



**INFLUÊNCIA DE *Cladosporium*  
*cladosporioides* NA QUALIDADE DA BEBIDA  
DO CAFÉ**

**RICARDO TADEU GALVÃO PEREIRA**

**2002**



54118

MFNO46320

**RICARDO TADEU GALVÃO PEREIRA**

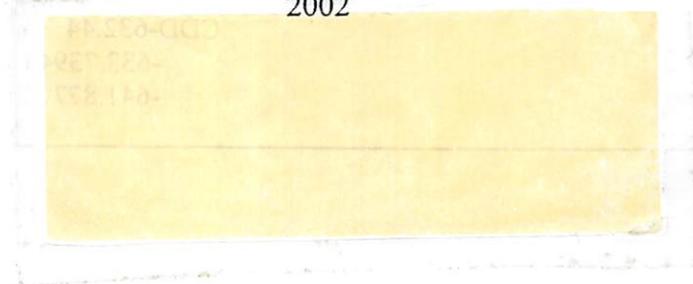
**INFLUÊNCIA DE *Cladosporium cladosporioides*  
NA QUALIDADE DA BEBIDA DO CAFÉ**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração Fitopatologia, para obtenção do título de "Mestre".

Orientador

Prof. Hilário Antônio de Castro

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2002



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

Pereira, Ricardo Tadeu Galvão

Influência de *Cladosporium cladosporioides* na qualidade da bebida do café /  
Ricardo Tadeu Galvão Pereira. -- Lavras : UFLA, 2002.

42 p. : il.

Orientador: Hilário Antônio de Castro.

Dissertação (Mestrado) — UFLA.

Bibliografia.

1. Fungo. 2. Café. 3. Qualidade. 4. Antagonismo. 5. Wallemia. I. Universidade Federal de  
Lavras. II. Título.

CDD-632.44  
-633.73944  
-641.877

RICARDO TADEU GALVÃO PEREIRA

**INFLUÊNCIA DE *Cladosporium cladosporioides*:  
NA QUALIDADE DA BEBIDA DO CAFÉ**

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

APROVADA em 30 de julho de 2002

Dr. Sara Maria Chalfoun

EPAMIG

Prof. Ludwig H. Pfenning

UFLA



Prof. Hilário Antônio de Castro

UFLA

(Orientador)

LAVRAS  
MINAS GERAIS – BRASIL

Aos meus pais, Ruberval e Maria das Graças,

As minhas segundas mães Maria Gertrudes e Maria José (Madrinha),

A minha irmã Valéria,

### **OFEREÇO**

Ao meu avô João Batista Pereira,

Aos meus tios Carlos Jorge Pereira e Maria do Carmo Pereira,

Ao meu primo, Carlos Alberto Pereira,

E a todos aqueles que dedicam sua vida à agricultura

### **DEDICO**

# **AGRADECIMENTOS**

## **PODES FAZER ISSO**

Se nada tens para doar aos companheiros de caminho, na jornada humana, reúne as próprias forças e oferece-lhe um sorriso de paz e encorajamento para que a tristeza ou o desânimo não lhes aproxime do coração.

Emmanuel

À Juliana pela compreensão, amor e por estar sempre pronta a ajudar nesta jornada.

Aos colegas de república e meio irmãos Anderson (Bradock) e Sandro por aguentar todas as bagunças.

Aos colegas de curso Gleiber e Deila, a melhor turma do DFP.

Aos companheiros do laboratório de micologia em especial à Miriam e Anderson pelas sugestões e apoio constantes.

Difícil encontrar palavras para agradecer ao Edinho pelo seu apoio incondicional.

A minha grande amiga Eloísa, que me iniciou na arte da fitopatologia

Aos amigos, Márcio Fernandes, Cris, Gislaine, Pará, Lucas e Nezinho sempre prontos para qualquer festa.

A todos funcionários do DFP em especial à Leísa, Ana Maria, Carzinho e Dilourdes.

Ao Dr Odilon e seu funcionário Sebastião, pela confiança em abrir às portas de sua propriedade.

Aos Professores Ludwig e Hilário pela orientação

À Dra Sara e Prof. Edson pela ótimas sugestões no desenvolvimento do trabalho.

Àos meus tios Eloi, Carolina, Noêmia e Pedro pela preocupação.

À Deus e a todos aqueles que foram seus intermediários oferecendo seu sorriso, força, amizade, carinho, amor conhecimento e compreensão nesta minha jornada.

**Muito Obrigado**

## SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 Fungos associados aos frutos e grãos do café.....	3
2.2 Controle biológico de patógenos em pós-colheita.....	6
2.3 O gênero <i>Cladosporium</i> .....	8
2.4 Qualidade do café e sua determinação.....	10
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	12
3.1 Isolamento e Identificação de Isolados de <i>Cladosporium</i> .....	12
3.1.1 Isolados.....	12
3.1.2 Isolamentos.....	13
3.1.2.1 Frutos.....	13
3.1.2.2 Grãos.....	13
3.1.2.3 Folhas.....	14
3.1.2.4 Solo.....	14
3.1.2.5 Ar.....	14
3.1.3 Isolamento.....	15
3.1.4 Identificação.....	15
3.2 Tratamento Pré-colheita de frutos de café e dinâmica de <i>Cladosporium</i> cladosporioides no campo.....	15
3.2.1 Local e Cafeeiros.....	15
3.2.2 Isolados e Suspensões.....	16
3.2.3 Pulverizações.....	16
3.3 Tratamento pós-colheita de frutos de café com <i>Cladosporium</i> cladosporioides.....	18
3.3.1 Soluções e suspensões.....	18
3.3.2 Café.....	18
3.3.3 Tratamentos.....	18
3.3.4 Análises.....	19
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
4.1. Caracterização e identificação de <i>Cladosporium</i> associado ao cafeeiro. ....	21
4.1.1 Características microscópicas.....	21
4.1.2 Características macroscópicas.....	22

4.2 Tratamento pré-colheita de frutos de café com Cladosporium cladosporioides.....	23
4.2.1 Dinâmica de Cladosporium cladosporioides, interna e externamente em frutos de café.....	23
4.2.2 Avaliação sensorial e química das amostras .....	24
4.2.3 Avaliação microbiológica das comunidades fúngicas tratadas com Cladosporium cladosporioides na Pré-colheita.....	27
4.3 Tratamento pós-colheita de frutos de café com Cladosporium cladosporioides.....	28
4.3.1 Sucessão fúngica no terreiro .....	28
4.3.2 Avaliação sensorial e química das amostras .....	31
5 CONCLUSÕES.....	35
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	36
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37

## RESUMO

PEREIRA, Ricardo Tadeu Galvão. **Influência de *Cladosporium cladosporioides* na qualidade da bebida do café.** 2002. 42 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)- Universidade Federal de Lavras, Lavras.

O café é um dos principais produtos agrícolas da exportação brasileira, destacando-se a região sul do estado de Minas Gerais como produtora de bons cafés. Dentre os fatores que afetam a qualidade, fungos do gênero *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* tem merecido destaque nas últimas décadas tanto por alterações organolépticas, quanto pela produção de toxinas que podem prejudicar a saúde do consumidor. Por outro lado o fungo *Cladosporium* sp. tem sido relatado associado a cafés de boa qualidade em várias regiões, o que despertou o interesse para o seu uso como agente de antagonista aos fungos deletérios a qualidade do café. *Cladosporium* é um ascomiceto mitosporico de ampla distribuição geográfica, facilmente cultivado em meio axênico com crescimento rápido e vigoroso. Considerando estes fatores o presente trabalho teve como objetivo caracterizar a espécie de *Cladosporium* associado ao cafeeiro bem como estudar sua relação com a qualidade da bebida do café. Foi realizado o isolamento do fungo do solo, ar, folhas, frutos e grãos do cafeeiro, os quais foram cultivados em meio de cultura, e identificados como *Cladosporium cladosporioides* (Link ex. Fries). Para estudar o efeito de *C. cladosporioides* na fase pré colheita de frutos e sua dinâmica no campo, plantas de café foram pulverizadas quinzenalmente a partir do mês de outubro com uma suspensão de conídios de *C. cladosporioides* em diferentes intensidades O estudo do efeito de *C. cladosporioides* em pós colheita foi feito imergindo-se os frutos em uma suspensão de conídios ou pulverizando diariamente no terreiro. Alíquotas de ambos os experimentos foram analisadas quanto a comunidade fúngica, testes químicos da atividade da polifenoloxidase, lixiviação de K, condutividade elétrica e prova de xícara. Na fase pré colheita não houve diferença entre o número e época de pulverizações sendo as bebidas classificadas como de dura a apenas mole. Na pós-colheita a atividade da PFO foi superior na parcela imersa e pulverizada diariamente. Quanto a bebida todas foram classificadas como dura. *Aspergillus ochraceus*, *A. niger* var *niger*, *A. glaucus*, *A. flavus*, *A. sclerotiorum*, *Fusarium stilboides*, *Fusarium* sp. *Penicillium* sp. , *Rhizopus stolonifer* e *Wallemia sebi* foram encontrados nas amostras. *W. sebi* ainda não foi relatado em grãos de café no Brasil até o momento.

---

\*Comitê Orientador: Hilário Antônio de Castro-UFLA (Orientador) e Sara Maria Chalfoun.

## ABSTRACT

PEREIRA, Ricardo Tadeu Galvão. **Influence of *Cladosporium cladosporioides* on the quality of coffee.** 2002. 42 p. Dissertation (Master Science in Phytopathology)- Lavras Federal University, Lavras.\*

Coffee is one of the most important agricultural commodity of Brazil for export, being the south of the state of Minas Gerais an outstanding area for producing coffee of good quality. Among the factors that affect quality, fungi of the genera *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* have been deserved particular attention in the last decades since they can cause alterations in flavour, as well as produce toxins that can harm the consumer's health. On the other hand, it is postulated that fungi from the genus *Cladosporium* could be associated to coffees of good quality, a fact that drew the attention on the possibility to use it as an antagonist against fungi which are deleterious on the quality of coffee. *Cladosporium* is an anamorph ascomycete genus with species of wide geographical distribution, in general easily cultivated in axenic culture with fast and vigorous growth. In consequence, the present work objectives to characterize species of *Cladosporium* associated to coffee trees as well as to study its relationship with the quality of the beverage. *Cladosporium* was isolated from soil and air in yards and from leaves, fruits and grains and grown in axenic culture on malt extract. All isolates were identified as *Cladosporium cladosporioides* (Link.ex Fries). To study the effect of *C. cladosporioides* in the pre-harvest phase of fruits and its dynamics in the field, coffee plants were sprayed with a suspension of conidia of *C. cladosporioides* in different intensities every 14 days, starting from the month of October. To study the effect of *C. cladosporioides* on fruits in the post-harvest phase, recently harvested fruits have been treated by immersion in suspensions of conidia or sprayed daily with conidia. Aliquots from both experiments had its fungal community analysed and tests were conducted on the polyphenoloxidase activity, leaching of K, electric conductivity and for the cup quality. It was found that the activity of the polyphenoloxidase was superior in the post-harvest phase in plots of the immersed and daily sprayed fruits. For the cup quality test, all the treatments showed similar results, classifying the beverage as "hard". For the pre-harvest phase, no difference was detected among the treatments. *Aspergillus ochraceus*, *A. niger* var *niger*, *A.*, *A. glaucus*, *A. flavus*, *A. sclerotiorum*, *Fusarium stilboides*, *Fusarium* sp. , *Rhizopus stolonifer* and *Wallemia sebi* were found in the samples. *Wallemia sebi* had not been reported in coffee grains in Brazil so far.

---

\*Guidance committee: Hilário Antônio de Castro-UFLA (Major professor) e Sara Maria Chalfoun –EPAMIG

# 1 INTRODUÇÃO

Originário da Etiópia, o café foi introduzido no Brasil na primeira metade do século XVIII, nos estados do Pará e Maranhão. No século XIX, o Brasil já se tornara o seu maior produtor mundial, posição que ocupa até hoje. Internamente o café tem papel social importante, gerando divisas para estados e municípios e, principalmente, empregos e distribuição de renda.

O café é atualmente um dos produtos da exportação agrícola brasileira que têm seus preços mais intimamente relacionados com a qualidade. O mercado para cafés *commodity* cresce na proporção de cerca de 1,5% ao ano, enquanto que o de cafés finos de alta qualidade cresce cerca de 20%(Illy,2000). Sendo o Brasil o único país produtor capaz de suprir esta demanda.

A qualidade do café pode ser influenciada por diversos fatores entre eles, a espécie, a cultivar utilizada, o manejo da lavoura, o processamento e principalmente, como se vem constatando, pela presença de microrganismos, destacando-se os fungos.

Os fungos podem influenciar a qualidade do café de duas maneiras bem distintas: produzindo metabólitos tóxicos ao homem conhecidos como micotoxinas, destacando-se a ocratoxina A, que já limita a exportação em alguns países, ou agindo sobre os grãos influenciando as características organolépticas do produto. Dentre os fungos que afetam negativamente a qualidade, destacam-se os do gênero *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium* tanto por alterações na bebida quanto pela produção de micotoxinas. A influência benéfica de microrganismos na qualidade de vários produtos é bastante conhecida, como no caso dos queijos, vinhos, e outra bebidas. Porém a influência de microrganismos que afetam a qualidade do café se limita a relatos do fungo *Cladosporium* associado a bebidas de boa qualidade (Carvalho et al. 1989; Alves,1996; Meirelles 1990).

A garantia da qualidade está ligada ao manejo das populações, de modo que os fungos indesejados não possam se manifestar. Para este fim é necessário um aprofundamento nos estudos das relações entre estes microrganismos, propondo ações que favoreçam o estabelecimento de populações desejáveis em detrimento das outras.

Considerando-se as hipóteses: que existem espécies de *Cladosporium* associados ao cafeeiro e que estas tem potencial como agente antagonista, a presente dissertação teve como objetivos: caracterizar e identificar as espécies de *Cladosporium* associadas ao cafeeiro; verificar as relações e potencialidade de *Cladosporium cladosporioides* como agente antagonista dos mofos do café.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Fungos associados aos frutos e grãos do café.

Os primeiros relatos da influência de fungos na qualidade do café datam de 1936 quando Krug (1940a) verificou, através de lupa de bolso em amostras de cafés ardidos, a presença de um fungo de micélio avermelhado identificado inicialmente como do gênero *Fusarium*. A partir daí este pesquisador deu início a uma série de trabalhos sobre a origem dos cafés duros. Inicialmente ele estudou a influência dos cafés de varrição na qualidade da bebida, verificando uma relação entre bebidas de má qualidade e a presença de grão de varrição, bem como aumento do fungo de micélio avermelhado identificado como *Fusarium concolor* (Krug, 1940a). Krug (1940b) estudou a microbiota de grãos de café nos estádios de cereja, seco no pé e seco no chão e verificou uma porcentagem de 0%, 13% e 8% de bactérias, e 0%, 2% e 13% para fungos, respectivamente. Sobre a diferença na qualidade do café de diferentes regiões, Krug (1940c) fez um levantamento e verificou maior porcentagem do fungo *Fusarium concolor*, em bebidas de pior qualidade. Estas bebidas eram encontradas em regiões específicas do estado de São Paulo.

Em estudos sobre a incidência de fungos em grãos de café provenientes de 31 países, foi verificada uma alta infestação em grãos sem desinfestação superficial, nas amostras de todos países. Entretanto, após a desinfestação superficial dos grãos com hipoclorito de sódio a 5,0% constatou-se que a contaminação interna era menor nas amostras dos países da América Central e do Sul do que nas dos países africanos e asiáticos. Neste trabalho, o gênero dominante foi *Aspergillus* com as espécies toxigênicas como *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus versicolor*, e o gênero *Penicillium*

foi encontrado regularmente, embora com índices de ocorrência baixos (Mislivec et al.1983).

Meirelles (1990) levantou a microflora associada aos frutos do cafeeiro de diferentes regiões do estado de Minas Gerais e concluiu ser os gêneros *Fusarium* e *Cladosporium* os mais abundantes, seguidos dos gêneros *Geotrichum*, *Trichoderma*, *Rhizopus* e *Phomopsis*. Já nos cafés beneficiados foram encontrados, além de *Fusarium* e *Cladosporium*, *Aspergillus* e *Penicillium*. Com relação à qualidade, verificou-se a relação entre a presença dos fungos *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus niger* e *Fusarium* sp com cafés de bebidas inferiores (rio e riado).

Em levantamento da ocorrência de população fúngica associada a grãos beneficiados de café de seis localidades do estado de Minas Gerais, Alves (1996) verificou a presença de fungos do gênero *Fusarium*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Mucor* e *Aspergillus*. Os fungos *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* e *Fusarium* sp estavam associados a bebidas de má qualidade, enquanto *Cladosporium* esteve associava-se a boas bebidas (dura para melhor). O autor verificou, em diferentes estádios de desenvolvimento dos frutos do cafeeiro e em diferentes intensidades os fungos *Colletotrichum* sp, *Phoma* sp, *Fusarium* sp, *Cladosporium* sp e *Penicillium* sp, em duas localidades do município de Lavras, tradicionalmente produtoras de café de boa e má qualidade, confirmando maior intensidade de *Cladosporium* sp na primeira.

Com relação à localização dos fungos em grãos de café, Freitas (2000) amostrou grãos de 167 propriedades de 17 municípios do estado de Minas Gerais, identificando internamente os fungos *Aspergillus niger*, *Aspergillus glaucus*, *Aspergillus ochraceus*, *Fusarium* sp, *Aspergillus tamarii*, *Aspergillus flavus* e *Penicillium* sp, e externamente *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus*

*niger*, *Aspergillus tamarii*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus glaucus*, *Penicillium* sp e *Fusarium* sp em ordem de intensidade.

A incidência de populações fúngicas associadas à qualidade de bebida de café na Zona da Mata Mineira foi investigada por Fernandes (2000). Na sucessão de fungos em frutos de café o esse autor verificou a presença de *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Cercospora* e *Cladosporium* em diferentes intensidades. Avaliando a flutuação das populações fúngicas, verificou *Cercospora* e *Cladosporium* aumentando de fevereiro a março e uma estabilidade de *Colletotrichum* e *Fusarium*, no dossel das plantas de café.

Silva (2000) realizou um levantamento da diversidade microbiana de cafés em diferentes estádios de maturação e identificou como sendo predominante *Cladosporium* (45,9%), seguido de *Fusarium* (38,8%), *Aspergillus* (2,2%) e *Penicillium*(13,1%), além dos gêneros *Monilia*, *Arthobotrys* e *Beauveria*.

Os fungos *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium* spp e *Fusarium* spp. estão relacionados com cafés de bebida inferior (rio e riado). (Carvalho et al., 1989b; Meireles, 1990; Alves, 1996; Freitas, 2000). Um provável efeito destes microrganismos seria a produção de enzimas que, agindo sobre a mucilagem do fruto, produziriam álcool que, desdobrado a acido acético, láctico, butírico e outros ácidos carboxílicos, comprometeriam a qualidade da bebida (Carvalho et al., 1989a).

Apesar do número de trabalhos sobre a microbiota presente em grãos e frutos do cafeeiro, a interação entre estes microrganismos ainda é pouco compreendida. Há necessidade de estudos mais aprofundados das relações ecológicas, tanto no campo quanto em laboratório.

## 2.2-Controle biológico de patógenos em pós-colheita

O controle biológico de patógenos em pós-colheita data de 1953, quando Gutter e Littauer demonstraram a ação antagonista de *Bacillus subtilis* contra patógenos de frutos de citros (Wilson & Chalutz, 1989, citados por Kretzschmar, 1991). Porém, somente a partir da década de 1970 intensificaram-se os trabalhos de pesquisa sobre o tema, na busca de microrganismos com potencial de biocontrole em condições de armazenamento e estudos sobre o seu modo de ação (Kretzschmar, 1991). O campo de pesquisa na área de controle biológico de patógenos tem avançado e algumas experiências mais recentes merecem destaque. Tabela 1.

TABELA 1 Experiências de controle biológico em pós-colheita

Cultura	Patógeno	Microrganismo de biocontrole	Referência
Maçã	<i>Botrytis cinerea</i> e outros	<i>Aureobasidium pullulans</i>	(Castora et al., 2001)
Maçã	<i>Penicillium expansum</i>	<i>Candida sake</i> .	(Usall et al., 2001)
Maçã	<i>Penicillium expansum</i>	<i>Pseudomonas siringae</i> e leveduras	(Leverentz et al., 2000)
Grãos de trigo	<i>Penicillium</i> spp.	<i>Pichia anomala</i>	(Boysen et al., 2000)
Milho	<i>Fusarium graminearum</i> e <i>F. subglutinans</i>	<i>Fusarium moniliforme</i>	(Rheeder., 1990)*

\*Resumo em Kretzschmar (1991).

A maioria dos trabalhos realizados com controle biológico em pós-colheita tem sido com frutas, principalmente aquelas armazenadas sob baixas temperaturas. Poucos são os trabalhos com grãos mantidos em temperaturas

ambiente, como ocorre com o café (Kretzschmar, 1991). O café é colhido na forma de um fruto fresco e sofre um processamento, visando principalmente à perda de água e das estruturas indesejáveis, sendo o produto final um grão. Há uma carência de estudos sobre os fungos deletérios a bebida e sua atuação durante o período de frutificação e pós-colheita. O uso de um agente de biocontrole, neste caso deveria estar associado ao produto o maior tempo possível.

Existem duas condições básicas para o uso de biocontrole em pós-colheita. Pode-se manejar a microflora natural do ambiente ou introduzir outros microrganismos (Wilson e Wisniewski, 1989). Ainda segundo os mesmos autores um bom agente de controle biológico deve: A) ser geneticamente estável B) Efetivo em baixas concentrações; C) não fastidioso; D) ser hábil no desenvolvimento em diversas condições ambientais; E) ser eficaz contra uma ampla gama de patógenos; F) crescimento satisfatório em meios baratos; G) facilmente transportado e armazenado; H) não produzir metabólitos secundários que possam ser deletérios a humanos; I) resistente a pesticidas; J) ser compatível com outros tratamentos químicos e físicos do produto; K) não ser patogênico ao hospedeiro.

Com base nestes critérios, *Cladosporium* pode ser considerado, em uma análise inicial, como um potencial agente antagonista de fungos deletérios à qualidade do café.

A seleção e o isolamento do antagonista talvez constituam as fases mais importantes quando se busca um agente de controle biológico (Wilson e Chalutz, 1989). No caso do biocontrole em frutos, o agente de controle biológico pode ser buscado tanto no próprio fruto quanto na filosfera da planta que apresenta um ambiente geralmente semelhante. Deve-se proceder um amplo isolamento de microrganismos potenciais, testes in vitro simples para seleção inicial e aprofundamento dos testes nos microrganismos com melhor potencial

Os mecanismos de interação antagonista entre microrganismos patogênicos e fungos antagonistas com a planta são semelhantes às interações em pós-colheita e podem ser divididos em antibiose, competição, parasitismo, predação, hipovirulência e indução de defesa do hospedeiro (Cook, 1985). Embora exista esta divisão, um agente antagonista pode atuar através de um ou mais mecanismos e quando se tem esta condição, maiores são as chances de êxito no controle. Dentre os mecanismos de atuação de *Cladosporium cladosporioides* a competição, que se refere a interação entre dois ou mais organismos empenhados na mesma ação, é o mais provável, devido à sua ampla faixa de adaptação natural e também à sua rápida capacidade de colonizar o substrato. A antibiose, que é a inibição ou destruição dos microrganismos pela ação de um ou mais metabólicos produzidos por outro organismo, também pode estar envolvida.

Como citado anteriormente, o uso de agentes de biocontrole para grãos e cereais ainda é pouco utilizado e praticamente nulo quando se pensa em pré-colheita. Trata-se de um campo com grande potencial, principalmente quando se trata de culturas de expressivo valor econômico e que as exigências de qualidade são cada vez maiores, como é o caso do café.

### **2.3 O gênero *Cladosporium***

*Cladosporium* Link ex Fries (1815)

O gênero foi descrito pela primeira vez em 1815, por Link conta aproximadamente com 500 espécie descritas sendo 15 de ocorrência comum. *Cladosporium* é um Ascomyceto mitospórico, subfilo Pezizomycota, classe Dothideomycetes e família Mycosphaerellaceae (Kirk et al., 2001). O fungo apresenta colônias efusas ou ocasionalmente puntiformes freqüentemente de coloração verde oliva, podendo ser cinza, amarelo-claro, marrom, negro ou parda, de textura aveludada ou flocosa. O micélio pode ser imerso ou superficial.

Estroma algumas vezes presente sem hifopódios ou setas. A célula conidiogênica é poliblastica, normalmente integral, terminal e intercalar, muitas vezes discreta, simpodial, mais ou menos cilíndrica cicatrizada, com marcas normalmente proeminentes. Os conídios são freqüentemente em cadeias ou solitários nas espécies de conídios grandes. As cadeias ramificadas formam conídios acropetais, simples, cilíndricos, doliformes, elipsóides, fusiformes, ovóides, esféricos, ou subsférico freqüentemente com uma cicatriz protuberante basal ou próximo a ela, de coloração marrom-olivácea a preto, verrugoso ou equinulado com 0 a 3 septos ou mais (Ellis, 1971 e Ellis, 1976). Em frutos e grãos de café, o fungo é normalmente encontrado, porém, sem a descrição das espécies.

Os relatos de *Cladosporium* sp. associados a bebidas de boa qualidade (tipo mole e dura) são amplos (Carvalho et al., 1989b; Alves, 1996; Meirelles, 1990). Entretanto, qual a influência deste fungo na qualidade e a sua relação com os outros microrganismos ainda não foi estudada, e o seu esclarecimento pode conduzir à sua utilização como um potencial agente de controle biológico. Um provável mecanismo de ação de *Cladosporium* seria um consumo muito rápido do substrato presente no fruto (mucilagem), impedindo ou amenizando o estabelecimento de outros fungos. Esta ação impediria, então, a ocorrência fermentações indesejáveis como a butírica e propiônica devido a falta de substrato.

O primeiro relato de *Cladosporium* em grãos de café foi feito por Bitancourt (1957), que observou *Cladosporium* com comportamento diferente dos outros fungos, não sendo encontrado no terreiro, mas no campo até o estágio de seco no pé. Alves (1996), estudando a dinâmica da população de fungos associados aos grãos e frutos do café, verificou a presença de *Cladosporium* nas fases, verde-cana, cereja, passa, seco no pé, grãos no chão e no café beneficiado. Porém, a grande incidência ocorreu na fase de passa e seco

no pé. O autor também verificou grande aumento da porcentagem deste fungo da fase de cereja para passa e a associação de *Cladosporium* a cafês de boa e má qualidade de regiões específicas do município de Lavras. Na região de maior umidade relativa, a incidência de *Cladosporium* foi menor e a qualidade da bebida pior, ocorrendo o inverso com a região de clima seco. Meirelles (1990) tratou grãos de café com benomyl ou hipoclorito e os acondicionou em sacos de algodão e verificou menor porcentagem de *Cladosporium* nos grãos. Ferreira (1989) relata na região de Viçosa MG, uma espécie de *Cladosporium* hiperparasitando *Prospodium bicolor* (Ferrugem do ipê) em sua fase ecial. Em condições de umidade este fungo foi encontrado amplamente nas esporulações de ferrugem (Comunicação Pessoal\*). As informações sobre este fungo como agente de controle biológico resumem-se a estes relatos.

Apesar dos estudos sobre a microbiota dos grãos e frutos do café e a sua influência na qualidade da bebida serem antigos, somente a partir da década de 1990 começaram a surgir estudos mais aprofundados sobre as populações de microorganismos, buscando esclarecer os fatores relacionados.

\*Ferreira, F.A.- Departamento de Fitopatologia Universidade Federal de Viçosa

## **2.4 Qualidade do café e sua determinação**

A qualidade de um produto pode ser definida como sua capacidade de satisfazer os desejos e necessidades do consumidor (Shewfelt, 1999). Em pesquisas com alimentos, entretanto, esta qualidade deve ser medida da forma mais precisa possível, o que nem sempre é tarefa simples. No caso da pesquisa com café, esta questão apresenta variáveis bem definidas: o sistema oficial de classificação, incluindo a prova de xícara e classificação por tipos, e os testes laboratoriais de determinação da qualidade. A prova de xícara divide o café em seis classes de acordo com o sabor e odor da bebida, avaliados por provadores treinados. E a sua grande limitação seria a subjetividade do método, exigindo um

maior número de repetições das provas (painel de provadores) e a utilização de indivíduos altamente treinados. Quando se pensa em testes laboratoriais para a determinação da qualidade do café, as possibilidades são variadas, como polifenoloxidase, teor de açúcares e condutividade elétrica. O teste de condutividade elétrica é baseado na condutividade elétrica de uma solução de solutos citoplasmáticos lixiviados do grão e pode indicar danos provocados por microrganismos aos grãos de café, devido às evidências de que estes alteram a integridade das membranas (Prete, 1992). Um dos testes mais promissores para determinação da qualidade do café é o que determina a atividade da enzima polifenoloxidase, sendo sua relação com os diferentes tipos de bebida já bem estabelecidas (Carvalho et al., 1994). A polifenoloxidase é uma enzima cúprica, localizada principalmente nos vacúolos e tem como uma das funções resposta à interação da planta com microrganismos (Whitaker, 1995).

Além dos testes químicos e sensoriais (prova de xicara) relacionados à determinação das qualidades organolépticas do produto, outros relacionados à segurança do produto, como presença de micotoxinas e resíduos de agrotóxicos, são complementares na definição da qualidade do produto.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Isolamento e Identificação de Isolados de *Cladosporium* .

##### 3.1.1 Isolados

Foram obtidos 16 isolados de *Cladosporium* de diferentes substratos e metodologias de obtenção, conforme apresentado na tabela 2.

TABELA 2 Características dos isolados de *Cladosporium*

Isolado	Local	Substrato	Metodologia
RT1	Lavras, MG	Grão	Blotter test
RT2	Lavras, MG	Grão	Bloter test
RT3	Lavras, MG	Ar	Plaqueamento direto
RT4	Piumhi, MG	Folha	Plaqueamento direto
RT5	Lavras, MG	Fruto	Bloter test
RT6	Lavras, MG	Fruto	Lavagem
RT7	Lavras, MG	Solo	Diluição em série
RT8	Perdões, MG	Folha	Plaqueamento direto
RT9	Lavras, MG	Solo	Diluição em série
RT10	Lavras, MG	Fruto	Lavagem
RT11	Perdões, MG	Solo	Diluição em série
RT12	Boa Esperança MG	Fruto	Lavagem
RT13	Lavras, MG	Fruto	Blotter test
RT14	Lavras, MG	Folha	Plaqueamento direto
RT15	Perdões, MG	Folha	Plaqueamento direto
RT16	Lavras, MG	Fruto	Bloter test

### **3.1.2 Isolamentos**

#### **3.1.2.1 Frutos**

##### **Blotter test**

Cinco frutos de café foram lavados em água corrente e, logo após, depositados em placas de petri 9 cm contendo três folhas de papel de filtro embebidas com uma solução de ágar água 1% esterilizada e incubadas a temperatura ambiente.

##### **Suspensão de frutos**

Quinze frutos foram imersos em 500 ml de água destilada contendo 0,005% de Tween 80 e submetidos à agitação durante 30 minutos. Amostras de 0,5 ml da suspensão obtidas de duas diluições seriadas foram distribuídas em três placas de Petri contendo meio MA2. As placas foram incubadas a temperatura ambiente.

#### **3.1.2.2 Grãos**

##### **Blotter test**

Amostras de dez grãos de café, em condições assépticas, foram dispostas em placas de Petri de 15 cm contendo três folhas de papel de filtro umedecidas em solução de ágar água 0,5%. Estas placas foram incubadas à temperatura ambiente.

### **3.1.2.3 Folhas**

#### **Plaqueamento direto**

Cinco fragmentos (0,5 cm<sup>2</sup>) da folha sofreram desinfecção superficial sendo depositados em solução de hipoclorito de sódio (0,5%) por dois minutos. Após desinfecção superficial, os fragmentos foram transferidos, em condições assépticas, para placas de Petri contendo meio ágar água e colocadas a incubar à temperatura ambiente.

### **3.1.2.4-Solo**

#### **Diluição em série**

Foi coletado, de forma aleatória, nos cafezais 1 kg de solo de camada superior (0 a 5 cm) localizado na projeção da copa café. Amostras de 10g de solo foram suspensas em 100 ml de água destilada esterilizada contendo 2 g de ágar/1000ml e submetidas à agitação mecânica durante 20 minutos, com a finalidade de promover a homogenização da suspensão. Logo após foram feitas diluições em série com agitação de um minuto entre elas. Foram estabelecidas diluições de 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup> para isolamento de fungos. De cada uma dessas diluições pipetou-se alíquotas de 0,5 ml que foram colocadas em placa de Petri sobre meio MA2 e espalhados com alça de drigalsk. As placas foram incubadas a temperatura ambiente.

### **3.1.2.5 Ar**

#### **Plaqueamento direto**

Placas com meio DG18 foram abertas a aproximadamente 1 metro de altura entre as linhas do cafezal por 10 minutos. Após a incubação, à temperatura ambiente, procedeu-se ao isolamento direto do fungo.

### **3.1.3 Isolamento**

Após o período de incubação, esporos do fungo foram transferidos com uma agulha de vidro para placas de Petri contendo meio MA2 e incubados à temperatura ambiente.

### **3.1.4 Identificação**

Os isolados foram transferidos para meio MA2, onde foram observadas as características macroscópicas como cor e textura da colônia e taxa de crescimento. Posteriormente, os isolados foram repicados para meio SNA e incubados a 25° C por 10 dias. Diretamente das placas foram retirados blocos de meios colonizados pelo fungo de 1x1 cm depositados sobre as lâminas. Sobre os blocos foi depositado uma gota de água + glicerina (1:1) cobrindo-se com lamínula. Em microscópio óptico com objetiva de 40x foram tomadas as medidas, observando-se o formato dos conídios, conidióforos.

## **3.2 Tratamentos Pré-colheita de frutos de café e dinâmica de *Cladosporium cladosporioides* no campo.**

### **3.2.1 Local e Cafeeiros**

O trabalho foi conduzido numa fazenda cafeeira, no município de Perdões, MG, na comunidade conhecida como Ponte do Funil, situada a 995 metros de altitude e localização 21° 06 S e 45°00 W determinados com aparelho de GPS. As plantas de café utilizadas foram da cultivar Catuaí com aproximadamente 12 anos de idade, em espaçamento 1,0 x 2,5 m. O talhão recebeu todos os tratamentos fitossanitários e culturais.

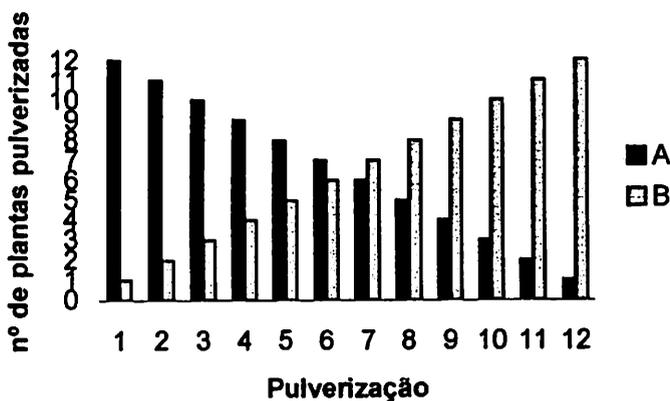
### **3.2.2 Isolados e suspensões**

Foi utilizada nos experimentos uma mistura de quatro isolados de *Cladosporium cladosporioides* isolados de folha, ar, fruto e grão do cafeeiro na região de Lavras. O isolamento foi feito plaqueando-se diretamente em ágar água o substrato, incubação à temperatura ambiente e repicagem do fungo diretamente da colônia esporulada para meio MA2.

Para produção do inóculo, 30 g de grãos de arroz beneficiado passaram por uma lavagem superficial com água, cozimento em água destilada (uma vez e meia o volume de arroz) no microondas em potência média por vinte minutos e autoclavagem a 121°C por 30 minutos em frascos de vidro. Este substrato foi então inoculado com fragmentos de colônias do fungo cultivados em MA2, e incubado à temperatura ambiente. Após quatro a cinco dias de incubação, foram vertidos 100 mL de água no frasco com uma gota de tween 80 e agitou-se em agitador de tubo para liberação dos conídios. A suspensão foi coada em gaze, ajustando-se a concentração para  $5 \times 10^6$ .

### **3.2.3 Pulverizações**

Foi pulverizado o terço médio das plantas de café com a suspensão de conídios utilizando-se um pulverizador marca pré-pressurizado com vazão de 0,3 L/min., com um volume aproximado de 300 ml por planta. As pulverizações tiveram início na segunda quinzena de outubro de 2001, com os frutos do cafeeiro no estágio de chumbinho e estenderam-se até maio de 2002, conforme o esquema apresentado na figura 1.



A= Decrescente a partir de outubro B=Crescente a partir de outubro

FIGURA 1- Esquema temporal das pulverizações no cafeeiro

### 3.3.4-Avaliações

Foi avaliada mensalmente a incidência de *Cladosporium cladosporioides*, tanto na microbiota externa de quinze frutos por parcela por meio de plaqueamento direto dos frutos em meio MA2, quanto na interna através de desinfecção com NaOCl 5% por 5 minutos e corte dos grãos no sentido longitudinal e posterior plaqueamento em meio MA2. Após colhidos os frutos, o tratamento que recebeu todas as pulverizações, testemunha e os tratamentos com duas pulverizações no início e duas no fim do experimento foram processados conforme metodologia adaptada de Frank (2000). Os frutos foram secos em terreiro de cimento até atingirem 12% de umidade, e os grãos beneficiados passaram por teste de xícara e atividade da polifenoloxidase. Os resultados foram enquadrados na classificação química proposta por Carvalho et al. (1994).

### **3.3 Tratamento pós-colheita de frutos de café com *Cladosporium cladosporioides***

#### **3.3.1 Soluções e suspensões**

Colônias puras de *Cladosporium cladosporioides* foram obtidas após o cultivo durante sete dias em placas de Petri de 9 cm de diâmetro contendo meio MA2. Após este período foram acrescentadas 5 ml de água destilada nas placas e procedeu-se à raspagem dos conídios com o auxílio de alça de platina. Esta suspensão foi vertida através de uma gase para um becker. A partir de uma aliquota, determinou-se a concentração de esporos em hemacitômetro e procedeu-se ao ajuste da suspensão para  $5 \times 10^6$  conídios/ml. A solução de hipoclorito de sódio utilizada foi preparada no momento do experimento na concentração de 1%.

#### **3.3.2-Café**

Foram utilizados frutos de cafeeiro da espécie *Coffea arabica* cultivar Catuaí com aproximadamente 12 anos de idade, derriçados manualmente sobre “pano”. Os frutos eram procedentes de uma propriedade localizada a 995 metros de altitude, e a 21° 06 S e 45°00 W, no município de Perdões MG na comunidade Ponte do Funil. O manejo da propriedade é o convencional com nível tecnológico de médio a alto.

#### **3.3.3-Tratamentos**

A imersão dos frutos, tanto para suspensão fúngica quanto para NaOCI foi feita durante 5 minutos em agitação constante em betoneira elétrica de construção civil.

As pulverizações diárias foram feitas com pulverizador manual pré pressurizado, com vazão de 0,3L/min em baixo volume, para não comprometer a secagem dos grãos.

Os frutos foram submetidos aos tratamentos constantes na tabela 3.

**TABELA 3** Tratamentos do frutos de café em pós-colheita.

Tratamento	Procedimento
1	Imersão na suspensão de conídios logo após a colheita
2	Imersão na suspensão de conídios logo após a colheita + pulverização diária com suspensão de conídios
3	Tratamento com hipoclorito de Na e imersão na suspensão de conídios logo após a colheita
4	Tratamento com hipoclorito de Na e imersão na suspensão de conídios logo após a colheita + pulverização diária com suspensão de conídios
5	Tratamento com hipoclorito de Na
6	Sem pulverização ou imersão

A secagem dos grãos foi feita em terreiro de cimento segundo Carvalho et al., (1997) até os grãos atingirem o teor de umidade de 11,5 %.

### 3.3.4 Análises

A avaliação da ocorrência e frequência dos fungos por tratamento foi feita a cada 3 dias, com plaqueamento direto dos grãos do terreiro em meio ágar-água, observação em lupa da formação de colônias e posterior identificação. O tamanho da amostra foi de dez frutos por tratamento com três repetições.

A identificação da micoflora do café foi feita três meses após o beneficiamento por meio do plaqueamento direto dos grãos em meio DG 18 e observação das colônias após sete dias. O tamanho da amostra foi de dez grãos por tratamento com cinco repetições.

Foram coletadas de cada parcela quatro subamostras de cinco litros de café em coco que foram beneficiadas e enviadas ao laboratório de qualidade do café da EPAMIG para realização das análises de atividade da polifenoloxidase, lixiviação de potássio, condutividade elétrica, umidade e prova de xícara.

O delineamento experimental foi o de blocos casualizados com quatro repetições e as médias foram submetidas ao teste Scott-Knott (1974) a 95% de confiança.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1.- Caracterização e identificação de *Cladosporium* associado ao cafeeiro.

De acordo com as características dos isolados trata-se de *Cladosporium cladosporioides*, já relatados por Ellis, 1971 e Domsch et al 1993. As características distintivas que mais auxiliam na identificação desta espécie são a cicatriz proeminente nos conídios, conidióforos sem nódulos, conídios sem septos ou com apenas um septo e, principalmente, o formato do conídio elipsoidal ou limoniforme.

#### 4.1.1 Características microscópicas

Os isolados obtidos apresentaram dimensões conforme descritas na tabela 4.

TABELA 4 Quadro comparativo das estruturas microscópicas dos 16 isolados de *C. cladosporioides* identificados.

Isolado	Conídio $\mu$	Ramo - Conídio $\mu$	Conidióforo $\mu$
RT1	7x4	15x2	88
RT2	6x4	29x5	245
RT3	5x3	20x5	37
RT4	5x4	25x5	61
RT5	6x5	18x4	74
RT6	9x5	15x2	54
RT7	6x4	20x5	98
RT8	7x3	15x5	98
RT9	4x2	15x2	98
RT10	5x2	17x2	118
RT11	7x5	32x2	110
RT12	6x5	15x7	135
RT13	5x3	24x5	147
RT14	5x4	29x2	98
RT15	6x3	24x5	100
RT16	5x3	27x5	86



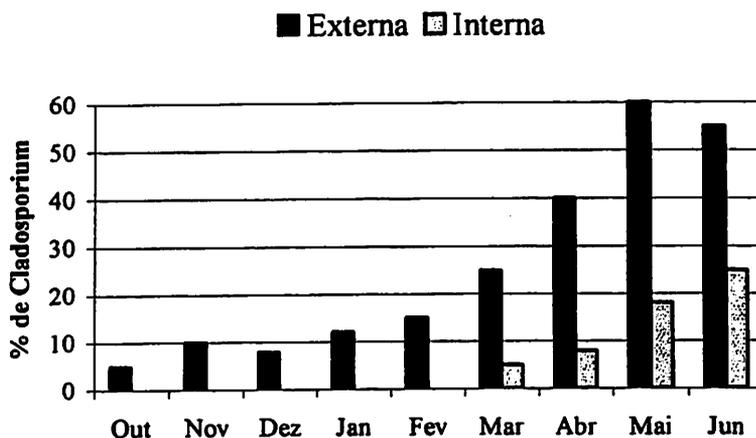
elipsoidal ou limoniforme, sendo raramente encontrado conídios com formato globoso ou subgloboso. *Cladosporium cucumerinum* é também morfológicamente semelhante a *C. cladosporioides*, podendo ser diferenciado pela sua associação e patogenia a plantas da família cucurbitáceas. *Cladosporium tenuissimum* apresenta similaridades com *C. cladosporioides* mas seus conidióforos são muito longos com até 800  $\mu$ .

#### **4.2- Tratamento pré-colheita de frutos de café com *Cladosporium cladosporioides*.**

##### **4.2.1- Dinâmica de *Cladosporium cladosporioides*, interna e externamente em frutos de café.**

A dinâmica de *Cladosporium cladosporioides* é típica dos fungos saprófitas. Externamente, o fungo ocorre sobre o fruto durante todas as fases do desenvolvimento. Inicialmente, nos meses de outubro até março, com os frutos nos estágios de chumbinho até verde cana, esta colonização é menos intensa, não excedendo os 25% do frutos. Este fato, segundo Pimenta (1995), se deve principalmente à presença de produtos fenólicos no fruto, como o tanino que apresenta ação fungitóxica. A partir do mês de abril a colonização começa a se acentuar atingindo o índice máximo nos meses de maio e junho, quando o café já se encontra em estado de maturação avançado(cereja). Figura 3. Estas observações coincidem com as de Alves (1996), que relatou *Cladosporium* colonizando além das cerejas os frutos no estágio de passa. Internamente o fungo começa a se manifestar a partir de março quando o fruto inicia sua maturação, a partir do mês de abril o fungo é encontrado facilmente na comunidade interna do grão. A maioria dos grãos utilizados para a análise não apresentava qualquer sintoma de lesão fúngica, o que pode evidenciar o caráter endofítico de *Cladosporium cladosporioides*. Pereira (1993) relata, em folhas de helicônias *Cladosporium* como um endofítico facultativo, encontrado

principalmente quando as folhas iniciam a senescência. Este fato também foi verificado em folhas de café por Chaves (2002). A não detecção de *Cladosporium cladosporioides* nas fases iniciais de desenvolvimento dos frutos pode estar relacionada ao impedimento de sua manifestação, pela inibição pelo próprios compostos do fruto, ou pela presença de outros como fungos como *Phoma jolyana* que estava presente na maioria dos grãos em estágio verde cana.



**FIGURA 3-** Frequência de *Cladosporium cladosporioides* na comunidade interna e externa de frutos de café.

#### 4.2.2 Avaliação sensorial e química das amostras

Os tratamentos que receberam pulverizações no início de outubro, diminuindo a intensidade até a colheita, apresentaram 75% das parcelas tratadas com uma bebida classificada de mole/apenas mole. 67% destes tratamentos receberam seis ou mais pulverizações ao longo do período. A prova de xícara das amostras mostrou que 50% das parcelas tratadas obtiveram bebidas de apenas mole até mole, tendo 83% destas parcelas recebido mais que seis pulverizações. Nas parcelas tratadas ao final da safra, não houve diferença

quanto à classificação química da bebida, sendo todas enquadradas na categoria dura. Com relação à prova de xícara, 33% dos cafés tratados foram classificados como apenas mole e receberam um número de pulverizações variando de duas até doze. Figura 4 e Tabela 5.

Os frutos expostos a altas umidade e temperaturas nas fases finais da maturação tendem a sofrer fermentação butírica e propiônica pelos microrganismos. Estas fermentações são a principal causa da formação dos gostos estranhos no café, dando origem às bebidas do tipo rio e riado (Cortez, 1994). O histórico da área onde o experimento foi instalado, era de produção em anos anteriores de bebidas do tipo rio e riado, sendo, inclusive secado separadamente no terreiro. Na safra 2001/2002, as condições climáticas no período que antecedeu a colheita foram bastante favoráveis a produção de bons cafés, apresentando baixa umidade relativa do ar em consequência da baixa pluviosidade no período, segundo dados fornecidos pela estação climatológica de Lavras. O efeito esperado de *C. cladosporioides* nas condições que propiciassem este tipo de fermentação seria o de competição por nutrientes e espaço com os outros microrganismos, reduzindo ou inibindo as fermentações butírica e propiônica.

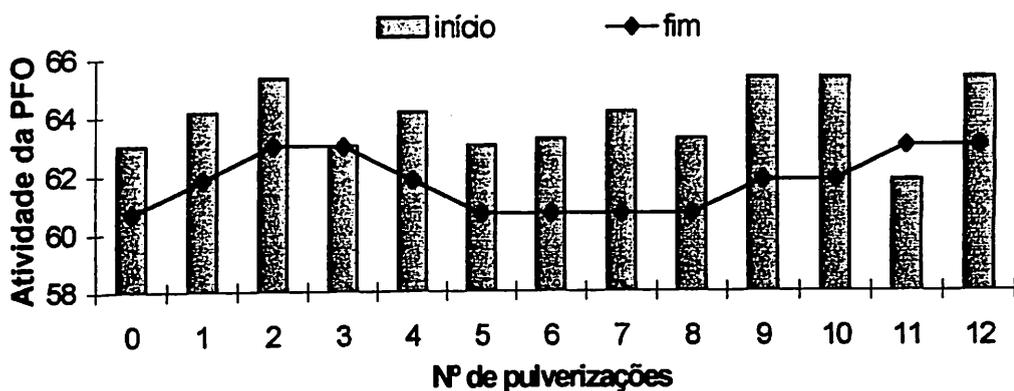


FIGURA 4 Atividade da polifenoloxidase em grãos de café tratados com com *Cladosporium cladosporioides* no início da floração e no final da maturação em diferentes intensidades. Lavras-MG 2002

TABELA 5 Avaliação química e sensorial de grãos de café tratados com *Cladosporium cladosporioides* no início da floração e no final da maturação em diferentes intensidades. Lavras, MG, 2002

Época de Pulverização						
NºPul	Início			Fim		
	PFO	CQ	PX	PFO	CQ	PX
0	62.99	D	D	60.66	D	D
1	64.16	M/AM	D	61.83	D	D
2	65.33	M/AM	AM	62.99	D	AM
3	62.99	D	D	62.99	D	AM
4	64.16	M/AM	D	61.83	D	D
5	62.99	D	D	60.66	D	D
6	63.23	M/AM	AM	60.66	D	D
7	64.16	M/AM	D	60.66	D	AM
8	63.23	M/AM	AM	60.66	D	D
9	65.33	M/AM	AM	61.83	D	D
10	65.33	M/AM	M	61.83	D	D
11	61.83	D	D	62.99	D	D
12	65.33	M/AM	AM	62.99	D	AM

PFO: Polifenoloxidase; CQ: Classificação Química; PX: Prova de xicara

### 4.2.3 Avaliação microbiológica das comunidades fúngicas de grãos tratados com *Cladosporium cladosporioides* na fase pré-colheita.

A avaliação das comunidades fúngicas nos tratamentos que receberam níveis de pulverizações diferentes não mostra diferenças significativas entre os tratamentos, a não ser para o tratamento que recebeu 11 pulverizações no início da safra, no qual *C. cladosporioides* se estabeleceu em uma menor intensidade. Tabela 6. Estes valores reforçam ainda mais a hipótese de que o ambiente no qual o experimento foi conduzido, não criou condições para colonização mais intensa de nenhuma comunidade fúngica em detrimento de outra. A intensidade das pulverizações não teve efeito sobre a colonização do fungo, sendo as comunidades semelhantes tanto em tratamentos que receberam dez pulverizações quanto nos que não foram pulverizados.

TABELA 6 Comunidades fúngicas externas (x) e do mesocarpo (m) de frutos de café tratados com *C. cladosporioides* no início da floração e no final da maturação em diferentes intensidades. Lavras, MG, 2002.

Comunidade	Nº de pulverizações							
	2-final		11-início		10- início		0	
	x	m	x	M	x	M	X	M
AO	1500*	1750	5000	2750	1250	1500	2250	2000
AFL	350	500	1250	1000	750	1250	1000	750
PEN	2750	1500	750	1000	2500	1250	2000	1500
ANI	500	300	1500	750	500	750	750	250
CLA	7250	750	1250	1750	7250	750	6000	750

\*UFC/fruto

A comunidade fúngica interna dos grãos tratados também não variou, nos tratamentos analisados, conforme dados da Tabela. 7. Um fato importante na comunidade fúngica interna foi a obtenção de amostras infectadas com *Aspergillus ochraceus* em até 55% dos grãos. Os frutos foram coletados sem

nenhum contato com ambientes que são as prováveis fontes de contaminação destes fungo como o solo, chão do terreiro, equipamentos etc. demonstrando que a associação do fungo com o fruto ocorre em fases anteriores a colheita, provavelmente com o grão ainda verde. Estes comportamento pode ainda ser extrapolado para os outros fungos relatados como *Aspergillus flavus*, *A. niger* e *Penicillium*. *Cladosporium cladosporioides* não apresentou efeito sobre *A. ochraceus* e os outros fungos devido a atuação destes serem em faixas de umidade distinta, como foi discutido para os fungos de terreiro.

TABELA 7 Porcentagem de fungos associados internamente aos grãos de café tratados com *C. cladosporioides*.

Tratamentos	Fungos				
	AO*	AFL	PEN	ANI	Cla
2-final	55	20	32.5	20	10
11-início	25	15	22.5	12.5	10
10-início	20	12.5	25	12.5	5
0	47.5	20	27.5	17.5	15

AO: *Aspergillus ochraceus*; AFL: *A. flavus*; PEN: *Penicillium*; CLA: *C. cladosporioides*

### 4.3 Tratamento pós-colheita de frutos de café com *Cladosporium cladosporioides*

#### 4.3.1 Sucessão fúngica no terreiro

No levantamento inicial da micobiota do café utilizado no experimento (1ª avaliação), *Cladosporium cladosporioides* apresentou frequência variável de 33,3% à 73,3% dentro dos tratamentos, estes valores coincidem com os encontrados por Silva (2000), Fernandes(2000) e Alves(1996) que verificaram frequências de 40% à 60%. Não houve diferença significativa entre os tratamentos. Porém nos tratamentos inoculados com *C. cladosporioides* por meio de pulverização houve tendência de aumento na rapidez de colonização nos primeiros três dias. Subseqüentemente ocorreu a uniformização na

freqüência do fungo. O tratamento no qual os frutos de café foram imersos e pulverizados com *C. cladosporioides*(T2) foi o que apresentou, juntamente com a testemunha, a menor freqüência inicial de *C. cladosporioides*. Porém, após o terceiro dia, a freqüência aumentou em 240%, mostrando uma capacidade do inóculo de acelerar o processo de colonização dos frutos de café. A freqüência de *Fusarium*, *Penicillium* e *Rhizopus* não foi afetada pelos tratamentos em nenhuma das avaliações. Tabela 8.

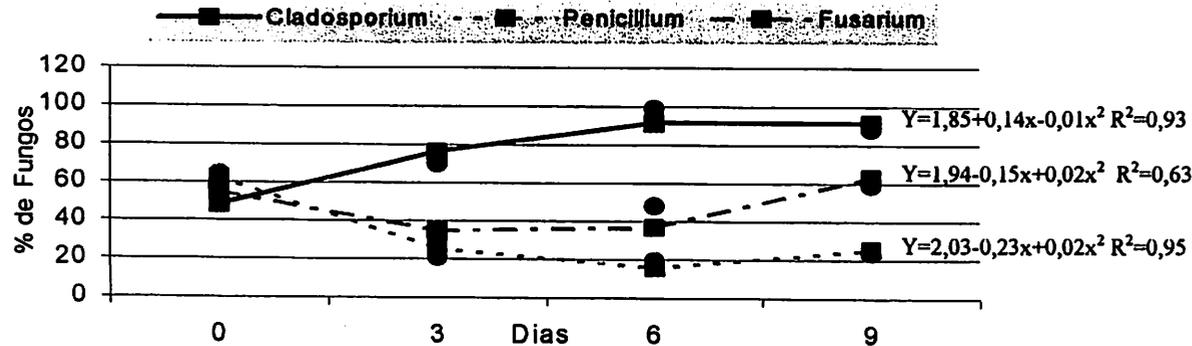
Com relação à freqüência dos fungos no tempo houve diferença significativa entre as avaliações. Foi possível estabelecer um modelo que mostrasse a dinâmica de *C. cladosporioides*, *Penicillium* e *Fusarium* com  $R^2$  de 0,93, 0,94 e 0,62 respectivamente. Figura 5. O crescimento e esporulação dos fungos está ligado a fatores ambientais como temperatura, oxigênio e atividade de água ( $a_w$ ) (Filtenborg et al., 2000). Nas condições do experimento, temperatura e oxigênio permaneceram aproximadamente constantes, sendo o fator principal de aumento ou diminuição da freqüência dos fungos o  $a_w$ . Assim, os modelos demonstraram uma tendência de diminuição da freqüência de *Fusarium* e *Penicillium*, à medida que os frutos perdiam água e um aumento de *C. cladosporioides*, provavelmente devido a sua capacidade de sobrevivência em ambientes mais xerofilicos em relação as espécies de *Fusarium* e *Penicillium* quantificadas.

**TABELA 8** Micobiota percentual associada a frutos de café submetidos a tratamentos na fase Pré-colheita com *Cladosporium cladosporioides*. Lavras, MG, 2002.

Ava	Fungos															
	<i>C. cladosporioides</i>				<i>Penicillium</i>				<i>Fusarium</i>				<i>Rhizopus</i>			
	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>
1	73,3a**	73,3a	93,3a	73,3a	60,0a	20,0a	26,7a	46,7a	60,0a	40,0a	73,3a	46,7a	0,0 a	0,0a	33,3a	20,0a
2	33,3a	80,0a	100a	86,7a	73,3a	13,3a	33,3a	33,3a	33,3a	0,0 a	40,0a	60,0a	13,3a	0,0a	66,7a	6,7a
3	60,0a	100 a	100a	100a	53,3a	53,3a	13,3a	20,0a	73,3a	33,3a	53,3a	73,3a	0,0 a	0,0a	40,0a	0,0a
4	66,7a	66,7a	100a	100a	53,3a	6,7a	26,7a	20,0a	66,7a	60,0a	33,3a	80,0a	26,7a	0,0a	40,0a	20,0a
5	46,7a	80,0a	100a	80,0a	93,3a	26,7a	13,3a	13,3a	60,0a	6,7 a	60,0a	46,7a	0,0 a	0,0a	0,0 a	0,0a
6	33,3a	40,0a	100a	100a	60,0a	20,0a	26,7a	26,7a	73,3a	26,7a	46,7a	60,0a	13,3a	0,0a	6,7 a	33,3a

\*Detalhes Tabela 2

\*\*Números seguidos da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste Scott-Knott(1974) a 95% de confiança



**FIGURA 5** Percentual de fungos no terreiro em frutos de café tratados com *C. cladosporioides*. Lavras-MG, 2002.

### 4.3.2 Avaliação sensorial e química das amostras

Os frutos de café que receberam imersão e pulverização diária com *C. cladosporioides* apresentaram uma maior atividade da enzima polifenoloxidase, sendo classificados quimicamente como de bebida mole a apenas mole. Segundo Carvalho et al. (1994), a atividade desta enzima está ligada a interações do grão com microrganismos. Assim, o provável efeito do fungo em contato diário com o grão seria o de oferecer proteção as injúrias no fruto provocada por fungos preservando a qualidade do mesmo. Na avaliação da condutividade elétrica os tratamentos onde se usou o NaOCl foram os que apresentaram um a maior condutividade. Quanto à prova de xícara, não houve diferença significativa entre os tratamentos, sendo todas classificadas como dura. Este tipo de análise envolve subjetividade do provador treinado, sendo o limite entre um duro e um apenas mole as vezes muito sutil. Isso pode sugerir que o tratamento dois possa ter oferecido uma bebida de qualidade, com melhor sabor e aroma como foi detectado na avaliação química. Vale frisar, ainda, que as condições climáticas do período de secagem foram próximas ao ideal, com índice pluviométrico nulo, alta insolação e baixa umidade relativa, o que favoreceu muito a obtenção de bebidas de boa qualidade. Provavelmente uma secagem em condições adversas poderia evidenciar o efeito de *C. cladosporioides*. Quanto a lixiviação de potássio, nenhum tratamento apresentou diferença significativa da testemunha.

Tabela 9.

**TABELA 9** Análise química e sensorial dos grãos de café tratados na fase pós-colheita com *Cladosporium cladosporioides*. Lavras, MG, 2002.

TRATAMENTO	Avaliações				
	Lixiviação de potássio	Condutividade elétrica	PFO	Classificação Química	Prova de Xicara
1-Imersão*	58.52 a	180.22 a	59.90 a	Dura	Dura
2-Imersão + pulverização	57.93 a	174.83 a	63.60 b	Mole	Dura
3-HOCl + imersão	58.15 a	198.07 b	60.22 a	Dura	Dura
4-HOCl+imersão+ pulverização	56.48 a	189.54 b	61.09 a	Dura	Dura
5-HOCl	59.73 a	198.21 b	59.20 a	Dura	Dura
6-Testemunha	57.96 a	173.94 a	61.50 a	Dura	Dura

#### 4.3.3 – Avaliação microbiológica dos grãos beneficiados de café tratados com *Cladosporium cladosporioides*

A frequência de *Aspergillus ochraceus* não diferiu da testemunha somente no tratamento T4. Conforme dados da tabela 10 Nos demais tratamentos houve redução significativa na frequência do fungo, sendo menor a frequência no tratamento 5, seguido do 1, 3 e 2. Para *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus glaucus* e *Penicillium* não houve diferença significativa entre os tratamentos. Exetquando-se o tratamento 4, todos os tratamentos apresentaram incidência de *Wallemia sebi*, em frequência variável, destacando-se que sua associação foi inversamente proporcional a *Aspergillus ochraceus*. Figura 7. *Cladosporium cladosporioides* apresentou uma frequência muito baixa em todas as amostras, diferindo dos resultados de Silva (2000) e Freitas (2000). Christensen & Kaufmann (1969) relatam que, em sementes, alguns fungos tendem a diminuir sua incidência de acordo com o tempo de armazenamento, principalmente se as condições de umidade não forem favoráveis. Essa provavelmente seja é a nossa situação onde foi encontrado

*Aspergillus glaucus* e *Wallemia sebi* nas amostras organismos que sobrevivem em condições de xerofilia.

TABELA 10 Frequência percentual de fungos associados ao café beneficiado tratado com *Cladosporium cladosporioides* na pós-colheita. Lavras, MG, 2002

		FUNGOS						
		AO	ANI	PEN	AFL	WS	AG	CLA
Tratamentos	1-Imersão	54 b	12 a	2 a	18 a	98 c	0 a	0 a
	2-Imersão + pulverização	62 b	6 a	18 a	8 a	32 b	0 a	2 a
	3-HOCl + imersão	48 b	36 a	18 a	6 a	88 c	2 a	4 a
	4-HOCl+imersão+ pulverização	80 c	16 a	6 a	30 a	0 a	2 a	0 a
	5-HOCl	28 a	16 a	8 a	8 a	96 c	2 a	0 a
	6-Testemunha	96 c	6 a	8 a	4 a	6 a	2 a	0 a

AO: *Aspergillus ochraceus*; ANI: *A. niger*; PEN: *Penicillium*; AFL: *A. flavus*; WS: *Wallemia sebi*; AG: *A. glaucus*; CLA: *Cladosporium*

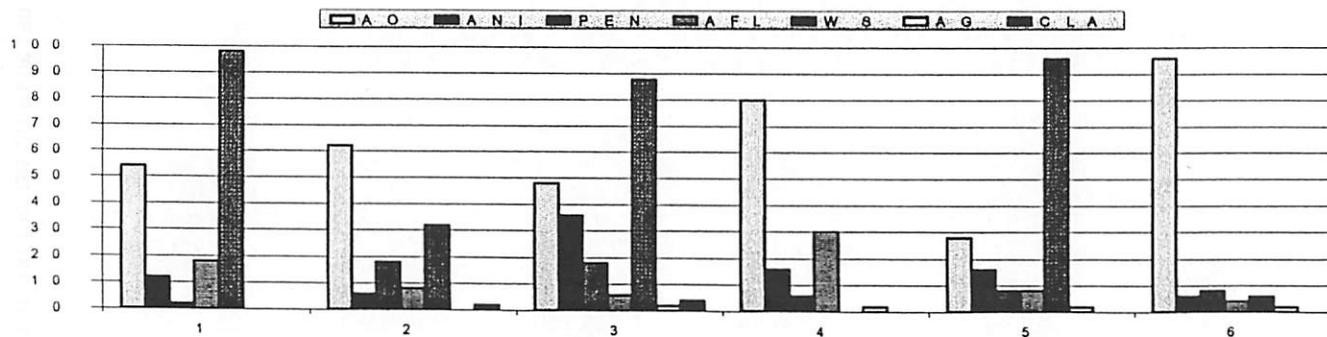


FIGURA 7 Frequência percentual de fungos nos tratamentos. Lavras, MG, 2002

## 5 CONCLUSÕES

- *Cladosporium cladosporioides* é a espécie de *Cladosporium* associada ao cafeeiro
- Nas condições em que o trabalho foi conduzido os tratamentos pré-colheita e pós-colheita dos frutos de café com *C. cladosporioides* não alteraram a população fúngica dos grãos de café, as características químicas verificadas assim como as organolépticas.

## **6 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O estudo das relações entre os fungos com o fruto ainda no campo tem se mostrado como um campo promissor para a elucidação dos fatores que afetam a qualidade do café. Este fato sugere que estudos futuros da sucessão dos fungos no fruto ainda no campo pode fornecer subsídios para a proposição de práticas que favoreçam a obtenção de cafés de bebidas e qualidade superior.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

BITANCOURT, A.A. **As ferramentas e podridões da cereja do café.** *Boletim da Superintendência dos Serviços do Café*, São Paulo. v.32, n.359, p.7-14, jan. 1957.

BOYSEN, M.E.; BJÖRNEHOLM,S.; SCHNÜRER,J. **Effect of the biocontrol yeast *Pichia anomala* on interactions between *Penicillium roqueforti*, *Penicillium carneum*, and *Penicillium paneum* in moist grain under restricted air supply.** *Postharvest Biology and Technology*, Georgia, v. 19, p. 173-179, 2000.

CARVALHO, V. de. et al. **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. 449-454, 1994.

CARVALHO, V.D. de. et al. **Efeito do tipo de colheita e local de cultivo na composição físico-química e química do grão beneficiado.** In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 15., 1989a, Maringá. **Resumos...** Rio de Janeiro: MIC/IBC. 1989a. p. 23-24.

CARVALHO, V.D. de.; CHALFOUN, S.M.; CHAGAS, S.J. de R. **Relação entre classificação de café pela bebida e composição físico-química e química**

do grão beneficiado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 15., 1989b, Maringá. **Resumos...** Rio de Janeiro: MIC/IBC, 1989b. p. 25-26.

CASTORA, R. et al. *Aureobasidium pullulans* (LS-30) an antagonist of postharvest pathogens of fruits: study on its modes of action Postharvest Biology and Technology, Department of Animal. **Plant and Environmental Science**, Campobasso, Italy, v. 22, p.7-17, 2001.

CHAVES, R.C.; PEREIRA, R.T.G.; CASTRO, H.A. Obtenção de isolados de *Cladosporium* com potencial de biocontrole Pós colheita. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFLA, 15., 2002, Lavras. **Anais ...** Lavras: UFLA, 2002. p.191.

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

COOK, R.J. Biological control of the pathogens: theory to application. **Phytopathology**, St. Paul, v.75, n. 1, p.25-29, 1985.

CORTEZ, J.G. Aptidão climática para qualidade da bebida nas principais regiões cafeeiras de Minas Gerais. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.18, n.187, p. 27-31, 1994.

DOMSCH, K.H. ; GAMS, W. **Compendium of soil fungi.** vl.: Federal Republic of Germany: IHV-Verlag. 1993. 859 p.

ELLIS, M.B. **Dematiaceous Hyphomycetes.** CAB: Wallingford UK. 1971. 608 p.

ELLIS, M.B. **More Dematiaceous Hyphomycetes**. CAB: Wallingford UK. 1976. 507 p.

FERNANDES, N. L. **Incidência e controle de populações fúngicas associadas a qualidade de bebida de café ( *Coffea arabica* L ) na região da Zona da Mata de Minas Gerais**. 2000. 62p. Tese (Mestrado em Fitotecnia)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

FERREIRA, F. A. **Patologia Florestal: Principais doenças florestais no Brasil**. Viçosa: SIF, 1989. 570p.

FILTENBORG, O; FRISVAD, J.C; SANSON, R.A. Specific association of fungi to foods and influence of physical environmental factors. In: SANSON et al. **Introduction to food and airborne fungi**. Wageningen: CBS, 2000. 389p.

FRANK, J. M. **Handbok of micological methods, enhancement of coffee quality project**. London: FAO, 2000. 15 p.

FREITAS, R. F. **Fungos associados à grãos de café ( *Coffea arabica* L. ) beneficiados de diversos municípios da região sul de Minas Gerais**. 2000. 72p. Tese (Mestrado em Microbiologia dos Alimentos)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

ILLY, E. O mestre dos sabores. In: ILLY, E. **Panorama rural**. São Paulo: Abimaq. 2000. p. 74-79.

KIRK, P.M. ; CANNOM, P. F. et al. **Dictionary of the fungi**. London: CABI, 2001. 655p.

KRETZSCHMAR. A. A. Controle biológico de patógenos que ocorrem em pós-colheita. In: BETTIOL, W. **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA – CNPDA, 1991. p. 53-69.

KRUG, H. P. Cafés duros I. **Revista do Instituto de Café do Estado de São Paulo**, Campinas, v. 15, n. 159, maio 1940a.

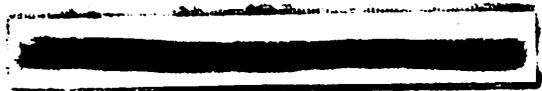
KRUG, H. P. Cafés duros II. **Revista do Instituto de Café do Estado de São Paulo**, Campinas, v.15, n. 163, p. 1393-1396, set. 1940b.

KRUG, H. P. Cafés duros III. **Revista do Instituto de Café do Estado de São Paulo**, Campinas, v. 15, n. 165, nov. 1940c.

LEVERENTZ, B.; JANISIEWICZ, W.J.; CONWAY, W S. Combining yeasts or a bacterial biocontrol agent and heat treatment to reduce postharvest decay of 'Gala' apples. **Biology and Technology**, v. 21, p. 87-94, 2000.

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

MISLIVEC, P.B.; BRUCE, V.R. ; GIBSON, R. Incidenci of toxigenic and other molds in green coffee bean. **Journal of Food Protection**, Washington, v. 46, n.11, p. 969-973, nov. 1983.



PEREIRA, J.A. **Fungos endofíticos dos hospedeiros tropicais *Stylosanthes guianensis* e *Musa cavendish***. 1993. 135p. Tese (Doutorado em Fitopatologia)-Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

PIMENTA, C. J. **Qualidade do café (*Coffea arabica* L.) originado de frutos colhidos em quatro estádios de maturação**. 1995. 94p. Dissertação (Mestrado Ciência dos Alimentos)Universidade Federal de Lavras, Lavras.

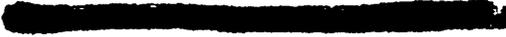
PRETE, C.E.C. **Condutividade elétrica do exudato de grãos de café (*Coffea arabica* L.) e sua relação com a qualidade da bebida**. 1992. 125p. Tese (Doutorado em Fitotecnia)- Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

SHEWFELT,R.L. **What is quality? Postharvest Biology and Technology**, Georgia, v. 15, p. 197-200, 1999.

SILVA, F. S. **Diversidade microbiana em grãos de ( *Coffea arabica* L. ) processados por via seca nas pré e pós-colheita**. 2000. 105p. Tese (Mestrado em Microbiologia dos Alimentos)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

USALL, J. et al. **Pilot tests of *Candida sake* (CPA-1) applications to control postharvest blue mold on apple fruit**. *Postharvest unit, Catalonia, Spain*, **Postharvest Biology and Technology**, v.21, p.147-156, 2001.

WHITAKER, J. R. **Polyphenol oxidase**. In: WONG, D.W.S. **Food Enzymes-structure and mecanismm**. London: Chapman & Hall, 1995. p. 271-307.



WILSON, C. L.; CHALUTZ, E . Postharvest biological control of *penicillium* rots of citrus with antagonistic yeasts and bacteria. **Scientia Horticulturae**, Amisterdam, v.40, n.2 p-105-112,1989.

WILSON, C. L.; WISNIEWSKI, M. E. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: an emerging technology. **Annual Review Phytopathology West Virginia**, n.41 p-425-441, 1989.