceitáveis de tolerância de 5 ppb para ocratoxina A em café, conforme dados do Ministry of Agriculture, Fisheries and Food - MAFF (Inglaterra, 1977).

O fator toxicológico pode muito em breve vir a comprometer a comercialização do café e o Brasil deverá estar preparado através da adoção de medidas de monitoramento e quando necessário preventivas e mesmo relativo a redução das contaminações fúngicas para evitar o impacto econômico e social que a possível rejeição de lotes de café poderia provocar.

O presente trabalho se propôs a avaliar a distribuição da ocratoxina A em grãos de café beneficiados, provenientes da Zona da Mata (Blend), Sul de Minas (Blend) e da cidade de Campanha, separados em peneiras.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Amostra

As amostras foram procedentes de Campanha (Região Sul de Minas Gerais), Blend do Sul de Minas (Oliveira, Três Pontas, Campanha e São Sebastião do Paraíso) e Blend da Zona da Mata (Matipó, Manhumirim, Manhuaçu e Caratinga).

2.1.1 Amostragem

As amostras foram tomadas em uma exportadora de café.

Lotes de café proveniente das regiões mencionadas acima foram amostrados durante o rebeneficiamento, na saída das bicas antes do ensacamento.

Cada lote (procedência), foi fragmentado em 4 peneiras, a saber: Campanha - Peneira 17 acima, Peneira 14/16, “bica corrida” e “quebra”, Blend do Sul de Minas - Peneira 17 acima, Peneira 14/16, Peneira 13 acima e “quebra” e Blend da Zona da Mata - Peneira 17 acima, Peneira 14/16, “bica corrida” e “quebra”.

Sub-amostras de 100g foram coletados utilizando um recipiente plástico até perfazer uma amostra de trabalho (composta) de 20 kg. As amostras foram acondicionadas em sacaria nova de juta. Cada amostra composta de 20kg foi considerada como um tratamento.

2.1.2 Preparo de amostras

As amostras foram levadas para o Laboratório de Controle de Qualidade e Segurança Alimentar do Ministério da Agricultura (LACQSA/LAV-MG), onde foram acondicionadas em condições ambientais similares às de armazenamento do

café após o beneficiamento (com pouca luz e temperatura em torno de 22 °C), até que fossem moídas e homogeneizadas.

No laboratório retirou-se 1 kg de cada amostra para fazer o plaqueamento dos grãos, análise da atividade da enzima Polifenoloxidase, análise de umidade e análise de cor. Os 19 kg restantes foram moídos em Desintegrador, Picador e Moedor, Marca: Nogueira, Modelo: DPM-500, homogeneizados em Masseur, Marca: Pasiani, Modelo: inox por 1 hora, (de 25 em 25 minutos a masseira foi desligada e procedeu-se a homogeneização manual com pá por 5 minutos no sentido contrário ao da masseira) posteriormente retirou-se 3Kg para que fossem acondicionadas a 18 °C (condição que as conservaria até o momento da análise).

2.2 Padrões de ocratoxina A

Soluções padrão estoque de ocratoxina A (aproximadamente 40 µg/mL) foram preparadas por dissolução do padrão sólido (Sigma, Sigma Chemical Co – St. Louis, MO) em tolueno: ácido acético (99:1,v/v) (Trucksess 1999) e a concentração medida de acordo com a AOAC (1999). A solução padrão de ocratoxina A (1.0 µg/mL) em metanol: ácido acético (99:1, v/v) foi preparada a partir da solução estoque para contaminação artificial. Soluções padrão para CLAE foram preparadas por diluição de alíquotas apropriadas da solução padrão. Soluções padrão para CLAE foram preparadas, com acetonitrila: metanol: água: ácido acético (35:35:29:1, v/v/v/v), para diluição de alíquotas apropriadas (Vargas., 1999). As soluções foram estocadas a -18° C e protegidas da luz.

2.3 Controle de qualidade analítica

Foram analisadas amostras de café beneficiado branco (contaminação < 0,12 µg/mL) e branco artificialmente contaminadas com padrões de OTA em níveis de 5,01 e 9,99 ng/kg para fins de avaliação do desempenho do método, recuperação e desvio padrão.

2.4 Procedimentos

Os procedimentos analíticos desta metodologia são baseados nos descritos por Pittet et al. (1996), Brasil (1999) e Vargas et al. (1999).

Esta metodologia fundamenta-se na extração da ocratoxina A pela solução de metanol: bicarbonato de sódio a 3% (1:1, v/v); purificação do extrato por coluna de imunoafinidade; a separação, detecção e quantificação da ocratoxina A foi feita por CLAE com detector de fluorescência.

As colunas de imunoafinidade contêm anticorpos para ocratoxina A com a capacidade máxima de 100ng de ocratoxina A e dando a recuperação maior que 85% em CLAE utilizando-se solução padrão de ocratoxina A em metanol: bicarbonato de sódio a 3% (50:50, v/v) – solução fosfato de potássio monobásico (PBS), (4:96,v/v).

Características do método

As características do método determinadas foram: recuperação entre 80 e 108% para faixa de 0,2 a 109 µg/ml; n=5. A linearidade da curva de calibração foi < que 0,999 (faixa de 02 a 60 µg/ml) o limite de detecção do método foi de 0,12 µg/ml. A análise de amostra certificada resultou em z-score < 2. A repetibilidade do método em análises de amostras de café naturalmente contaminadas 5,23 µg/mL ± 0,55; n=42 foi de 10,5%.

Extração

- pesou-se 25 g da amostra de café moído e à temperatura ambiente, em frasco de vidro;
- adicionou-se 200 mL da solução de metanol: bicarbonato de sódio 3 % (1:1, v/v);
- agitou-se em mixer por 10 minutos, velocidade média;

- filtrou-se em papel de filtro pregueado;
- recolheu-se e filtrou-se à vácuo em membrana de fibra de vidro;
- pipetou-se 10 mL do filtrado para amostras de café e transferiu-se para balão de 100 mL;
- completou-se o volume com solução tampão PBS e homogeneizou-se.

Purificação

- adaptou-se uma seringa de plástico de 60 mL à coluna de imunoafinidade Ochratest, utilizando-se um adaptador, que foi conectada a um sistema de filtração à vácuo com controle individual de fluxo;
- transferiu-se todo o conteúdo do balão de 100 mL para a coluna e deixou-se passar através desta com um fluxo de 2-3 mL/min, (não deixar a coluna secar);
- lavou-se a coluna com 10 mL de água deionizada, utilizando pipeta pasteur;
- passou-se ar pela coluna;
- eluiu-se a ocratoxina com 4 mL de metanol HPLC ou par, utilizando-se pressão positiva, controlando-se o fluxo por meio do êmbolo da seringa (2-3 mL/min);
- evaporou-se o eluato até completa secura em banho de água a 40 °C, sob fluxo de nitrogênio;

Separação, detecção e quantificação

- dissolveu-se o resíduo obtido na etapa de purificação com 300 µL de metanol: ácido acético (99:1, v/v) e homogeneizou-se, utilizando-se agitador de tubos;
- injetou-se 100 µL do extrato no cromatógrafo líquido, com microseringas, 100 mL da amostra e soluções padrão de ocratoxina A;

Os extratos foram injetados automaticamente em cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE), Marca: Shimadzu, Modelo: controlador de gás hélio DGU-2A, bomba LC-10AD vp, detector de fluorescência RF-10A xl, sistema de controle SCL- 10AVP e microcomputador com impressora através de ASPEC, Marca: Gilson, Modelo: Aspec XL. Para a detecção em CLAE, cada amostra levou um tempo de corrida de 11 minutos. É importante que o ambiente desta sala esteja controlado com ar condicionado.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Resultados da porcentagem de recuperação da metodologia utilizada para análise de OTA em grãos de café beneficiados

Através da metodologia utilizada para as análises, foi possível obter recuperação acima de 86,6, como mostra o QUADRO 1. Um outro fator importante que auxiliou para obter este nível de recuperação foi a utilização de colunas de imunoafinidade na etapa de purificação. Pela FIGURA 1, é possível observar a alta seletividade da coluna de imunoafinidade, na qual não é detectada a presença de picos interferentes próximos ao tempo de retenção da ocratoxina A.

As recuperações obtidas com a presente metodologia variaram de 86,6 a 99,9%, com média de 94,86%. Os níveis de recuperação ficaram bem próximos dos obtidos por Terada et al. (1986), Trucksess et al. (1999) e Batista et al. (2000), todos analisaram ocratoxina A em grãos de café, e obtiveram 81,5%, 88,33% e 82,64% respectivamente, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência.

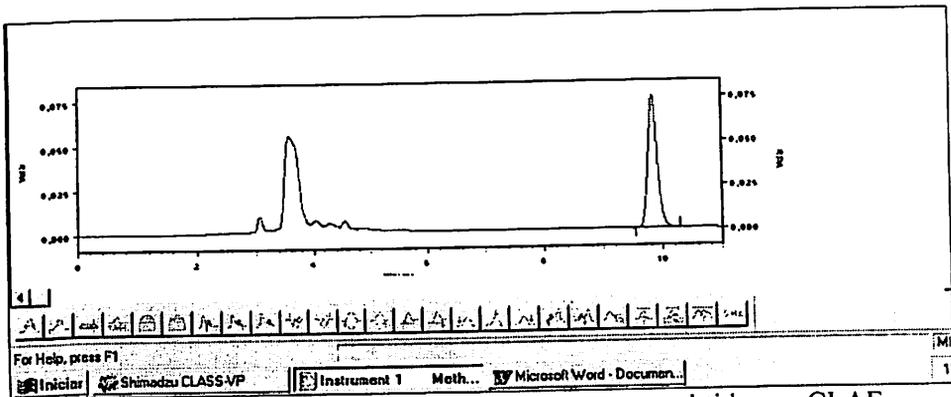


FIGURA 1 Padrão de OTA mostrado em cromatograma obtido por CLAE.

QUADRO 1 Resultados da porcentagem de recuperação da metodologia utilizada para análise de OTA em grãos de café beneficiados.

Nível de contaminação teórica em /kg	Nível de contaminação detectada em /kg	Porcentagem de recuperação	Amostras analisadas
5,01	4,33	86,3	Sul de Minas “quebra” e P17 acima. Zona da Mata “quebra”, “bica corrida” e P17 acima. Campanha “bica corrida”, P14/16 e P17 acima.
5,01	4,97	99,9	Zona da Mata P14/16. Sul de Minas P14/16.
9,90	9,73	98,4	Sul de Minas P13 acima

Dados são médias de duas repetições. Contaminação da amostra branco utilizada < 0,2 ng/g.

3.2 Distribuição de ocratoxina A em amostras naturalmente contaminadas e riscos para a saúde humana

Os resultados da TABELA 2 mostram que das 12 amostras analisadas, 7 (58%) apresentaram contaminação com ocratoxina A em concentrações que variaram de 0,120 a 0,591 ng/g, com uma média dos valores positivos de 0,309 ng/g, 1 (12%) amostra apresentou traços de contaminação e 4 (33%) não apresentaram contaminação por OTA.

Analisando as amostras separadas por peneiras, verificou-se uma relação entre ocorrência de OTA e diferentes tamanhos de grãos, indicando que a seleção de grãos de café reduz o risco de contaminação por OTA.

Em nenhuma das amostras analisada foi detectado um valor de contaminação de ocratoxina acima de 5,0 ng/g (valor proposto pelas legislações europeias para grãos de café e cereais). Confirmando pesquisas anteriores.

TABELA 2 Distribuição de ocratoxina A em amostras de grãos de café beneficiados de diferentes procedências, separados em peneiras

Amostra	Níveis de contaminação determinados	Médias de contaminação determinadas
Sul de Minas Quebra	0,534 0,543	0,540
Sul de Minas 13 acima	ND ND	ND
Sul de Minas 14/16	0,270 0,114	0,192
Sul de Minas 17 acima	0,072 0,182	0,129
Zona da Mata Quebra	0,429 0,096	0,295
Zona da Mata BC	ND ND	ND
Zona da Mata 14/16	ND ND	ND
Zona da Mata 17 acima	ND ND	ND
Campanha Quebra	0,789 0,396	0,591
Campanha BC	0,336 0,258	0,297
Campanha 14/16	0,132 0,108	0,120
Campanha 17 acima	0,084 ND	0,042

ND = Não detectado, Limite de Detecção do Método = 0,1ng/g e o limite de Quantificação do método = 0,2ng/g.

3.3 Riscos de intoxicação para o consumidor com relação às amostras analisadas

De acordo com o JECFA um nível seguro aceitável de ocratoxina A é de 100 ng/peso corpóreo/semana cerca de 14,3 ng/peso corpóreo/dia (Soares, 1999). Para uma pessoa de 60 Kg isso significa aproximadamente 857 ng/dia. Se levarmos em consideração que não ocorra perda de ocratoxina A durante a torração e o preparo da bebida do café, para um consumidor de 60 Kg que consome 4 xícaras de café por dia (24 g de café torrado), que é o consumo *per capita* nos países europeus (Stegen et al. 1997), e considerando o valor médio encontrado neste estudo, 0,183 ng/g, a ingestão de ocratoxina A corresponderia a 4,39 ng/dia. Dessa maneira, as amostras de grãos de café após a torração iriam contribuir com cerca de 0,51% do limite permitido pelo Joint European Committee for Food Administration (JECFA).

Estes resultados estão abaixo dos obtidos na revisão feita por Soares (1999), segundo a qual a ingestão calculada com base na contaminação média de café verde consumida no Brasil, levando em consideração que não haja perdas durante a torração, corresponderia a 6% do nível estabelecido pela FAO.

O JECFA, diante do problema de ocratoxina A em café, questiona se a ingestão de ocratoxina A em café é significativa para o consumidor a ponto de merecer limites específicos (Soares, 1999).

Estes resultados vêm afirmar que o café não foi maior fonte de ocratoxina A na dieta dos consumidores, tendo contribuído na presente pesquisa com aproximadamente 0,51% do limite permitido pelos órgãos fiscalizadores (FAO e JECFA).

4 CONCLUSÕES

Com relação aos resultados obtidos a partir das análises de ocratoxina A em grãos de café beneficiados separados por peneiras, conclui-se:

Das (doze) 12 amostras analisadas, (sete) 7 apresentaram níveis de OTA que variaram de 0,120 a 0,591 ng/g (uma) 1 amostra apresentou traços de contaminação e em 4 amostras não se registrou a presença de OTA.

Das 7 amostras que se apresentaram com OTA, 3 pertenciam ao tratamento "Quebra" com média de 0,475, uma "Bica Corrida" com média de 0,297, duas Peneira 14/16 com média 0,156 e uma Peneira 17 acima com média de 0,129.

A relação entre ocorrência de OTA e diferentes tamanhos de grãos separados por peneiras, indicou que a seleção de grãos também reduz o risco de contaminação por OTA, embora todas as classes de grãos (peneiras) tenham apresentado níveis da OTA inferior àqueles propostos pelas legislações Européias para grãos de café e cereais (5 ppb).

Os níveis de ocratoxina A encontrados neste estudo representam 0,51% do consumo diário permitido pelo JECFA, mostrando que o café não foi fonte significativa de OTA na dieta, nas condições em que o experimento foi realizado.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BATISTA, L. R. **Identificação, potencial toxigênico e produção de micotoxinas de fungos associados a grãos de café (*Coffea arabica L.*)**. 2000. 188 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

BRASIL. Portaria n. 49 de 23 de setembro de 1999. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, v. 137, n. 177, p. 27-32, 15 set. 1999. Seção 1. (Anexo. Métodos analíticos de referência para análise de micotoxinas em produtos, subprodutos e derivados de origem vegetal).

INGLATERRA. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. **Steering group on chemical aspects of food surveillance**. London, [1997]. (Annual Report. Paper, n. 49).

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 Microbiologia Scandinavica: Section B - Microbiology**, Copenhagen, v. 85, p. 238-240, 1997.

PITTET, A.; TORNARE, D.; HUGGETT, A.; VIANI, R. Liquid chromatographic determination of ochratoxin A in pure and adulterated soluble coffee using an immunoaffinity column cleanup procedure. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, Washington, v. 44, n. 11, p. 3564-3569, 1996.

SOARES, L.S. Ocratoxinas e aflatoxinas em café brasileiro. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL SOBRE BIOTECNOLOGIA NA AGROINDÚSTRIA CAFEEIRA, 3., 1999, Londrina. **Anais...** Londrina: IAPAR/IRD, 1999. p. 447-452.

STEGEN, G. van der; JÖRISSSEN, U.; PITTET, A.; SACCON, M.; STEINER, W.; VINCENZI, M.; WINKLER, M.; ZAPP, J.; SCHLATTER, C. H. R. Screening of European coffee final products for occurrence of ochratoxin A (OTA). **Food Additives and Contaminants**, London, v. 14, n. 3, p. 211-216, 1997.

STUDER-ROHR, I.; DIETRICH, D. R.; SCHLATTER, J.; SCHLATTER, C. The occurrence of ochratoxin A in coffee. **Food Chemistry and Toxicology**, Oxford, v. 33, n. 5, p. 341-355, 1995.

TERADA, H.; TSUBOUCHI, H.; YAMAMOTO, K.; HISADA, K.; AKABE, Y. Liquid chromatographic determination of ochratoxin A in coffee beans e coffee products. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, Washington, v. 69, n. 6, p. 960-964, 1986.

TRUCKSESS, M. W.; GILER, J.; YOUNG, K.; WHITE, K. D.; PAGE, S. W. Determination and survey of ochratoxin A in wheat, barley and coffee-1997. SCOTT, P.B. Note on Analysis of Aflatoxins in Green Coffee. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, Washington, v. 82, n. 1, p. 85-89, 1999.

VARGAS, E. A., SANTOS, E. A., PITTET, A. Collaborative Study Submitted for consideration by AOAC International: D-2 Protocol – Determination of ochratoxin A in green coffee by immunoaffinity column clean-up and HPLC. Belo Horizonte: Ministério da Agricultura e Abastecimento, Laboratório de Micotoxinas/LAV-MG, 1999. 28 p.

CAPÍTULO 4

INFLUÊNCIA DA SEPARAÇÃO DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.) DE ACORDO COM O TAMANHO DOS GRÃOS NA QUALIDADE DA BEBIDA E NO ESPECTRO DE COLORAÇÃO

RESUMO

NASSER, Patrícia Prado. Influência da separação de café (*Coffea arabica* L.) de acordo com o tamanho dos grãos na qualidade da bebida e no espectro de coloração. In: _____. **Influência da separação de grãos de café (*Coffea arabica* L.) por tamanho na qualidade e ocorrência de ocratoxina A.** 2001. Cap. 4, p. 83-104. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

Este estudo foi desenvolvido com o objetivo de verificar a influência da separação de café de acordo com o tamanho dos grãos, na qualidade da bebida e espectro de coloração. O presente trabalho comparou a bebida do café através da atividade da enzima polifenoloxidase (PFO) e análise sensorial, e analisou o espectro de coloração das amostras pelo programa Adobe Photoshop versão 6,0. De acordo com os resultado obtidos observa-se com relação a bebida que os tratamentos peneiras 14/16 e 17 acima apresentaram melhora de qualidade, resgatando assim o topo da classificação que ultimamente vem sendo mascarado pela classificação tradicional como “dura para melhor” e em relação ao espectro de coloração, as amostras se mostraram mais homogêneas e mais livres de defeitos.

Comitê Orientador: Dr^a Sara Maria Chalfoun – EPAMIG (Orientadora) MSc
Eugênia A. Vargas – LAQCASA/LAV–MG (Co-orientador) Dr Mário Lúcio
Vilela de Resende – UFLA (Co-orientador)

ABSTRACT

NASSER, Patrícia Prado. Influence of coffee separation according to bean size on the beverage quality and coloration spectrum. In: _____. **Influence of separation of coffee beans (*Coffea arabica* L.) by size on quality and occurrence of ochratoxin A.** 2001. Chap. 4, p. 83-104. Dissertation (Master's degree in Food Science) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

This study was developed with the objective of verifying the influence of coffee separation according to bean size on beverage quality and coloration spectrum of sieve-separated lots. The present work compared the coffee beverage through the polyphenol oxidase enzyme activity (PPO) and sensorial analysis and analyzed the coloration spectrum of the samples by the Adobe Photoshop program version 6.0. It was observed, with relation to the beverage that the sieves 14/16 and 17 above presented improved quality, redeeming thus the top classification, which lately has been masked by the traditional classification as hard to better. In relation to the coloration spectrum, the samples proved more homogeneous and more free of defects.

Guidance Committee: Dr^a Sara Maria Chalfoun – EPAMIG (Adviser professor)
MSc Eugênia A. Vargas – LAQCASA/LAV–MG (Co-adviser) and Dr Mário
Lúcio Vilela Resende – UFLA (Co-adviser)

1 INTRODUÇÃO

A valorização da qualidade do café é uma antiga preocupação, levando os setores ligados a atividade cafeeira no Brasil a elaborar normas de classificação do café em 1917 (Chagas & Costa, 1996). A classificação do café no Brasil (COB) Classificação Oficial Brasileira - Dec. LEI nº 27.173 de 14/9/49) é determinada através do tipo baseado nos defeitos; características de qualidade e pela bebida, esta é determinada normalmente através da prova de 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, poucos anos após sua instalação em 1914.

O sabor característico do café é devido à presença de vários constituintes químicos voláteis e não voláteis, proteínas, aminoácidos, ácidos graxos, compostos fenólicos, e também à ação de enzimas sobre alguns destes constituintes, podendo gerar como produtos de reações (compostos que interferirão no sabor e aroma do mesmo). Visando correlacionar a atividade da polifenoloxidase com a qualidade da bebida, trabalhos de pesquisas têm contribuído efetivamente para o estabelecimento de análises químicas que complementem os testes sensoriais atendendo às exigências mundiais de modernização do sistema de classificação da qualidade da bebida (Souza, 1996).

A análise de polifenoloxidase (PFO) possibilita classificar de forma objetiva os cafés quanto à qualidade, o que confere maior segurança às classificações feitas pelo teste da prova de xícara, rotineiramente utilizado na classificação e comercialização de café (Carvalho et al., 1994). Segundo Amorim & Silva (1968), os compostos fenólicos, principalmente os ácidos clorogênico e caféico, exercem uma ação protetora, antioxidante dos aldeídos. Quando há qualquer tipo de injúria aos grãos, ou seja, colheita inadequada, problemas no processamento e armazenamento, as polifenoloxidases agem sobre

os polifenóis. Com isso diminui-se sua ação antioxidante sobre os aldeídos o que facilita a oxidação destes, ao mesmo tempo em que se produzem quinonas, as quais agem como substrato inibidor da ação da polifenoloxidase. Devido a isto, os cafés de pior qualidade, ou seja, os que tiveram seu sabor afetado por condições adversas, têm também baixa atividade da polifenoloxidase.

Com relação ao tamanho dos grãos, uma das qualificações apreciadas ainda no decreto nº 27173 de 14/9/49 os grãos do café são qualificados segundo as dimensões dos crivos das peneiras oficiais que o retenham. Sob o ponto de vista técnico é de suma importância a separação por peneiras, pois permite a seleção dos grãos por tamanho e pela uniformidade com relação à presença de defeitos. Esta separação em grupos torna possível uma torração mais uniforme. Na torração de um café “bica corrida” os grãos graúdos ficam apenas tostados, enquanto os miúdos podem já estar carbonizados (Toledo & Barbosa, 1998), o que proporcionaria uma torra mesclada indesejável. Considerando-se que os fatores mais importantes na determinação da qualidade do café são a bebida e o aspecto, o presente trabalho objetivou analisar grãos de café beneficiados separados em peneiras mais usuais na comercialização: Comparando o espectro de cores das amostras através de uma técnica de análise de imagens e comparando o método químico (PFO) e a prova de xícara para análise da qualidade de bebida.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Descrição das Amostras

Café (*Coffea arabica L.*) beneficiado provenientes de:

*Campanha, Safra 99/00 –Tipo 4 "Bica Corrida", "Quebra", Peneira 14/16 e Peneira 17 acima.

*Blend do Sul de Minas (Três Pontas, Oliveira, Campanha e São Sebastião do Paraíso), Safra 99/00 –Tipo 6 "Quebra", Peneira 13 acima, Peneira 14/16 e Peneira 17 acima.

*Blend da Zona da Mata de Minas Gerais (Matipó, Manhumirim, Manhuaçu e Caratinga) –Tipo 6 "Bica Corrida", "Quebra", Peneira 14/16 e Peneira 17 acima.

2.2 Análises

As análises de teor de água e PFO foram realizadas no laboratório da de Qualidade do Café Dr. Alcides Carvalho da EPAMIG-Lavras.

2.2.1 Grau de umidade

Determinada através da secagem em estufa a $105 \pm 3^{\circ}\text{C}$, com circulação de ar, até obtenção de peso constante, (Brasil, 1976).

O delineamento experimental utilizado foi o de parcelas inteiramente casualizadas subdivididas no espaço, sendo considerados três fatores principais, locais onde foram obtidas as amostras provenientes de: Zona da Mata, Campanha e Sul de Minas; e quatro sub-fatores, ou tamanho de peneiras, analisadas dentre cada fator principal, entre elas: quebra, bica corrida ou 13 acima (no caso do Blend oriundo do Sul de Minas), 14/16 e 17 acima; com duas repetições.

O programa estatístico utilizado para essas análises foi o SisVar versão 4.4 (Build 34). Procedeu-se à análise de variância da umidade em porcentagem, utilizando o modelo estatístico descrito abaixo, considerando todos os componentes do modelo como aleatórios, exceto a média experimental.

$$Y_{ijk} = \mu + l_i + e_{a(ik)} + p_j + (lp)_{ij} + e_{b(ijk)}$$

em que:

Y_{ijk} : é a observação referente ao local i, a peneira j e a repetição k;

μ : é a média geral do experimento;

l_i : é o efeito do fator principal, ou local i (sendo i = 1, 2 e 3);

erro $a_{(ik)}$: é o erro experimental das repetições k ao fator principal – local i,

p_j : é o efeito da peneira j (sendo j = 1, 2, 3 e 4);

$(lp)_{ij}$: é o efeito da interação da peneira j com o local i;

erro $b_{(ijk)}$: é o erro experimental total desconsiderando o erro a, sendo erro $a_{(ik)} \sim (0, \sigma^2)$.

2.2.2 Atividade da enzima polifenoloxidase (U/min/g de amostra)

O extrato enzimático foi obtido através de adaptação do processo de extração descrito por Draetta & Lima (1976). Pesaram-se 5 g de amostras de café moído, adicionando-se a seguir 40 ml de tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 6,0, agitou-se por 5 minutos; todo material utilizado foi mantido gelado durante o procedimento analítico. Após a agitação, as amostras foram submetidas à filtração a vácuo. A atividade enzimática foi determinada pelo método descrito por Ponting & Joslyng (1948), utilizando-se extrato de amostra sem DOPA como branco. Utilizou-se estatística descritiva para os dados.

2.3 Análise sensorial (Degustação ou “Prova de Xícara”)

A qualidade da bebida do café foi avaliada imediatamente após a obtenção das amostras, que foram torradas conforme torração “Americana”, que é mais clara e permite maior apreciação por parte do degustador e foram moídas em granulometria média, com mais de 14 fios por cm^2 .

A quantidade de pó utilizada foi 10 para 100 de água (ponto de primeira fervura). Os indícios da bebida foram obtidos cheirando-se o café cru, torrado e o vapor d’água desprendido da xícara após a colocação da água fervente.

Para cada amostra foram preparadas seis xícaras, provadas por dois degustadores. Os resultados obtidos foram convertidos em valores numéricos segundo Carvalho et al. (1994).

2.4 Análise de espectro de coloração

Para a análise de imagem fotocolorimétrica, foi utilizado o modelo estatístico fatorial, cujos fatores foram (três) 3 locais (Zona da Mata, Sul de Minas e Campanha) e (quatro) 4 peneiras (bica corrida ou 13 acima, quebra, 1416 e 17 acima), considerando todos os componentes do modelo

$$Y_{ijk} = \mu + l_i + p_j + (lp)_{ij} + e_{b(ijk)}$$

em que:

Y_{ijk} : é a observação referente ao local i , a peneira j e a repetição k ;

μ : é a média geral do experimento;

l_i : é o efeito do fator principal, ou local i (sendo $i = 1, 2$ e 3);

p_j : é o efeito da peneira j (sendo $j = 1, 2, 3$ e 4);

$(lp)_{ij}$: é o efeito da interação da peneira j com o local i ;

erro $b_{(ijk)}$: é o erro experimental total desconsiderando o erro a , sendo erro $a_{(ik)} \cap (0, \sigma^2)$.

Procedeu-se à análise de variância para o restante dos caracteres, utilizando o modelo estatístico descrito abaixo, considerando todos os componentes do modelo como aleatórios, exceto a média experimental. Na tentativa de isolar o efeito da interação entre peneiras e repetição do resíduo b, foi utilizada uma modificação no modelo sugerido por Steel & Torrie (1980).

Após fotografadas para obtenção dos dados fotocolorimétricos, as amostras foram analisadas pelo programa editor de imagens Adobe Photoshop versão 6.0. Os tratamentos analisados foram caracterizados de acordo com o local de procedência da amostra, e de acordo com o tipo de classificação por peneiras, com duas repetições, resultando em 24 parcelas totais obtidas no fatorial 3 x 4 (local x peneira).

Por meio de uma amostra aleatória de cada tratamento, esta foi colocada em um recipiente (Cápsula de porcelana), com dimensões de diâmetro: 7,5 cm e profundidade: 2,5 cm. Esse procedimento foi utilizado para obtenção de parcelas que fornecessem uma imagem bastante representativa do tratamento, além de facilitar o manejo, o que contribui para a redução de possíveis erros experimentais que pudessem vir a seguir.

Em seguida, após obtidas todas as parcelas, essas foram fotografadas com o auxílio de uma câmara fotográfica modelo: Canon EOS5, tendo-se o cuidado em manter o ambiente controlado em termos de luminosidade refletida e angulação de tiragem das fotos. Assim, os negativos gerados pelo filme marca: Fuji Supéria, foram revelados para então obter as fotografias das 24 parcelas a serem analisadas.

A partir desse material procedeu-se a digitalização uma a uma das fotografias com o auxílio do Scanner marca: Artec, modelo: viewstation AM12E, as quais foram digitalizadas com 300 dpi (dots per inch), gerando imagens de tamanho 4500 Kb. Desse modo deu-se início a entrada dos dados no programa Adobe Photoshop 6.0.

Inicialmente, para cada imagem, foi realizada uma transformação por meio dos recursos autocorretores do programa previamente programados pelo operador, que foram o “*autolevels*” e o “*autocontrasts*”, os quais conferiram às imagens uma aproximação à imagem real das amostras que sofreram alterações visuais, alterações estas que tendiam a um aumento à medida que eram manipuladas. No entanto é oportuno salientar que, para digitalização de imagens e os mecanismos de ajuste do programa se tornem eficientes, é imprescindível que o operador efetue uma calibração do monitor com que irá operar de modo que a imagem mantenha suas características reais com o mínimo de imperfeições, principalmente no caso das cores.

Essa talvez seja um tipo de restrição no método de análise fotolorimétrica, visto que o monitor somente é ajustado de acordo com a visão individual do mesmo operador, o qual somente poderá operar com imagens no mesmo local e luminosidade com que o monitor foi calibrado. Esse fato pode dificultar um pouco o processo quando se almeja precisão, mas por outro lado poderia ser contornado pela adição de mais uma fonte de variação, ou seja avaliação dos operadores e assim aumentar a precisão experimental dessas análises, pelo emprego de mais de um operador treinado nesse tipo de programa de imagens, utilizando cada um deles, sua própria digitalização de imagens e calibração de monitor, e desse modo obter seu próprio julgamento nas avaliações fotolorimétricas das imagens.

O próximo procedimento após corrigidas as imagens foi fazer uma nova padronização das mesmas para um único tamanho, tanto em resolução quanto em dimensão geométrica. Isso foi necessário visto que o tamanho das imagens após terem sido digitalizadas e também autocorrigidas pelo Adobe se tornaram excessivamente pesadas em termos de alocação de memória, fato que dificultaria, ou melhor, tornaria inviável o seu manejo no programa, pois não se conseguiria bom desempenho no momento em que os trabalhos tivessem sua

memória RAM ou virtual carregada. Por outro lado as imagens foram recortadas, passando de um formato esférico para o quadrado, isso homogeneizou todas as parcelas, visto que algumas fotografias originais com grãos preenchidos em cápsula de porcelana teriam espaços vazios próximos a superfície, logo recortando essas imagens para um mesmo tamanho e formato fez com que todas ficassem preenchidas por grãos. Para conclusão desta etapa todas as imagens foram padronizadas em uma dimensão em pixels de 389 K, com um total de 364 pixels tanto em largura quanto em altura, e 16,4 cm em largura e altura, resultando em uma resolução de 56 109 pixels/cm.

Encerrada a etapa de obtenção das imagens das parcelas, teve início o processo de obtenção dos dados propriamente ditos. Nesse procedimento foi realizada a seguinte seqüência de eventos:

Utilizando-se a ferramenta presente no “*tool Box*”: chamada de “*rectangular marquee tool M*”, foram selecionadas todas as regiões da imagem total em que o operador julgou como sendo uma área visual com a presença de grãos defeituosos. Nessa etapa além do julgamento basear-se na totalidade dos grãos que formavam a imagem, simultaneamente, levou-se em consideração a estrutura física dos mesmos, ou seja, considerou-se como sendo grãos defeituosos os grãos quebrados, ardidados, pretos, brocados, defeito verde. O motivo de dar preferência a esta ferramenta, e não a outros recursos mais poderosos presentes no Adobe, se deu ao fato de que essas ferramentas de seleção mais precisas são excessivamente detalhadas e exigem equipamentos mais precisos do que somente o mouse, a fim de serem manipuladas, e, portanto, tomariam o trabalho demasiadamente lento e cansativo, além de bastante precário em termos de precisão. Logo, a grande vantagem do “*rectangular marquee tool M*” foi a rapidez da região selecionada e a obtenção das propriedades dimensionais da área selecionada por meio do comando propriedades dessa ferramenta, a qual fornecia os dados de área em cm ou em %

da região retangular selecionada. E desse modo pode-se extrapolar os dados obtidos para criar as variáveis de porcentagem de grãos defeituosos nos diferentes tratamentos analisados, considerando as amostras oriundas da peneira 17 acima como padrão para as comparações percentuais.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Análise da atividade da enzima Polifenoloxidase e Análise sensorial

No QUADRO 1, são apresentados os valores médios da atividade da enzima Polifenoloxidase (PFO) em grãos de café beneficiados provenientes de três origens enquadrados na tabela que os autores utilizaram para elaborar o quadro de classificação da bebida do café pela atividade da PFO e os resultados da degustação obtidos através da prova de xícara.

QUADRO 1 Resultados dos valores médios da atividade da PFO, EPAMIG, CTSM.Lavras/MG, 2000

PENEIRAS/ CAFÉ	ORIGEM	SAFR A	PFO U/min./g de amostra	Classificação proposta por CARVALHO et al. (1994)	PROVA DE XÍCARA
BICA CORRIDA	ZONA DA MATA	00/01	60,66	DURA	DURA VERDE
14/16	ZONA DA MATA	00/01	64,16	MOLE	DURA VERDE
17 ACIMA	ZONA DA MATA	00/01	63,58	APENAS MOLE	DURA VERDE
QUEBRA	ZONA DA MATA	00/01	60,66	DURA	DURA VERDE GOSTO FORTE
13 ACIMA	SUL DE MINAS	99/00	60,66	DURA	DURA SUJA
14/16	SUL DE MINAS	99/00	64,16	MOLE	DURA SUJA
17 ACIMA	SUL DE MINAS	99/00	63,58	APENAS MOLE	DURA SUJA
QUEBRA	SUL DE MINAS	99/00	60,08	DURA	DURA SUJA VERDE TERRA
BICA CORRIDA	CAMPANHA	99/00	60,66	DURA	DURA
14/16	CAMPANHA	99/00	62,99	APENAS MOLE	DURA +
17 ACIMA	CAMPANHA	99/00	64,16	MOLE	DURA+
QUEBRA	CAMPANHA	99/00	59,49	DURA	DURA VERDE SUJA

No QUADRO 2, estão expressos valores da amplitude de variação encontradas nas amostras analisadas comparadas com os valores usados por Carvalho et al. (1994), para elaborarem uma tabela de classificação da bebida do café pela atividade da PFO, complementar a utilizada tradicionalmente “prova de xícara”.

QUADRO 2 Resultados dos valores das amplitudes de variações encontradas nas amostras analisadas comparadas com os valores da amplitude usada por Carvalho et al. (1994), para elaborarem a classificação da bebida do café pela atividade da PFO

AMPLITUDE		ATIVIDADE DA PFO														
Amplitude usada por Carvalho et al. (1994)		55,99	59,49	59,99	60,07	61,33	61,83	62,99	63,57	63,77	64,16	64,65	66,94	67,66	74,66	
		Dura							Apenas Mole				Mole			EM
Amplitude encontrada nas amostras analisadas	EC				1											
	13 acima					3										
	14/16									2						
	17 acima										2					
	Quebra															

¹Amplitude de variação correspondente a dados de duas regiões e duas repetições.

²Amplitude de variação correspondentes a dados de três regiões e duas repetições.

³Amplitude de variação correspondente a dados de uma região e duas repetições.

* Valores das médias de bebidas encontradas.

De acordo com os resultados apresentados nos QUADROS 1 e 2, verifica-se que houve uma associação entre os dados de atividade da PFO e qualidade de bebida, conforme a classificação proposta por Carvalho et al. (1994). Assim, os tratamentos referentes ao café bica corrida de dois locais, Zona da Mata e Campanha, apresentaram um valor médio de PFO de 60,66 o que corresponde à bebida dura. Entretanto esses mesmos cafés quando foram fragmentados em peneira 14/16 e 17 acima apresentaram bebida apenas mole e

mole. Os mesmos resultados também se confirmaram com amostras Blends provenientes da região Sul de Minas Gerais. O tratamento peneira 13 acima do Sul de Minas, apresentou valor médio de 60,70 que corresponde à bebida dura. Todas as amostras analisadas apresentaram qualidade de bebida dura para melhor. Era de se esperar que o tratamento quebra apresentasse qualidade de bebida inferior ao bica corrida, entretanto os dados de PFO enquadraram-no em bebida dura.

Pela análise sensorial verifica-se que todos os tratamentos foram classificados como bebida dura, embora naquelas amostras classificadas como "quebra" (resíduo das peneiras) os provadores tenham detectado gostos e odores indesejáveis identificados pelos mesmos como bebida dura suja e gosto forte indicando o elevado grau de sensibilidade apresentado pelos profissionais executores dessa prova.

Comparando-se as duas formas de classificação da bebida do café (atividade da enzima polifenoloxidase e análise sensorial) nota-se que a primeira destaca-se pela sua objetividade e a segunda quando executada por provadores dotados de alta sensibilidade, como ocorreu na presente pesquisa, é capaz de detectar nuances que apenas os sentidos humanos percebem.

Conclui-se, portanto, que as duas provas são complementares e indispensáveis visando uma precisa caracterização dos diferentes tratamentos.

3.2 Grau de umidade

A umidade do café beneficiado é muito oscilante, podendo ser modificada de acordo com a umidade relativa e temperatura no armazenamento, integridade, uniformidade e tamanho dos grãos além de outros fatores.

Através das TABELAS 1 e 2, pode-se observar que a umidade mostrou-se significativamente reduzida nos tratamentos "quebra".

Constata-se que houve tendência de aumento na umidade conforme foram retirados os defeitos e aumentados os tamanhos dos grãos, concordando com os resultados obtidos por Pereira (1997). O menor teor de umidade nos tratamentos quebra se explica pelo mesmo ser composto de grãos defeituosos possuidores de membranas degradadas que facilitam a liberação de água e outros componentes dos conteúdos celulares.

TABELA 1 Resumo do resultado da análise de variância de umidade, expressos em percentuais

FV	GL	Umidade		
		QM	<i>Pr>Fc'</i>	
Local (L)	2	0.19	14.45	<i>Ns</i>
Erro a	2	0.01		
Peneira (P)	3	1.68	61.32	**
L x P	6	0.31	11.36	<i>Ns</i>
Erro b	10	0.02		
Total (N)	23			
Cv a (%)	1.03			
CV b (%)	1.47			
Média geral	11.26			

^{1/} **, *: teste de F significativo aos níveis de 1% e 5% de probabilidade.

TABELA 2 Média geral observada para umidade, com três locais e quatro tamanhos de peneiras

Umidade		
Média Locais		
Zona da Mata	11.44	<i>a'</i>
Campanha	11.19	<i>a</i>
Sul de Minas	11.16	<i>a</i>
Média Peneiras		
Quebra	10.48	<i>a</i>
Bica corrida ou >13	11.64	<i>b</i>
14/16	11.41	<i>b</i>
17 acima	11.52	<i>b</i>

^{1/}Médias seguidas pela mesma letra, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade. Dados são médias de duas repetições.

3.3 Análise de espectro de coloração

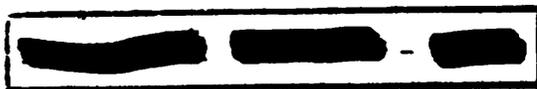
O presente estudo constitui-se em uma primeira tentativa de classificação dos diferentes tratamentos de acordo com o espectro de coloração.

O QUADRO 3 mostra o resultado da porcentagem de grãos defeituosos resultantes das análises das amostras pelo Programa Adobe Photoshop 6.0.

QUADRO 3 Porcentagem de grãos defeituosos resultantes das amostras analisadas pelo Programa Adobe Photoshop 6.0

	Zona		Campanha		Sul de Minas	
	I	II	I	II	I	II
17 acima	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Média 17 acima	0,0000		0,0000		0,0000	
14/16	4,8724	7,8445	6,4632	8,4964	3,6970	4,6253
Média 14/16	6,3585		7,4798		4,1612	
13 acima	X	x	X	X	14,2127	21,3310
Média 13 acima	X		X		17,7719	
Bica corrida	8,8099	24,9490	12,6728	24,5662	x	x
Média Bica corrida	16,8794		18,6195		x	
Quebra	28,5700	23,1911	50,6880	45,7809	26,8898	41,6056
Média quebra	25,8806		48,2344		34,2477	

O método de análise de imagem apresenta vantagens de precisão, rapidez e baixo custo. Os resultados representados através dos quadros 3 e 4 e figura 1 mostram os aspectos de amostras de grãos de café quanto à cor, separados em diferentes peneiras. Para efeito de padronização considerou-se as amostras classificadas como peneira 17 acima, apresentando a coloração padrão mais homogênea segundo uma banca de juizes constituída por classificadores profissionais.



Observa-se que os grãos classificados nas diferentes peneiras apresentam expressivas reduções nos índices de desuniformidade de cor, ou seja foram os que mais se aproximaram da cor padrão característica dos grãos selecionados por peneiras e já anteriormente classificados como de melhor qualidade quando comparados com os tratamentos "bica corrida" e "quebra". Observou-se ainda que este resultado foi semelhante para as amostras provenientes das três localidades estudadas conforme representado no quadro 3.

TABELA 3 Resumo do resultado da análise de variância de percentagem de grãos defeituosos, expressos em percentuais²

FV	GL	Umidade		
		QM	<i>Pr>Fc</i> ¹	
Blocos (B)	1	1.37	0.0513	<i>Ns</i>
Local (L)	2	0.75	0.1155	<i>Ns</i>
Peneira (P)	3	30.72	0.000	**
L x P	6	0.41	0.2814	<i>Ns</i>
Erro	11	0.28		
Total (N)	23			
CV (%)	15.95			
Média geral	3.35 ³			

^{1/} **, *: teste de F significativo aos níveis de 1% e 5% de probabilidade.

^{2/} Os dados analisados foram transformados [Raiz (Y + 0,5)]

^{3/} A média geral transformada equivale a 10,72% de grãos defeituosos.

TABELA 4 Média geral observada para percentagem de grãos defeituosos, para três locais e quatro tamanhos de peneiras

% de Grãos defeituosos		
Média Locais		
Zona da Mata	9.24	<i>a</i> ¹
Campanha	10.02	<i>a</i>
Sul de Minas	13.22	<i>a</i>
Média Peneiras		
Quebra	27,57	<i>d</i>
Bica corrida ou >13	13,29	<i>c</i>
14/16	2,007	<i>b</i>
17 acima	0,000	<i>a</i>

^{1/}Médias seguidas pela mesma letra minúscula na vertical, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade. Dados são médias de duas repetições.

Através das TABELAS 3 e 4 pode-se observar que a cor das amostras mostram-se significativamente mais homogêneas nas peneiras selecionadas, o que é desejável para uma torração mais fina.

A FIGURA 1 mostra os aspectos de amostras procedentes do município de Campanha de grãos de café quanto a cor separados em diferentes peneiras. Para efeito de padronização considerou-se as amostras classificadas como peneira 17 acima apresentando a coloração mais homogênea segundo uma banca de juizes constituída por classificadores profissionais.

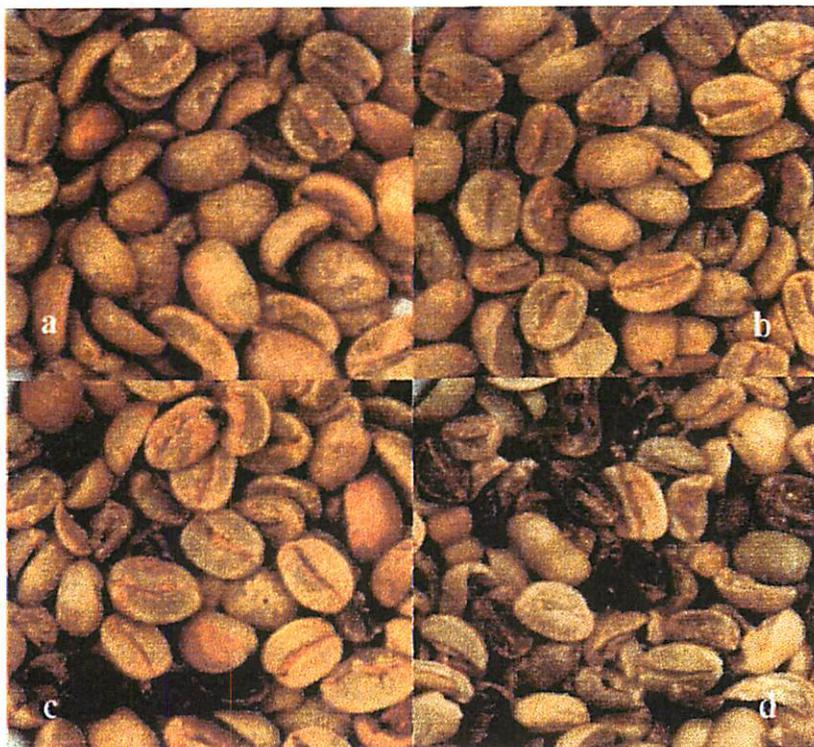


FIGURA 1 Efeito da separação do café proveniente do município de Campanha em diferentes peneiras sobre a coloração dos grãos. a) Peneira 17 acima b) Peneira 14/16 c) "bica corrida" d) "quebra".

4 CONCLUSÕES

A atividade da PFO é importante na diferenciação da qualidade da bebida, permitindo uma separação do que na prática se chama “dura para melhor” em bebidas apenas mole, mole e estritamente mole, resgatando assim a classificação do café em bebidas superiores.

A separação (seleção) pelo tamanho dos grãos através de classificação por peneiras, proporciona melhoria na qualidade do produto.

Em relação à cor, essas mesmas amostras se mostraram mais homogêneas, o que é desejável para uma torração mais fina.

Dos atributos analisados conclui-se que a separação (seleção) de grãos de café contribui para a melhoria da bebida e homogênea a cor dos grãos contribuindo para a uma melhoria no aspecto geral dos grãos beneficiados e conseqüentemente do produto após a torração.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMORIM, H. V.; SILVA, O. M. Relationship between the pophenol oxidase ativity af coffee beans and the quality of the beverage. *Nature*, London, v. 219, p. 381-382, 1968.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. **Regras para análise de sementes**. Rio de Janeiro: DNPV/DISEM, 1976. 188 p.
- CARVALHO, V. D; CHAGAS, S. J de R; CHALFOUN, S. M; BOTREL, N; JUSTE JÚNIOR, E. S. G. Relação entre a composição físico-química e química do grão beneficiado e qualidade de bebida do café. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 3, p. 419-454, mar. 1994.
- CHAGAS, S. J. R.; COSTA, L. **Análise da qualidade da bebida do café pelo método químico e pela “prova de xícara”**. Lavras: EPAMIG, 1996. (Circular Técnica, 68).
- DRAETTA, J. S.; LIMA, D. C. Isolamento e caracterização das polifenoloxidasas do café. **Coletânea do Instituto de tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 7, p. 3-28, 1976.
- PEREIRA, R. G. F. A. **Efeito da inclusão de grãos defeituosos na composição química e qualidade do café (*Coffea arabica* L.) “estritamente mole”**. 1997. 96 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- POINTING, 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.
- SOUZA, S. M. C. **O café (*Coffea arábica* L.) na região Sul de Minas Gerais: relação da qualidade com fatores ambientais, estruturais e tecnológicos**. 1996. 171 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- STEEL, R. G. D.; TORRIE, J. H. **Principles and procedures of statistics**. 2. ed. Nova York: McGraw Hill, 1980. 633 p.

TOLEDO, J. L. B. de; BARBOSA, A. T. Classificação e degustação de café. **Coleção café**. Brasília: Ed. Sebrae; Rio de Janeiro: ABIC, 1998. p. 60-64. (Série Agronegócios).

CAPÍTULO 5

EFEITO DA INTERAÇÃO ENTRE O FUNGO *Aspergillus niger* var. *niger* SOBRE O CRESCIMENTO DE ISOLADOS DE *Aspergillus* DA SEÇÃO *Circundati* E PRODUÇÃO DE OCRATOXINA A

RESUMO

NASSER. Patrícia Prado. Efeito da interação entre o fungo *Aspergillus niger* var. *niger* sobre o crescimento de isolados de *Aspergillus* da seção *Circundati* e produção de ocratoxina A. In: _____. **Influência da separação de grãos de café (*Coffea arabica* L.) por tamanho na qualidade e ocorrência de ocratoxina A.** 2001. Chap. 5, p. 105-122. Dissertação (Mestrado em ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

Buscando esclarecimento a respeito da inibição ou estímulo na produção de OTA e no crescimento dos fungos ocratoxigênicos por fungos que também ocorrem naturalmente associados aos grãos de café, o presente estudo avaliou o efeito inibitório do fungo *Aspergillus niger* var. *niger* EcoCentro 1181-01 e seu filtrado sobre o crescimento de isolados de *Aspergillus* da seção *Circundati* e produção de ocratoxina A. O isolado atoxigênico do fungo *Aspergillus niger* var. *niger* EcoCentro 1181-01 selecionado como possível antagonista para espécies toxigênicas de fungos do gênero *Aspergillus*, seção *Circundati*, apresentou um efeito positivo inibidor sobre os índices de velocidade de crescimento micelial dos demais. O filtrado da cultura antagonista, afetou o índice de velocidade de crescimento micelial e a produção de OTA em concentrações variáveis de 5 a 15%. A ação antagonista do fungo *Aspergillus niger* var. *niger* EcoCentro 1181-01 frequentemente associado a grãos de café pode ser um dos fatores responsáveis pelos níveis reduzidos de OTA detectados nas amostras analisadas.

Comitê Orientador: Dr^a Sara Maria Chalfoun de Souza – EPAMIG (Orientadora)
MSc Eugênia A. Vargas – LAQCASA/LAV-MG (Co-orientador) Dr Mário
Lúcio Vilela de Resende – UFLA (Co-orientador)

ABSTRACT

NASSER. Patrícia Prado. Effect of the interaction between the fungus *Aspergillus niger* var. *niger* on the growth of isolates of *Aspergillus* of the section *Circundati* and production of ochratoxin A. In: _____. **Influence of separation of coffee beans (*Coffea arabica* L.) by size on quality and occurrence of ochratoxin A.** 2001. Chap. 5, p. 105-122. Dissertation (Master's degree in Food Science) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

The present study evaluated the inhibitory effect of the fungus *Aspergillus niger* var. *niger* EcoCentro 1181T-01 and its filtrate on the growth an isolate of *Aspergillus* of the section *Circundati* and ochratoxin A production . The atoxigenic isolate of the fungus *Aspergillus niger* var. *niger* EcoCentro 1181-01 screened as a possible antagonist for toxigenic species of fungi of the genus *Aspergillus*, section *Circundati* presented a positive inhibitory effect on the mycelial growth velocity indices of the others. The filtrate of the antagonist culture affected the mycelial growth velocity index and OTA production at concentrations varying from 5 to 15% . The antagonist action of the fungus *Aspergillus niger* var. *niger* EcoCentro 1181T-01 often associated with coffee beans may be one of the factors responsible for the reduced levels of OTA detected in the samples analyzed.

Guidance Committee: Dr^a Sara Maria Chalfoun de Souza – EPAMIG (Adviser professor) MSc Eugênia A. Vargas – LAQCASA/LAV-MG (Co-adviser) and Dr Mário Lúcio Vilela de Resende – UFLA (Co-adviser)

1 INTRODUÇÃO

O crescimento fúngico em grãos de café raramente ocorre como cultura pura. Desta forma, o estudo das interações ecológicas entre fungos que colonizam um mesmo substrato, pode fornecer maior compreensão sobre os microrganismos que controlam a produção de toxina na natureza.

De acordo com Northolt et al. (1995), alguns fungos podem inibir o desenvolvimento de outros fungos. A presença de alguns microrganismos pode restringir o crescimento e a formação de micotoxinas.

Desta forma, o estudo das interações ecológicas entre espécies colonizadoras com e sem potencial ocratoxigênico assume grande interesse para a compreensão dos mecanismos e interações que controlam a produção de ocratoxina A (OTA) em grãos de café.

Aspergillus niger é uma das poucas espécies de fungos que receberam o status de GRAS (generally regarded as safe) conferido pela Food and Drug Administration (FDA) devido a sua baixa toxicidade, sendo importante mencionar que alguns isolados de *Aspergillus niger* produziram OTA em baixas quantidades (Varga et al., 1996; Abarca et al., 1997)

Em trabalhos anteriores (Batista, 2000) verificou que os isolados de *Aspergillus niger* var. *niger* não foram produtores de ocratoxina A embora o fungo seja citado como produtor.

Por outro lado várias pesquisas indicam que estirpes atoxigênicos mostram-se capazes de decompor micotoxinas sendo promissores porque permitem a eliminação biológica dessas micotoxinas de substratos tais como grãos de café e cereais (Varga et al., 2000).

Buscando esclarecimento a respeito da inibição ou estímulo na produção de OTA e no crescimento dos fungos ocratoxigênicos com outros fungos que

também ocorrem naturalmente nos grãos de café, o presente estudo avaliou o efeito inibitório do fungo *Aspergillus niger* var. *niger* e seu filtrado sobre o crescimento de isolados de *Aspergillus* da seção *Circundati*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizados dois experimentos, um para observação da interação entre isolados produtores de OTA de *Aspergillus* da seção *Circundati* com o fungo *Aspergillus niger* var. *niger* EcoCentro 1181T01-01 e outro para avaliar o efeito inibitório do extrato do fungo *Aspergillus niger* var. *niger* EcoCentro 1181T01-01 sobre o crescimento destes mesmos isolados.

Todos os isolados foram obtidos de grãos de cafés beneficiados e pertencem a micoteca do EcoCentro da EPAMIG em Lavras - Minas Gerais.

2.1 Primeiro ensaio: Interação entre fungos produtores de OTA x *Aspergillus niger* var. *niger* EcoCentro 1181T01-01

Microrganismos utilizados para observação de interação: *Aspergillus ochraceus* EcoCentro 1161T01-01, *Aspergillus elegans* EcoCentro 1141T01-01, *Aspergillus ostianus* EcoCentro 1091T01-01, *Aspergillus esclerotiorum* EcoCentro 1131T01-01 e *Aspergillus sulphureus* EcoCentro 1151T01-02 X *Aspergillus niger* var. *niger* EcoCentro 1181T01-01 (isolado não produtor de ocratoxina A).

Os microrganismos foram inoculados em dois pontos equidistantes em placa de Petri contendo meio YES, incubados a 25° C. O experimento foi realizado em triplicata.

A avaliação do crescimento das colônias foi feita após 2, 4, 7 e 9 dias, e os resultados foram utilizados para o cálculo do índice de velocidade de crescimento micelial dos fungos (IVCM) calculado, utilizando-se a fórmula de Maguire (1962), adaptada por Oliveira (1991):

$IVCM = \Sigma(D-D_a)/N$, onde: IVCM = Índice de velocidade de crescimento micelial, D= Diâmetro médio atual, D_a = Diâmetro médio anterior e N= Número de dias após a inoculação.

2.2 Segundo ensaio: Avaliação do efeito inibitório do filtrado do fungo *Aspergillus niger* var. *niger* EcoCentro 1181T01-01 sobre o crescimento de *Aspergillus* da seção *Circundati* .

Microrganismos toxigênicos: Foram utilizados os fungos produtores de ocratoxina A, *Aspergillus ochraceus* ecocentro 1161T01-01, *Aspergillus elegans* ecocentro 1141T01-01, *Aspergillus ostianus* ecocentro 1091T01-01, *Aspergillus esclerotiorum* ecocentro 1131T01-01 e *Aspergillus sulphureus* EcoCentro 1151T01-02 X Isolado não produtor de ocratoxina A: *Aspergillus niger* var. *niger* EcoCentro 1181T01-01.

O fungo *Aspergillus niger* var. *niger* EcoCentro 1181T01-01 cresceu em meio YES por 7 dias; um disco de micélio de 0,5 cm de diâmetro foi colocado em erlemeyer de 250 ml contendo 100 ml de YES líquido. O fungo cresceu por 7 dias sob agitação à temperatura ambiente (25 - 27° C). Após o tempo de incubação o meio líquido YES foi renomeado como YESAN (YES *Aspergillus niger*).

O YESAN foi pré filtrado em membrana de microfibras de vidro 55mm de diâmetro em membrana de RC 0,45 µm de diâmetro. Após a filtração o YESAN foi misturado em YES nas proporções 5%, 10% e 15%, controle na porção de 10% com água, para simular os nutrientes absorvidos em placas de Petri. Para medir o diâmetro das colônias os microrganismos foram inoculados em duplicata, em três pontos equidistantes por placas e incubadas a 25° C ± 0,4.

Os microrganismos cresceram em YES+H₂O à 5%, 10% e 15% e em YES+YESAN EcoCentro 1181-01 nas mesmas concentrações

A avaliação do crescimento das colônias foi feita após 2, 4, 7 e 9 dias, e os resultados foram utilizados para o cálculo do índice de velocidade de crescimento micelial dos fungos (IVCM) foi calculado utilizando-se a fórmula Maguire (1962), adaptada por Oliveira (1991):

$IVCM = \Sigma(D-D_a)/N$, onde: IVCM = Índice de velocidade de crescimento micelial, D= Diâmetro médio atual, D_a = Diâmetro médio anterior e N= Número de dias após a inoculação.

No último dia de avaliação do crescimento das colônias foi realizado o teste do potencial ocratoxigênico dos fungos pela técnica de Plug Agar. Todos os isolados identificados foram inoculados em meio YES e incubados por 7 dias a 25 ± 1 °C. O tempo de incubação para a detecção da produção de micotoxina pela técnica de Plug Agar é de cinco dias a temperatura a 25° C (Filtenborg & Frisvad, 1980). Com o auxílio de uma ponteira de pipeta automática, foi feito um corte circular de aproximadamente 25 mm do micélio do fungo com agar; este micélio foi colocado sobre uma placa de CCD (Merck – Sílica Gel 60, 20x20) previamente ativada, junto com o micélio dos demais isolados, um ao lado do outro, com 1,5cm de distância.

Ao lado do último micélio é feita a aplicação do padrão da micotoxina (ocratoxina A). O micélio é retirado e após 15 minutos é feita a eluição em uma cuba de vidro contendo como fase móvel TEF - Tolueno, Acetato de Etila e Ácido fórmico 90% (50:40:10). Este método conta com o fato de que muitas micotoxinas são extracelulares, difundindo-se no substrato. Após a eluição, as placas são secas em capela pelo fluxo de ar. A confirmação é feita em luz ultravioleta com 366nm em cromatovisor CAMAG (UV-BETRACHTER). O isolado produtor da micotoxina (ocratoxina) apresenta um R_f (fator de retenção) e um spot de fluorescência semelhante ao do padrão da micotoxina testada.

A produção de ocratoxina A foi avaliada arbitrariamente utilizando sinais (+) de acordo com a intensidade da fluorescência, a fluorescência mais

intensa recebeu nota (+++++) e onde não foi detectada a fluorescência característica de ocratoxina A a nota dada foi (-).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Resultado do Primeiro ensaio: Interação entre fungos produtores de OTA x *Aspergillus niger* var. *niger* EcoCentro 1181T01-01

Os resultados apresentados no QUADRO 1, referentes aos índices de velocidade de crescimento micelial dos isolados de fungos toxigênicos em presença do isolado atoxigênico do fungo *Aspergillus niger* var. *niger* EcoCentro 1181T01-01, indicaram que os isolados toxigênicos de espécies de *Aspergillus* apresentaram índices de velocidade de crescimento micelial reduzidos quando cultivados em presença do isolado atoxigênico do fungo *Aspergillus niger*, quando comparados com índices de velocidade de crescimento micelial dos fungos cultivados isoladamente. Tal fato demonstra a ação antagonista do fungo *Aspergillus niger* var. *niger* EcoCentro 1181T01-01 em relação aos demais fungos testados.

QUADRO 1 Interação entre fungos toxigênicos do gênero *Aspergillus* da seção *Circundati* e o fungo atoxigênico *Aspergillus niger* var. *niger* EcoCentro 1181T01-01

Fungos	Índices de Velocidade de Crescimento Micelial	
	Na presença de <i>Aspergillus niger</i> var. <i>niger</i> EcoCentro 1181T01-01	Na ausência de <i>Aspergillus niger</i> var. <i>niger</i> EcoCentro 1181T01-01
<i>Aspergillus esclerotiorum</i> EcoCentro 1131T0101-01	0,44	0,57
<i>Aspergillus elegans</i> EcoCentro 1141T0101-01	0,52	0,52
<i>Aspergillus sulphureus</i> EcoCentro 1151T01-02	0,44	0,51
<i>Aspergillus ostianus</i> EcoCentro 1091T01-01	0,44	0,54
<i>Aspergillus ochraceus</i> EcoCentro 1161T01-01	0,43	0,55

Dados são médias de 3 repetições.

Com relação ao tipo de interação entre os fungos testados e o fungo *Aspergillus niger* var. *niger* EcoCentro 1181T01-01 (antagonista) observou-se que quando testados em pares, as colônias dos fungos cresceram normalmente até que as margens das colônias se encontraram.

A FIGURA 1 mostra a interação entre fungos toxigênicos do gênero *Aspergillus* da seção *Circundati* e o fungo atoxigênico *Aspergillus niger* var. *niger* EcoCentro 1181T01-01.

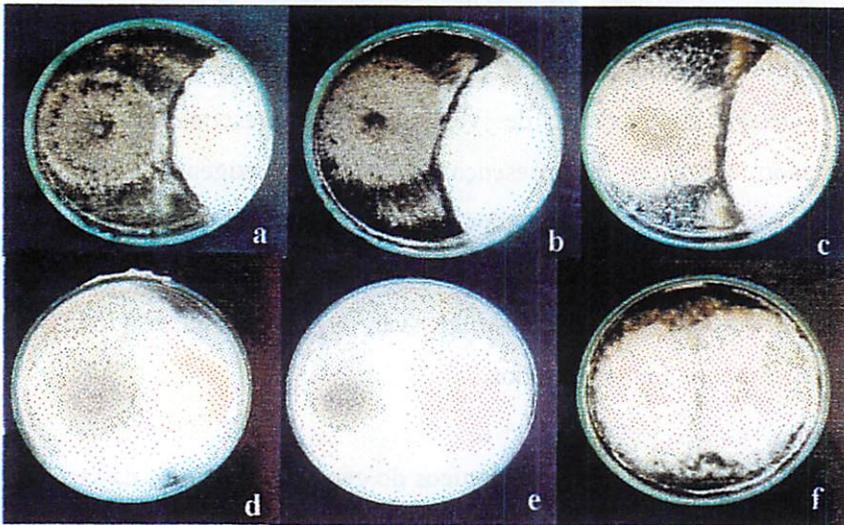


FIGURA 1 Interação entre os fungos toxigênicos da seção *Circundati* e fungo atoxigênico *Aspergillus niger* var. *niger* EcoCentro 1181T01-01

- a) *Aspergillus esclerotiorum* EcoCentro 1131T01-01
- b) *Aspergillus ochraceus* EcoCentro 1161T01-01
- c) *Aspergillus ostianus* EcoCentro 1091T01-01
- d) *Aspergillus sulphureus* EcoCentro 1151T01-02
- e) *Aspergillus elegans* EcoCentro 1141T01-01
- f) *Aspergillus niger* var. *niger* EcoCentro 1181T01-01

Baseado nos resultados obtidos atribuiu-se a ação inibidora do isolado atoxigênico do fungo *Aspergillus niger* var. *niger* EcoCentro 1181T01-01 sobre os demais à produção de metabólitos dando origem ao segundo ensaio utilizando-se filtrados da cultura antagonista e avaliando-se o seu efeito sobre o desenvolvimento dos fungos e produção de toxinas.

3.2 Segundo ensaio: Resultados da avaliação do efeito inibitório do filtrado do fungo *Aspergillus niger* var. *niger* EcoCentro 1181T01-01 sobre o crescimento de *Aspergillus* da seção *Circundati*

No QUADRO 2 encontram-se apresentados os resultados referentes aos índices de velocidade de crescimento micelial médios observados para os fungos toxigênicos do gênero *Aspergillus* da seção *Circundati*, quando em presença de filtrados do fungo antagonista, *Aspergillus niger* var. *niger* EcoCentro 1181T01-01.

QUADRO 2 Resultados referentes aos índices de velocidade de crescimento micelial médios, observados para os fungos toxigênicos do gênero *Aspergillus* da seção *Circundati*, quando em presença de filtrados do fungo antagonista, *Aspergillus niger* var. *niger* EcoCentro 1181T01-01

TRATAMENTOS		MÉDIAS
<i>Aspergillus esclerotiorum</i> EcoCentro 1131T01-01	5 YESAN	0,454 b ¹
<i>Aspergillus esclerotiorum</i> EcoCentro 1131T01-01	10 YESAN	0,490 c
<i>Aspergillus esclerotiorum</i> EcoCentro 1131T01-01	15 YESAN	0,538 c
<i>Aspergillus esclerotiorum</i> EcoCentro 1131T01-01	10 H ₂ O	0,569 c
<i>Aspergillus elegans</i> EcoCentro 1141T01-01	5 YESAN	0,544 c
<i>Aspergillus elegans</i> EcoCentro 1141T01-01	10 YESAN	0,495 c
<i>Aspergillus elegans</i> EcoCentro 1141T01-01	15 YESAN	0,460 b
<i>Aspergillus elegans</i> EcoCentro 1141T01-01	10 H ₂ O	0,518 c
<i>Aspergillua sulphureus</i> EcoCentro 1151T01-02	5 YESAN	0,470 b
<i>Aspergillua sulphureus</i> EcoCentro 1151T01-02	10 YESAN	0,504 c
<i>Aspergillua sulphureus</i> EcoCentro 1151T01-02	15 YESAN	0,480 b
<i>Aspergillua sulphureus</i> EcoCentro 1151T01-02	10 H ₂ O	0,508 c
<i>Aspergillus ostianus</i> EcoCentro 1091T01-01	5 YESAN	0,605 c
<i>Aspergillus ostianus</i> EcoCentro 1091T01-01	10 YESAN	0,390 a
<i>Aspergillus ostianus</i> EcoCentro 1091T01-01	15 YESAN	0,345 a
<i>Aspergillus ostianus</i> EcoCentro 1091T01-01	10 H ₂ O	0,538 c
<i>Aspergillus ochraceus</i> EcoCentro 1161T01-01	5 YESAN	0,538 c
<i>Aspergillus ochraceus</i> EcoCentro 1161T01-01	10 YESAN	0,445 b
<i>Aspergillus ochraceus</i> EcoCentro 1161T01-01	15 YESAN	0,544 c
<i>Aspergillus ochraceus</i> EcoCentro 1161T01-01	10 H ₂ O	0,555 c
<i>Aspergillus niger</i> var. <i>niger</i> EcoCentro 1181T01-01	5 YESAN	0,430 b
<i>Aspergillus niger</i> var. <i>niger</i> EcoCentro 1181T01-01	10 YESAN	0,405 a
<i>Aspergillus niger</i> var. <i>niger</i> EcoCentro 1181T01-01	15 YESAN	0,445 b
<i>Aspergillus niger</i> var. <i>niger</i> EcoCentro 1181T01-01	10 H ₂ O	0,518 c

¹ Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si através do teste de Scott-Knott a 1% de probabilidade. Dados são médias de três repetições.

Os fungos testados apresentaram índices de velocidade de crescimento micelial semelhantes, ou seja, na ausência do filtrado de *Aspergillus niger* var.

niger EcoCentro 1181T01-01 apresentaram índices de velocidade de crescimento normal a cada espécie segundo Pitt e Hocking (1999).

Observa-se um comportamento diferenciado das distintas espécies estudadas quando submetidas a concentrações variadas do filtrado obtido do isolado do fungo atoxigênico *Aspergillus niger* var. *niger* EcoCentro 1181T01-01.

O fungo *Aspergillus ostianus* foi o que apresentou maior índice de inibição do crescimento micelial principalmente nas concentrações de 10 e 15% do filtrado de *Aspergillus niger*. O fungo *Aspergillus sulphureus* apresentou índices de velocidade de crescimento micelial reduzidos nas concentrações de 5 e 15% e o fungo *Aspergillus elegans* apresentou uma inibição no índices de velocidade de crescimento micelial nas concentrações de 15%, o *Aspergillus ochraceus* na concentração de 5%.

Não se observou, portanto, exceto para o fungo *Aspergillus ostianus* uma relação direta entre redução dos índices de velocidade de crescimento micelial e concentrações dos filtrados do fungo *Aspergillus niger* var. *niger* EcoCentro 1181T01-01.

O QUADRO 3 mostra os resultados da produção de OTA por espécies de fungos do gênero *Aspergillus* da seção *Circundati* em presença de diferentes concentrações do filtrado do fungo antagonista *Aspergillus niger* var. *niger* EcoCentro 1181T01-01.

QUADRO 3 Resultados da produção de OTA por espécies de fungos do gênero *Aspergillus* da seção *Circundati* em presença de diferentes concentrações do filtrado do fungo antagonista *Aspergillus niger* var. *niger* EcoCentro 1181T01-01

Fungos	Concentrações (%)	Produção de OTA
<i>Aspergillus sclerotiorum</i> EcoCentro 1131T01-01	5 YESAN	-
<i>Aspergillus sclerotiorum</i> EcoCentro 1131T01-01	10 YESAN	+
<i>Aspergillus sclerotiorum</i> EcoCentro 1131T01-01	15 YESAN	+
<i>Aspergillus sclerotiorum</i> EcoCentro 1131T01-01	10 H ₂ O	++
<i>Aspergillus elegans</i> EcoCentro 1141T01-01	5 YESAN	+++
<i>Aspergillus elegans</i> EcoCentro 1141T01-01	10 YESAN	+++
<i>Aspergillus elegans</i> EcoCentro 1141T01-01	15 YESAN	+++
<i>Aspergillus elegans</i> EcoCentro 1141T01-01	10 H ₂ O	++++
<i>Aspergillus sulphureus</i> EcoCentro 1151T01-02	5 YESAN	+
<i>Aspergillus sulphureus</i> EcoCentro 1151T01-02	10 YESAN	+
<i>Aspergillus sulphureus</i> EcoCentro 1151T01-02	15 YESAN	+
<i>Aspergillus sulphureus</i> EcoCentro 1151T01-02	10 H ₂ O	+
<i>Aspergillus ostianus</i> EcoCentro 1091T01-01	5 YESAN	+
<i>Aspergillus ostianus</i> EcoCentro 1091T01-01	10 YESAN	+
<i>Aspergillus ostianus</i> EcoCentro 1091T01-01	15 YESAN	+
<i>Aspergillus ostianus</i> EcoCentro 1091T01-01	10 H ₂ O	++
<i>Aspergillus ochraceus</i> EcoCentro 1161T01-01	5 YESAN	+
<i>Aspergillus ochraceus</i> EcoCentro 1161T01-01	10 YESAN	+
<i>Aspergillus ochraceus</i> EcoCentro 1161T01-01	15 YESAN	-
<i>Aspergillus ochraceus</i> EcoCentro 1161T01-01	10 H ₂ O	++

(-) fluorescência não detectada e (+++++) fluorescência mais intensa

Através dos resultados apresentados no QUADRO 3 observa-se que, de uma maneira geral todos os fungos apresentaram uma redução na produção de OTA devido a presença do filtrado do fungo *Aspergillus niger* var. *niger* EcoCentro 1181T01-01.

Observa-se ainda uma diferença quanto ao potencial toxigênico entre espécies estudadas, com um potencial mais elevado do *Aspergillus elegans*, conforme demonstrado no tratamento com 10% de água, o que não impediu que o filtrado do fungo antagonista, nas três concentrações testadas, reduzisse a produção da micotoxina, confirmando trabalhos anteriores que relatam a possibilidade de ocorrência de um fenômeno de detoxificação de micotoxinas através da ação de microrganismos (Varga et al., 2000; Lee & Magan, 2000) traduzida por uma maior intensidade na fluorescência.

Não se observou uma relação entre inibição do crescimento micelial, e produção de toxinas, indicando que a presença do fungo apresentou uma ação diferenciada sobre os dois fenômenos não confirmando afirmativas anteriores de que existe uma tendência de ocorrência de inibição simultânea de crescimento micelial e de produção de micotoxinas (Lee & Magan, 2000).

TABELA 1 Resumo do resultado da análise de variância da interação entre o fungo *Aspergillus niger* var. *niger* EcoCentro 1181T01-01 sobre o crescimento de isolados de *Aspergillus* da seção *Circundati*²

FV	GL	Interação entre fungos	
		QM	Pr>Fc ¹
Tratamentos	23	0,0019	0,0001 **
Erro	24	0,0003	
Total	47		
CV (%)	1,94		
Média geral	0,99		

^{1/} **, *: teste de F significativo aos níveis de 1% e 5% de probabilidade.

^{2/} Os dados analisados foram transformados [Raiz (Y + 0,5)]

^{3/} Média geral, expressa em velocidade de crescimento micelial médio seria de 0.49.

4 CONCLUSÕES

O isolado atoxigênico do fungo *Aspergillus niger* var. *niger* EcoCentro 1181T01-01 selecionado como possível antagonista para espécies toxigênicas de fungos do gênero *Aspergillus*, seção *Circundati*, apresentou um efeito positivo inibidor sobre os índices de velocidade de crescimento micelial dos demais.

O filtrado da cultura antagonista, afetou os índices de velocidade de crescimento micelial e a produção de OTA em concentrações variáveis de 5 a 15%.

A ação antagonista do fungo *Aspergillus niger* var. *niger* EcoCentro 1181T01-01 frequentemente associado a grãos de café pode ser um dos fatores responsáveis pelos níveis reduzidos de OTA detectados nas amostras analisadas.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABARCA, M. L.; BRAGULAT, M. R.; CASTELLÀ, G.; CABANES, F. J. New Ochratoxigenic Species in the Genus *Aspergillus*. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 60, n. 2, p. 580-1582, Feb. 1997.

BATISTA, L. R. **Identificação, potencial toxigênico e produção de micotoxinas de fungos associados a grãos de café (*Coffea arabica L.*)**. 2000. 188 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

FIELTENBORG, O.; FRISVAD, J. C. A simple screening: method for toxigenic moulds in pure cultures. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, London, v. 13, p. 128-130, 1980.

LEE, H. B.; MAGAN, N. Impact of environmental and interspecific interaction between spoilage fungi and *Aspergillus ochraceus* on growth and ochratoxin production in maize grain. **International Journal Food Microbiology**, Amsterdam, v. 61, p. 11-16, 2000.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigours. **Crop Science**, Madison, v. 2, p. 176-177, Mar./Apr. 1962.

NORTHOLT, M. D.; FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. **Introduction to foodborne fungi**. 4. ed. Baarn, Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultuur, 1995. 243 p.

OLIVEIRA, J. **A Efeito do tratamento fungicida em sementes e no controle de tratamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativus L.*) e pimentão (*Capsicum annuum L.*)**. 1991. 111 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras.

VARGA, J.; KEVEL, E.; RINYU, E.; TÉREN, J.; KOZAKIEWICZ, Z. Ochratoxin production by *Aspergillus* species. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 12, p. 4461-4464, Dec. 1996.

VARGA, J.; RIGÓ, K.; TÉREN, J. Degradation of ochratoxin A by *Aspergillus* species. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 59, p. 1-7, 2000.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos foram consistentes em mostrar que a seleção de grãos de café por peneiras foi benéfica à qualidade do produto. E esta melhoria foi traduzida por efeitos positivos sobre as características físicas dos grãos, demonstrada pela análise de imagem, pelas características químicas, sensoriais e de segurança. Conclui-se portanto que além da redução do problema de micotoxinas (ocratoxina A) a padronização dos grãos melhora notavelmente a qualidade em relação aos cafés bica corrida.

Considerando-se ser a redução dos índices de contaminação por micotoxinas, entre elas a ocratoxina A, dependente de um conjunto de fatores, entre eles da interação com outros microrganismos, sugere-se o aprofundamento de pesquisas na área de Controle Biológico indicada como promissora no presente estudo.

ANEXOS A

Meios de cultura utilizados para o isolamento e identificação dos fungos e do potencial toxigênico.

Solução concentrada de Czapek com traços de metais (Klich e Pitt, 1988)

NaNO ₃	30,0 g
KCl	5,0 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	5,0 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,1 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,1 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,05 g
Água destilada	100,0 mL

CYA (Czapek Yeast Extract Agar) (Klich e Pitt, 1988)

K ₂ HPO ₄	1,0 g
Solução concentrada de Czapek	10,0 mL
Extrato de Levedura	5,0 g
Sacarose	30,0 g
Agar	15,0 g
Água destilada	1,0 L

MEA (Malte Extract Agar) (Klich e Pitt, 1988)

Extrato de Malte	20,0 g
Peptona	1,0 g
Glucose	20,0 g
Agar	20,0 g

Água destilada 1 L

MA (Malt Agar)

Extrato de Mate 20,0 g

Agar 20,0 g

Água destilada 1 L

YES (Yeast Extract Sucrose)

Extrato de levedura 20,0 g

Sacarose 150,0 g

Agar 20,0 g

Água destilada 1 L

ANEXOS B

Equipamentos, material, soluções e reagentes utilizados para análise de OTA em café beneficiado.

Equipamentos

- agitador de tubos, tipo Vortex;
- balança eletrônica (2 casas decimais);
- banho-de água com agitação;
- cromatógrafo líquido de alta eficiência, Shimadzu, detector de fluorescência;
- homogeneizador com hélice, tipo Omnimixer;
- sistema de filtração à vácuo com controle individual de fluxo;

Material

- adaptadores em polipropileno para tubos de 1,3/6 e 12/20 mL, tipo bond – elut, Varian;
- aparato para filtração à vácuo com reservatório de 300 mL, base do funil para filtro de 47 mm e garra, tipo Millipore;
- balões volumétricos de 1000 e 2000 mL;
- balões volumétricos âmbar de 100 mL;
- béquers de 100 e 600 mL;
- colunas de imunoafinidade Ochratest, VICAM;
- coluna Shimpack CLC ODS (M) - C18; 250 x 4,6 mm, partículas de 5 µm;

- frasco de vidro com tampa metálica, tipo Mason;
- frascos autosampler de 1,8 mL âmbar, tampa de rosca e septa de silicone,
- frascos para solução padrão com fundo duplo e tampa de baquelite;
- funis de haste curta com 7 cm de diâmetro;
- kitsatos de 500 e 1000 mL;
- membrana filtrante de 0,45 μm ;
- membrana de fibra de vidro, 55 mm de diâmetro, tipo Whatman GF/B;
- micropipeta automática de 20-200 μL ;
- micropipeta automática de 100-1000 μL ;
- microseringa de vidro de 250 μL ;
- papel de filtro tipo Whatman n^o4, pregueado;
- fita parafinada flexível, tipo Parafilm;
- pipetas de Pasteur;
- pipetas volumétricas de 5 e 10 mL;
- provetas graduadas de 10, 250 e 1000 mL;
- seringas de polipropileno de 60 mL, tipo luer;
- seringas de vidro de 60 mL, tipo luer;
- tomeiras de polipropileno para tubos de 12 e 20 mL, tipo bond-elut;
- tubos de polipropileno de 15 mL com tampa em rosca.

Soluções e reagentes

- acetonitrila HPLC;
- água destilada: ácido acético (29:1 v/v), filtrada em membrana de 0,45 μm ;
- ácido acético glacial p.a.;
- água deionizada;
- água destilada;
- bicarbonato de sódio p.a.;
- bicarbonato de sódio a 3%;
- cloreto de sódio p.a.;
- cloreto de potássio p.a.;
- fosfato de sódio bibásico anidro p.a.;
- fosfato de potássio monobásico p.a.;
- metanol par;
- metanol HPLC;
- metanol HPLC:ácido acético (99:1, v/v);
- metanol p.a.;
- metanol p.a.: bicarbonato de sódio (1:1, v/v);
- solução padrão de ocratoxina A;
- solução tampão PBS (0,20 g de fosfato de potássio monobásico, 1,10 g de fosfato de sódio bibásico anidro, 8,0 g de cloreto de sódio, 0,2 g de cloreto de potássio, água deionizada q.s.p. 1 L);
- trifluoreto de boro a 14% em metanol.