

**DIVERSIDADE E FREQUÊNCIA DE FUNGOS  
ASSOCIADOS A FRUTOS E GRÃOS DE CAFÉ**

**RICARDO TADEU GALVÃO PEREIRA**

**2006**

**RICARDO TADEU GALVÃO PEREIRA**

**DIVERSIDADE E FREQUÊNCIA DE FUNGOS  
ASSOCIADOS A FRUTOS E GRÃOS DE CAFÉ**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Curso de Doutorado em Agronomia, área de concentração Fitopatologia, para a obtenção do título de “Doutor”.

Orientador

Prof. Dr. Ludwig Heinrich Pfenning

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2006

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

Pereira, Ricardo Tadeu Galvão

Diversidade e frequência de fungos associados a frutos e grãos de café /  
Ricardo Tadeu Galvão Pereira. -- Lavras : UFLA, 2005.

151 p. : il.

Orientador: Ludwig Heinrich Pfenning

Tese (Doutorado) – UFLA.

Bibliografia.

1. *Aspergillus ochraceus*. 2. Ocratoxina A. 3. HACCP. 4. Qualidade. 5.  
Segurança do alimento. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-633.7394

**RICARDO TADEU GALVÃO PEREIRA**

**DIVERSIDADE E FREQUÊNCIA DE FUNGOS  
ASSOCIADOS A FRUTOS E GRÃOS DE CAFÉ**

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

APROVADA em 9 de março de 2006

Dra. Marta Hiromi Taniwaki	ITAL/APTA
Prof. Dr. Eduardo Alves	DFP/UFLA
Prof. Dr. Hilário Antônio de Castro	DFP/UFLA
Dra. Sara Maria Chalfoun de Souza	EPAMIG/CTSM

Prof. Dr. Ludwig Heinrich Pfenning  
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 e Maria do Carmo

Ao meu primo Carlos Alberto

E a todos aqueles que dedicam sua vida à agricultura

**DEDICO.**

## AGRADECIMENTOS

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

Aos colegas e meio irmãos Anderson (Bradock) e Sandro pela disposição em todos os momentos;

Aos colegas de curso do Departamento de Fitopatologia da Ufla;

Ao Professor Ludwig por todos os ensinamentos e pela amizade;

Ao Professor Hilário pelas primeiras orientações;

Aos companheiros do laboratório de micologia, em especial a Mirian, Anderson e Elisa, pelas sugestões e apoio constante;

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

A minha amiga Eloísa, pelos primeiros ensinamentos sobre fungos;

Aos amigos Márcio, Gislaine, Pará e Lucas, sempre prontos para qualquer festa;

Ao Sr. Jaime, Dona Antônia, Gislaine, Lílian, Elisandra, Sofia e Sonia, uma segunda família em Lavras;

A todos os funcionários do DFP, em especial a Ana Maria, Carzinho e Dilourdes;

Aos novos colegas de trabalho na EMATER Rosilene, Walter e Rita pela especial acolhida;

Ao Dr. Odilon e seu funcionário Sebastião, pela confiança em abrir as porteiras de sua propriedade;

À Dra Sara, ao Prof. Eduardo e à Dra. Marta Taniwaki pelas sugestões;

Àos meus tios Eloi, Carolina, Carlos e Maria do Carmo pela preocupação;

Ao Departamento de Fitopatologia e a Universidade Federal de Lavras pela oportunidade;

Ao CNPq e a Capes pela concessão da bolsa, e a FAO e Embrapa Café pelo financiamento do projeto;

A 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

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT .....	ii
CAPÍTULO 1 Diversidade e freqüência de fungos associados a frutos e grãos de café.....	1
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	2
2 REFERENCIAL TEÓRICO .....	4
2.1 Qualidade, segurança do alimento e certificação em café .....	4
2.2 Ocratoxina A como risco à segurança do alimento café.....	7
2.3 Fungos associados aos frutos e grãos do café.....	8
2.3.1 Fungos produtores de ocratoxina associados a frutos e grãos do cafeeiro. 11	
2.4 Condições de risco à segurança do café quanto à contaminação por OTA ..	12
2.5 Evidências dos riscos dos cafés secos no pé.....	14
2.6 Detecção e quantificação de fungos em grãos e frutos de café.....	18
2.7 O sistema HACCP como forma de certificação da qualidade .....	21
2.7.1 HACCP - breve histórico .....	22
2.7.2 Passos para a implementação do sistema HACCP.....	22
2.7.3 Preparação para o desenvolvimento do plano de HACCP.....	23
2.7.4 Aplicação dos princípios (estudo do plano HACCP) .....	23
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30
CAPÍTULO 2 Detecção e monitoramento de fungos em frutos e grãos do cafeeiro, durante diferentes fases do processamento .....	37
RESUMO.....	38
ABSTRACT .....	39
1 INTRODUÇÃO.....	40
2 MATERIAL E MÉTODOS .....	42
2.1 Amostras .....	42
2.2 Processamento .....	44
2.3 Transformação dos dados e análises estatísticas.....	45
3 RESULTADOS .....	47
3.1 Ocorrência e freqüência de fungos .....	47
3.2 Incidência e freqüência e o ano agrícola.....	48
3.3 Incidência e freqüência de espécies toxigênicas nos diferentes tipos de café .....	48
3.4 Ocorrência e freqüência de espécies de <i>Fusarium</i> spp nos diferentes tipos de café.....	50
3.5 Ocorrência e freqüência de <i>Cladosporium cladosporioides</i> nos diferentes tipos de café .....	50

3.6 Ocorrência e frequência de <i>Penicillium</i> spp. diferentes tipos de café.....	51
3.7 Análise de agrupamento dos tipos .....	51
4 DISCUSSÃO .....	53
5 CONCLUSÕES .....	57
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	58

CAPÍTULO 3 Fungos em frutos e grãos de café com permanência prolongada na planta.....	60
RESUMO.....	61
ABSTRACT .....	63
1 INTRODUÇÃO .....	65
2 MATERIAL E MÉTODOS .....	67
2.1 Local .....	67
2.2 Amostragem.....	67
2.3 Caracterização das amostras .....	68
2.4 Delineamento experimental .....	69
3 RESULTADOS .....	70
3.1 Colonização Média dos frutos .....	70
3.1.1 Cascas dos frutos .....	70
3.1.2 Grãos.....	73
3.2 Porcentagem de frutos tipo bóia cereja e verde .....	75
3.3 Teores de umidade .....	76
3.4 Contaminação por OTA.....	77
4.1 Sucessão microbiana.....	78
4.2 Produção de OTA .....	82
4.3 Interação colonização por <i>A. ochraceus</i> X contaminação por OTA.....	82
5 CONCLUSÕES .....	84
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85

CAPITULO 4 Monitoramento de fungos em diferentes partes do fruto do cafeeiro .....	87
RESUMO.....	88
ABSTRACT .....	90
1 INTRODUÇÃO .....	92
2 MATERIAL E MÉTODOS .....	94
2.1 Amostragem.....	94
2.2 Processamento das amostras .....	94
2.2.1 Comunidade do exocarpo .....	95
2.2.2 Comunidade do mesocarpo.....	96
2.2.3 Comunidade do endocarpo .....	97
2.3 Identificação das espécies e diversidade.....	97
2.4 Análise de dados .....	97



3 RESULTADOS .....	99
3.1 Fungos do exocarpo .....	99
3.2 Fungos do mesocarpo .....	100
3.3 Fungos do endocarpo .....	100
3.5 Diversidade de espécies .....	102
3.6 Chave de identificação .....	103
4 DISCUSSÃO .....	105
4.1 Comunidade do exocarpo .....	105
4.2 Comunidade do mesocarpo .....	106
4.3 Comunidade do endocarpo .....	107
4.4 Diferenças na composição das comunidades .....	108
5 CONCLUSÕES .....	110
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	111

CAPÍTULO 5 Análise da possibilidade de desenvolvimento e implementação de um plano haccp para o agronegócio café, com ênfase no controle do risco contaminação por ocratoxina a .....	116
RESUMO.....	117
ABSTRACT .....	118
1 INTRODUÇÃO.....	119
2 MATERIAL e MÉTODOS.....	120
2.1 Roteiro para elaboração do plano de HACCP .....	120
2.2 Descrição completa do produto .....	121
2.3 Descrição dos fatores e elementos que levam à obtenção de um produto seguro.....	121
2.4 Construção de um fluxograma de produção .....	121
2.5 Validação do fluxograma de produção .....	121
2.6 Aplicação dos princípios (Estudo do plano HACCP).....	122
3 RESULTADOS .....	123
3.1 Descrição do produto .....	123
3.2 Descrição dos fatores e elementos que levam à obtenção de um produto seguro.....	125
3.3 Construção de um fluxograma de produção .....	126
3.3.1 Fluxograma colheita .....	126
3.3.2 Fluxograma de produção de cafés pela via seca .....	130
3.4 Validação do fluxograma de produção .....	136
3.5 Aplicação dos princípios - estudo do plano HACCP.....	136
3.5.1 Condução da análise de perigos.....	136
3.5.2 Determinação dos pontos críticos de controle - PCCs .....	137
3.5.3 Estabelecimento dos limites críticos.....	144
3.5.4 Estabelecimento de um sistema de monitoramento.....	144

3.5.5 Estabelecimento de ações corretivas, quando for detectado que determinado parâmetro está fora do controle.....	146
3.5.6 Estabelecer procedimentos para verificar se o sistema HACCP está funcionando .....	146
3.5.7 Procedimentos de documentação e registro dos dados do sistema .....	147
4 DISCUSSÃO .....	148
5 CONCLUSÕES .....	149
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	150

## RESUMO

PEREIRA, Ricardo Tadeu Galvão. **Diversidade e frequência de fungos associados a frutos e grãos de café.** 2006. 151p. Tese (Doutorado em Agronomia-Fitopatologia), Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.\*

Os objetivos deste trabalho foram avaliar a diversidade e a frequência de fungos associados a frutos e grãos em diferentes tipos de café; estudar a influência da permanência do fruto aderido à planta após o ponto ideal de colheita na infecção por fungos e contaminação com Ocratoxina A (OTA); propor uma metodologia eficiente para detecção e monitoramento de fungos em diferentes partes do fruto; e avaliar a possibilidade da implementação do plano HACCP para o agronegócio café. Para o monitoramento foram coletadas nos anos de 2002 e 2003, grãos de café de 178 amostras, de diferentes tipos, nas regiões Sul e Zona da Mata de Minas Gerais e Montanhas do Espírito Santo. Foram identificadas as espécies potencialmente produtoras de OTA *Aspergillus ochraceus*, de ampla ocorrência, e *A. carbonarius*, de ocorrência restrita. Não houve diferença entre a colonização por *A. ochraceus* nos diferentes tipos de café, exceto para os cafés de varrição. *A. ochraceus* foi detectado em diversas amostras, porém em baixa frequência. Para verificar a influência da permanência do fruto no campo, após o ponto ideal de colheita foram coletadas amostras de café aos 0, 30 e 60 dias após o ponto ideal de colheita e analisadas quanto à ocorrência de fungos e à contaminação por OTA. A colonização por *A. ochraceus* aumentou após a permanência do fruto no campo por 30 dias e a contaminação por OTA de 8 das 9 amostras contaminadas só foi detectada após 30 dias de permanência no campo. A metodologia desenvolvida para detecção de fungos em diferentes partes do fruto baseou-se na separação do exocarpo, endocarpo e mesocarpo e recuperação dos fungos destas frações. A metodologia foi eficiente para caracterizar as diferentes comunidades de fungos presentes nas diferentes partes do fruto do cafeeiro com eficiência, praticidade e segurança. Foram detectados com maior frequência *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Fusarium* spp., *Cladosporium* e leveduras. Foi descrito um plano de implementação do sistema HACCP para café, contendo os fluxogramas de produção, indicação de prováveis pontos de risco à segurança bem como as medidas que possam diminuir os riscos. Conclui-se que a espécie ocratoxigênica *A. ochraceus* é de ampla distribuição em grãos e frutos do cafeeiro, porém com frequência baixa. A adoção conseqüente do conceito de boas práticas agrícolas pode garantir a segurança do produto e manter a sua qualidade.

---

\* Comitê Orientador: Ludwig H. Pfenning – UFLA (Orientador); Hilário Antônio de Castro – UFLA (Co-Orientador).

## ABSTRACT

PEREIRA, Ricardo Tadeu Galvão. **Diversity and frequency of fungi associated to fruits and grains of coffee**. 2006. 151p. Thesis (Doctorate in Agronomy), Federal University of Lavras, Lavras, MG.\* \*

Objectives of the present study were to evaluate diversity and frequency of fungi associated to cherries and parchments in different types of coffee; to evaluate the development of fungi and OTA contamination during tree-drying; to improve and test a methodology for detecting and monitoring the occurrence and frequency of filamentous fungi in different compartments of the coffee fruit; and to evaluate the feasibility of implementation of an HACCP plan for the coffee agrobusiness. For monitoring fungi in different types of coffee, 178 samples were collected in 2002 and 2003 in the regions South and Mountains of Minas Gerais and Mountains of Espírito Santo. The potentially ochratoxigenic species *Aspergillus ochraceus* and *A. carbonarius* were identified, the former showing a wide, the latter a quite restricted distribution. No difference in frequency of *Aspergillus ochraceus* could be observed in different types of coffee, except in swept coffee. This fungus can be found in many samples, though in very low frequency. With the aim to evaluate the influence of tree drying, samples were taken at the ideal point of harvest when about 70% of the fruits were ripe, after a further 30 days, and finally after 60 days. Each sample was characterized with respect to its colonization by fungi and contamination by OTA in the husks and grains. The average percentage of grains infected with *A. ochraceus* after 0, 30 and 60 days after the ideal harvest time was 2, 8 and 6% respectively. To characterize the fungal community in different parts of the fruit, 23 samples of cherries without any symptom were collected and fifty cherries from each sample analyzed. In total, 43 fungal species were recovered and identified. The most common filamentous fungi were *Cladosporium*, *Fusarium* and *Penicillium*. *A. ochraceus* was present in about 7% of grains analyzed but was also rarely detected in the exocarp and mesocarp. The methodology used was efficient in recovering a high diversity of fungal species, including toxigenic species, from all parts of the coffee fruit. The fact that *A. ochraceus* can be detected in intact coffee cherries argues against the notion that contamination of coffee by ochratoxin A is exclusively a post harvest problem. Adoption of good agricultural practices may guarantee safety of coffee and enhance quality of the product. For the HACCP plan, flow-diagrams of the coffee production process were presented and putative critical control points indicated.

---

\* Advising Committee : Ludwig H. Pfenning – UFLA (adviser); Hilário Antônio de Castro – UFLA (co-adviser)

## **CAPÍTULO 1**

### **DIVERSIDADE E FREQUÊNCIA DE FUNGOS ASSOCIADOS A FRUTOS E GRÃOS DE CAFÉ**

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é o maior produtor e exportador de café do mundo, e as divisas geradas por este produto são de grande impacto econômico e social. A maioria do café é exportado para os Estados Unidos, Ásia e Comunidade Européia. Com a globalização, a exigência da produção de alimentos com altos padrões de qualidade e segurança se tornou realidade no mercado. Nesse sentido, a principal ameaça não tarifária a exportações do café brasileiro é a presença da micotoxina conhecida como ocratoxina A (OTA). Os efeitos carcinogênicos da OTA em animais já são bem caracterizados; ela causa lesões renais, sendo a possível causa da doença conhecida como nefropatia endêmica dos Bálcãs. A união européia fixou limites para a contaminação por OTA em café torrado e moído em 5 µg/kg (UE, 2005). No café a contaminação ocorre devido à produção da toxina pelas espécies *Aspergillus ochraceus* e *Aspergillus carbonarius*.

No Brasil, a principal espécie produtora de OTA encontrada colonizando grãos de café é *Aspergillus ochraceus*. Esta espécie tem como característica ampla distribuição em amostras de café, porém, a frequência de grãos colonizados nas amostras é relativamente baixa. A condição para que ocorra a produção da OTA está relacionada à disponibilidade de água no grão; condições de umidade alta no grão favorecem o crescimento do fungo e a produção da OTA. Como a OTA não pode ser eliminada durante o processamento do café, medidas de prevenção da contaminação são fundamentais na garantia da segurança do produto.

Em meados do ano 2000, a FAO iniciou o projeto “*Enhancement of Coffee Quality through Prevention of Mould Formation*”, que tinha como meta implementar um programa de boas práticas agrícolas e HACCP em café no

mundo. No Brasil, o programa foi gerenciado pela EMBRAPA-Café, sendo uma das instituições parceiras a Universidade Federal de Lavras (UFLA).

Nos anos de 2002 a 2005, foram desenvolvidos, no Departamento de Fitopatologia da UFLA, trabalhos nas áreas de caracterização dos sistemas de produção quanto à segurança do alimento e possibilidades de implementação do sistema *Hazard Analysis and Critical Control Points* ou HACCP, monitoramento de fungos em diferentes sistemas de produção, análise de risco da permanência de cafés aderidos à planta após o ponto ideal de colheita e isolamento de fungos de diferentes comunidades do fruto do cafeeiro. Os resultados destes estudos estão parcialmente descritos neste trabalho como mais uma contribuição à implementação de um sistema de produção de cafés que garanta a qualidade.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Qualidade, segurança do alimento e certificação em café

Qualidade do produto pode ser definida como a soma de todos atributos que levem à satisfação dos desejos e necessidades do consumidor (Shewfelt, 1999). Este conceito pode parecer reducionista, pois poderia levar a crer que o consumidor não seria capaz de garantir, por exemplo, se a sua saúde realmente está sendo preservada quando ele ingere um alimento. Entretanto a globalização com ampla abertura de mercados tem como exigência uma rígida padronização dos produtos, o que leva à busca da qualidade desde o produtor primário até a mesa do consumidor. Desse modo, quando o produto atinge a mesa do consumidor, este, teoricamente, já tem a garantia de sua qualidade.

Com relação ao café, no Brasil, a avaliação da qualidade sensorial é definida por um sistema oficial de classificação fundamentado na prova de xícara e classificação por tipos. A prova de xícara é baseada na degustação de uma infusão de cafés torrados que são divididos em seis classes de acordo com o sabor e o odor da bebida. Este tipo de avaliação da qualidade é realizada por provadores que normalmente passam por intenso treinamento, o que não reduz muito a subjetividade do método. A classificação por tipos, diz respeito ao número de defeitos contidos no lote de café e é feita pela contagem do número de defeitos na amostra. Estas duas avaliações dizem respeito somente a características que vão influenciar diretamente nas características organolépticas e visuais do produto, não se prestando a uma garantia da segurança do alimento.

Outra classificação de alimentos separa simplesmente os alimentos em dois grupos, os seguros e os não seguros (Brasil, 1998; CODEX, 1997). Um alimento é seguro quando não oferece nenhum perigo à saúde do consumidor. Perigo é a presença de níveis inaceitáveis de contaminantes de natureza química, física ou biológica em não conformidade com um padrão de identidade do



produto ou regulamento técnico (Brasil, 1998). Outra importante classificação a ser considerada é o risco, que é a probabilidade de um perigo acontecer (SEBRAE, 2000). Todos estes conceitos dizem respeito ao assunto segurança do alimento, que não pode ser confundido com o termo segurança alimentar, que está relacionado ao acesso ao alimento pela população. A título de exemplo, as restrições às exportações de cafés contaminados com ocratoxina são políticas de segurança do alimento; já as políticas de distribuição de café na merenda escolar são consideradas políticas de segurança alimentar.

Atualmente, o principal perigo relacionado ao alimento café é a presença da micotoxina conhecida como ocratoxina A, produzida por fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium*.

A micotoxina ocratoxina A foi isolada pela primeira vez a partir de *Aspergillus ochraceus* da África do Sul no ano de 1964 (Van der Merwe, 1964). Quimicamente, OTA é uma dihydroisocumarina substituída, ligada por meio de um grupo carboxil a fenilalanina. A ocratoxina B é semelhante, porém não contém cloro (Harris & Mantle, 2001). As principais evidências da capacidade da ocratoxina A de causar doenças em humanos estão relacionadas ao estudo da doença conhecida como nefropatia endêmica dos Balcãs, uma doença descrita na Bulgária, Romênia e Iugoslávia, em 1950, que provoca uma progressiva e gradual falência dos rins (Pfohl-Leskowicz et al., 2002). Estudos epidemiológicos indicaram que uma possível causa desta enfermidade seria o consumo de alimentos contaminados pela Ocratoxina A, apesar desta hipótese não ter sido até o momento confirmada. Em animais, vários efeitos nocivos já foram comprovados (Tabela 1).

**TABELA 1** Efeito da OTA em algumas espécies de animais

<b>Animais</b>	<b>Efeito</b>
Cães	Dose letal <sub>50</sub> via oral: 0,2 mg/kg; nefrotóxica
Ratos Macho	Dose letal <sub>50</sub> via oral: 30 mg/kg, nefrotóxica
Ratos	Anormalidades cardíacas, trombose, lesões gastrointestinais e nefrotóxica
Galinhas	Perda de apetite, mortalidade e nefrotóxica
Suínos	Nefrotóxica
Patos e perus	Nefrotóxica

(Adaptado de Pfohl-Leszkowicz et al., 2002)

Atualmente os efeitos da ocratoxina A na indução de danos oxidativos ao DNA já são melhor esclarecidos, sendo estes danos o ponto chave que levam à indução de câncer renal (Kampa et al., 2005). Assim a International Association for Research Cancer - IARC classificou a ocratoxina A como sendo uma substância do grupo 2b, com possíveis efeitos carcinogênicos a humanos. Os dados que levam a estas conclusões são baseados na evidência do consumo da ocratoxina A em alimentos e o surgimento da nefropatia endêmica dos Bálcãs juntamente com o fato do isolamento da OTA de sangue e leite humano (IARC, 1993). Com a comprovação dos riscos à saúde na ingestão desta toxina, a União Européia fixou limites de contaminação pela OTA para vários alimentos incluindo grãos de café torrado e moído em 5 µg/kg (UE, 2005) (Tabela 2). Vários outros países também têm regulamentação para ocratoxina A principalmente para cereais e seus derivados, com limites variando de 3 até 50µg/kg.

**TABELA 2** Limites de contaminação por OTA adotados pela União Européia para alguns alimentos.

Produto	Nível máximo ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ou ppb)
Grãos de cereais	5,0
Derivados de cereais	3,0
Uva passa	10,0
Café torrado e moído	5,0
Café solúvel	10,0
Vinho	2,0
Suco de uva	2,0
Alimentos infantis	0,5
Alimentos dietéticos	0,5

(Adaptado de UE, 2005)

## 2.2 Ocratoxina A como risco à segurança do alimento café

A principal fonte de ingestão de OTA são os cereais (FAO, 2004). Outras fontes conhecidas são uvas passas, suco de uvas, vinhos, cerveja, carnes e café. A contaminação de grãos de café por ocratoxina foi relatada pela primeira vez por Levi et al.(1974). Os níveis de contaminação de amostras de café por OTA são variáveis de acordo com o país e tipo de café (Pardo et al., 2004a; Mantle & Chow, 2000; Paterson & Kozakiewicz, 1997). A análise de 57 amostras de café provenientes de Angola, Bolívia, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Equador, Etiópia, Guatemala, Índia, Indonésia, Costa do Marfim, Java, Nicarágua, Uganda e Vietnam, detectou níveis de contaminação acima de 0,6  $\mu\text{g}/\text{kg}$  em todas as amostras. O nível máximo de contaminação pela toxina nestas amostras foi 31,5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  e o nível mínimo de 1,3  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . (Pardo *et al.*, 2004a).

A contaminação por OTA em cafés industrializados já foi comprovada (Otteneder & Majerus, 2001; Stegen *et al.*, 1997). Entre os anos de 1995 e 1999, 613 amostras de diferentes tipos de café foram analisadas e, destas, 27% dos

cafés beneficiados (café verde) continham OTA em níveis maiores que 0,6 µg/kg, com valor médio de contaminação de 1,29 µg/kg e máximo de 24,5 µg/kg. Nos cafés torrados, descafeinados e instantâneos os níveis máximos de contaminação variaram de 4,8 até 12,1 µg/kg (Otteneder & Majerus, 2001). Cafés torrados e moídos, descafeinados e instantâneos continham níveis de OTA variando em média de 0,5 até 1,4 µg/kg, porém em mais de 70% destas amostras a contaminação não ultrapassou 1 µg/kg. (Stegen et al., 1997).

No Brasil, a presença de OTA em cafés já foi relatada em diversos trabalhos (Leoni et al. 2001; Leoni et al 2000; Taniwaki et al., 2003; Batista, 2005). Em amostras de cafés beneficiados coletadas nos principais estados produtores, Minas Gerais, Paraná, São Paulo, Espírito Santo e Bahia, 20% continham OTA variando de 0,7 até 47,8 µg/kg (Leoni et al, 2001) Em cafés industrializados adquiridos no comércio local os níveis de contaminação pela OTA variaram de 0,3 até 6,5 µg/kg, em estudos realizados no estado de São Paulo (Leoni et al., 2000).

### **2.3 Fungos associados aos frutos e grãos do café**

Os fungos podem influenciar na qualidade da bebida do café basicamente de duas maneiras. A colonização intensa do grão por determinadas espécies pode levar à perda da qualidade da bebida, comprometendo as características organolépticas do produto, provocando alterações no odor e no sabor. Esta perda da qualidade reflete diretamente no preço produto, pois é facilmente identificada pelos compradores por meio da prova de xícara. Outra maneira pela qual os fungos alteram a qualidade do café é produzindo, durante a sua colonização, substâncias conhecidas como micotoxinas que, mesmo em baixas concentrações, podem ser prejudiciais à saúde do consumidor.

Os primeiros relatos da influência de fungos na qualidade do café datam de 1936, quando Krug (1940a) verificou, por meio de lupa de bolso em amostras

de cafés ardidos, a presença de um fungo de micélio avermelhado, identificado inicialmente como sendo do gênero *Fusarium*. A partir daí, este pesquisador deu início a uma série de trabalhos sobre a origem dos cafés duros, considerados, naquela época, de baixa qualidade. 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). A microbiota de grãos de café nos estádios de cereja, seco no pé e colhidos no chão apresentaram porcentagem de bactérias de 0%, 13% e 8% e 0%, 2% e 13% de fungos filamentosos, respectivamente (Krug, 1940b). A diferença na qualidade do café de diferentes regiões foi atribuída à presença de fungo de micélio avermelhado identificado como *Fusarium concolor*, que apresentava alta incidência em grãos que originaram bebidas de má qualidade. Estas bebidas eram encontradas em regiões específicas do estado de São Paulo (Krug, 1940c).

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 ocorrência de espécies toxigênicas, como *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus versicolor*. O gênero *Penicillium* foi encontrado regularmente, embora com índices de ocorrência baixos (Mislivec et al., 1983).

Estudos da microflora associada aos frutos do cafeeiro de diferentes regiões do estado de Minas Gerais concluíram 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) (Meirelles, 1990).

Na avaliação da presença de fungos em cafés do estágio cereja até beneficiado, as principais espécies recuperadas foram *Colletotrichum* sp, *Phoma* sp, *Fusarium* sp, *Cladosporium* sp, *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp. Porém, a incidência e a frequência destes fungos foram variáveis de acordo com o tipo de café analisado (Alves e Castro, 1998).

Com relação à localização dos fungos nos grãos de café, em amostras de grãos de 167 propriedades de 17 municípios do estado de Minas Gerais, foram identificados 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 (Freitas et al., 2000).

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

A diversidade de microrganismos encontrados associados a grãos e frutos de cafeeiro é maior quando se usam técnicas de isolamento com meios semi-seletivos. O uso de meio DG18 (Dicloran, Glicerol) proporcionou a recuperação de 20 espécies do gênero *Aspergillus* e 7 espécies de *Penicillium*, em amostras de café beneficiado (Batista et al., 2003).

### 2.3.1 Fungos produtores de ocratoxina associados a frutos e grãos do cafeeiro

Até o momento se conhecem dois gêneros de fungos com espécies produtoras de OTA: *Aspergillus* e *Penicillium*. Dentro do gênero *Penicillium* a principal espécie produtora é *Penicillium verrucosum*, relatada associada, principalmente, a cereais cultivados em regiões de clima temperado (Pitt, 2000). A análise da capacidade de produção de OTA por isolados de *Penicillium aurantiogriseum*, *Penicillium brevicompactum*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium corylophilum*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium expansum*, *Penicillium glabrum* e *Penicillium solitum* associados a grãos de cafeeiro no Brasil não detectou nenhum com capacidade de produção de OTA (Batista et al., 2003).

*Aspergillus* spp. são os principais representantes de fungos potencialmente produtores de OTA em regiões de clima tropical e subtropical (Pitt, 2000). As seções *Circumdati* e *nigri* possuem espécies que produzem OTA (Pitt, 2000). *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus alliaceus*, *Aspergillus auricomus*, *Aspergillus elegans*, *Aspergillus insulicola*, *Aspergillus ostianus*, *Aspergillus petrakii*, *Aspergillus sclerotiorum* e *Aspergillus sulphureus* são espécies da seção *Circumdati* relatados como produtores de OTA (Batista et al., 2003; Klich, 2002). Destas espécies, somente *Aspergillus alliaceus* ainda não foi relatado associado a grãos de café.

Existem algumas evidências de que *Aspergillus alliaceus* não pertence a *Circumdati*, mas sim à seção *Flavi* (Klich, 2002). As espécies da seção *Circumdati* são caracterizadas pela cor amarela ou ocre e conídios bisseriados (Klich, 2002). Em grãos de café, a principal espécie produtora de OTA encontrada é *Aspergillus ochraceus*, sendo relatado praticamente em todos os países produtores (Batista, 2005; Pardo et al.; 2004a; Suárez-Quiroz et al., 2004;

Chalfoun & Batista, 2003; Martins et al., 2003; Taniwaki et al., 2003; Batista et al., 2003; Bucheli et al., 2002; Abarca et al., 2001; Urbano et al., 2001).

#### **2.4 Condições de risco à segurança do café quanto à contaminação por OTA**

Não basta a colonização dos grãos de café por *Aspergillus ochraceus* para que ocorra a contaminação pela OTA (Frank, 2001). Após e durante a colonização, é necessário que certas condições especiais sejam alcançadas para que, efetivamente, ocorra a produção de toxina pelo fungo. É necessário que o substrato seja favorável ao crescimento e produção de OTA e que condições ambientais adequadas sejam atingidas. Os principais fatores relacionados à produção de OTA são a temperatura e a disponibilidade de água ( $A_w$ ).

*Aspergillus ochraceus*, a principal espécie produtora de OTA, tem uma temperatura mínima para crescimento de 8°C e uma máxima de 41°C (Palácios-Cabrera et al., 2005). De acordo com as médias anuais registradas nas principais regiões produtoras de café, as temperaturas mínima e máxima não são fatores limitantes ao crescimento do fungo. A temperatura ideal para o crescimento situa-se na faixa dos 20°C a 30°C (Pardo et al., 2004b). A produção máxima de OTA por *Aspergillus ochraceus* situou-se na faixa de 20 a 23 °C em meios de cultura (Matos et al., 2005). Índices de contaminação por OTA superiores a 160µg/kg foram alcançados quando grãos de café foram mantidos sob temperaturas de 25 °C, sendo este valor possivelmente próximo a uma condição ideal para a produção da toxina (Palácios-Cabrera et al., 2004).

No caso da cultura do cafeeiro, o controle da temperatura durante o processo de produção não é uma alternativa viável para se evitar a contaminação pela OTA porque, nas regiões produtoras, raramente as temperaturas mínimas e máximas para inibição do crescimento são atingidas e a temperatura média se situa entre a faixa ideal ao crescimento do fungo. Além disso, o sistema de



produção é um sistema aberto e que envolve um grande volume de matéria-prima, sendo inviável o controle da temperatura.

A disponibilidade de água no produto também é um fator determinante na colonização e conseqüente produção de toxina pelo fungo. A disponibilidade de água no alimento é mais adequadamente representada utilizando-se o conceito atividade de água ( $A_w$ ), que nada mais é do que a umidade relativa do ar quando o alimento é mantido em um sistema equilibrado. As atividades de água mínima para o crescimento de *Aspergillus ochraceus* estão situadas entre 0,76 a 0,83 e a máxima fica em torno de 0,99 (Samson et al., 2000). A produção máxima de toxina acontece em  $A_w$  acima de 0,98, em meio de cultura (Matos et al., 2005; Northold & Bullerman, 1982). A manutenção de grãos de café a uma umidade de 95% resultou em níveis de contaminação pela OTA superiores a 2000 $\mu$ g/kg da toxina (Palacios-Cabrera et al., 2004).

Na prática, a medição da  $A_w$  não é feita no campo, sendo determinada a umidade do produto normalmente, na base úmida e em porcentagem. Valores de umidade abaixo de 12% garantem à segurança do produto. O café normalmente, é mantido de modo a preservar todas as suas qualidades, na umidade entre 10% e 12%. O controle da umidade do café durante o processo de produção é uma prática viável. O fruto cereja com  $A_w$  próximo a 0,99, aparentemente, é inseguro, mas, este alto valor de  $A_w$  não permite o desenvolvimento de *Aspergillus ochraceus* devido à concorrência com leveduras, bactérias e outros fungos filamentosos. A partir do início da secagem do fruto, condições mais adequadas ao estabelecimento de *Aspergillus ochraceus* começam a ser atendidas, porém, em condições ideais de secagem, a umidade dos grãos tende a cair rapidamente, atingindo valores que não permitem mais o crescimento e a produção de toxina pelo fungo. Assim, deve-se procurar fazer com que a colheita dos frutos seja feita no estágio cereja e que o fruto perca água o mais rápido possível para que a segurança do produto seja mantida.

## **2.5 Evidências dos riscos dos cafés secos no pé**

### **2.5.1 Caracterização dos cafés com permanência prolongada aderida à planta – secos no oé -SNP**

A maturação de um fruto pode ser definida como as alterações morfológicas, fisiológicas e funcionais que ocorrem a partir da fecundação, prosseguindo até o momento em que as sementes ou frutos estão em condição de colheita. Durante este período, se verificam-se alterações na matéria seca, no teor de umidade, no tamanho, na germinação e no vigor (Delouche, 1976 citado por Caixeta, 1981). Devido à complexidade do conceito de maturação, um conceito mais amplamente empregado para frutos no sentido agrônomico (ex: Banana, goiaba, pêssago, etc.), convencionou-se, nos trabalhos com café, chamar esta fase de desenvolvimento.

Segundo Mendes (1941), citado por Rena et al. (1986), o desenvolvimento do fruto do café apresenta uma curva sigmóide dupla. Esta curva poderia ser dividida em cinco fases principais:

1-período sem crescimento visível – fase chumbinho: esta fase é marcada, principalmente, por uma divisão celular sem maiores alongamentos das células.;

2- fase de expansão rápida: nessa fase ocorre um rápido acúmulo de matéria seca e o seu final é marcado pelo endurecimento do endocarpo do fruto. A rigidez do endocarpo define o tamanho máximo do fruto, que, pela sua dureza, não permite uma maior expansão;

3- formação do endosperma: na fase final da expansão, começa a se formar o endosperma, na forma de endosperma leitoso;

4- Endurecimento do endosperma: Após a sua completa formação o endosperma começa a endurecer, atingindo o endurecimento total no início da fase de maturação;

5- maturação: nesta fase a cor do fruto se altera, passando do verde para o vermelho ou amarelo, conforme a cultivar. Além disso, ocorre um aumento do volume do pericarpo e o endosperma se torna mais denso pela deposição de matéria seca, o que faz com que ocorra um aumento no peso e no volume. Os teores de nitrogênio total, proteínas insolúveis e compostos nitrogenados solúveis (excluindo proteínas e aminoácidos) tende a aumentar e as proteínas e os aminoácidos tendem a permanecer constantes. No início da maturação, o teor de açúcares totais, açúcares redutores e sacarose aumenta acentuadamente. Ocorre uma elevação no consumo de oxigênio, devido a uma aceleração das rotas glicolíticas e oxidativas das células. A senescência é a fase final do desenvolvimento do fruto, bioquimicamente definida quando os processos de produção de energia (catabolismo) dão lugar aos de consumo (anabolismo); o seu fim é marcado pela queda do fruto ou sua total independência da planta, como é o caso do fruto seco no pé no cafeeiro.

A fase de fecundação que antecede a formação do fruto chumbinho ocorre no início da fase de florescimento, antes da abertura das flores. O florescimento do cafeeiro no Brasil ocorre, geralmente, após o início da estação chuvosa, nos meses de setembro a novembro. Este evento é desencadeado pelo estímulo da umidade após um período seco. Dependendo das condições climáticas do ano, ocorrem de duas a três floradas intensas e outras pequenas floradas secundárias. A ocorrência de mais de uma florada faz com que no momento da colheita, os frutos se apresentem em diferentes estágios de maturação.

A qualidade do produto com relação às características organolépticas está estritamente relacionada ao ponto de maturação por ocasião da colheita. Marin-López et al. (2003) verificaram os melhores aromas, acidez, corpo, amargo e impressão global das bebidas de café produzidas somente com frutos no estágio cereja, colhidos 217 dias após a fecundação. Por outro lado, frutos

secos na planta apresentaram perdas significativas na qualidade. As alterações que levam à perda da qualidade ainda não são bem esclarecidas, embora a presença de alguns grupos de microrganismos potencialmente causadores de perda de qualidade seja evidente.

### **2.5.2 Interação entre as fases de desenvolvimento do fruto e o processamento dos cafés no Brasil.**

A maioria das propriedades produtoras de café no Brasil adota o sistema de colheita não seletivo. Devido a este fato, no momento da colheita são colhidos os seguintes tipos de frutos:

- cereja: são os frutos no estágio ideal de maturação, apresentando a casca com coloração vermelha ou amarela intensa;
- verde: são os frutos imaturos, apresentando a cor verde característica;
- passa: são os frutos que passaram do ponto de maturação, apresentando uma cor marrom;
- secos: são frutos que iniciaram o processo de secagem ainda aderidos à planta, apresentando uma coloração marrom-clara a escuro;

Os frutos do tipo seco e algum tipo “passa” podem ser facilmente separados no equipamento conhecido como lavador/separador dando origem a fração “bóia” dos cafés. O histórico da fração bóia é extremamente variável, podendo ser constituído de frutos com poucos dias de permanência na planta até frutos remanescentes da safra passada, tendo, portanto, mais de um ano exposto às condições climáticas. Como é impossível controlar as condições climáticas nas quais estes frutos secaram aderidos à planta, não se pode garantir a segurança do produto (Taniwaki et al., 2003).

### 2.5.3 Prováveis riscos dos cafés SNP

Inexistem trabalhos que destacam o risco à segurança do café devido à permanência do fruto aderido à planta após o ponto ideal de colheita. Porém, frutos do tipo bóia e seco na planta nada mais são que frutos que permaneceram aderidos à planta após o ponto ideal de colheita e, a respeito destes tipos de café alguns trabalhos já foram conduzidos. Será considerada como potencialmente perigosa, a contaminação dos cafés pelas principais espécies produtoras de ocratoxina A no Brasil, *Aspergillus ochraceus* e *Aspergillus carbonarius*.

Alves & Castro (1998), estudando as comunidades de fungos associados a frutos e grãos de café de duas comunidades do município de Lavras, Sul do estado de Minas Gerais, durante as fases de desenvolvimento do fruto, não detectaram a presença de *Aspergillus ochraceus* em frutos do tipo cereja. Porém quando os frutos passaram para a fase de passa e seco no pé a percentagem de frutos colonizados foi de 2,8% e 1,2%, respectivamente. Os autores trabalharam também com grãos beneficiados e verificaram colonização de até 77% dos grãos após o beneficiamento.

Urbano et al. (2001), analisando cafés que secaram na planta no estado do Paraná e São Paulo, verificaram um pequeno número de isolados de *Aspergillus ochraceus* nestes tipos de café. Apenas 0,5% dos isolados identificados pertenciam ao grupo *ochraceus*. Porém verificou-se quantidade significativa, 9%, de isolados do grupo niger. Os mesmos autores testaram a potencialidade de 87 isolados do grupo niger de produzirem OTA e constataram que 11% destes foram produtores de OTA. Nenhum isolado do grupo niger foi identificado como *Aspergillus carbonarius*, demonstrando que existe risco na colonização por *Aspergillus niger* à segurança do produto.

Em amostras de café de diferentes regiões do Brasil, 0,35% dos grãos de cafés secos no pé apresentavam colonização por *Aspergillus ochraceus*. Nos

isolados de *Aspergillus ochraceus* obtidos neste estudo, 75% foram capazes de produzir OTA (Pitt et al., 2001).

A colonização de grãos de frutos de café secos no pé por espécies de *Aspergillus* capazes de produzirem OTA também foi constatada por Taniwaki et al. (2003). Um por cento dos frutos que secaram na planta estava colonizado por espécies capazes de produzirem OTA. Com relação à potencialidade das espécies isoladas, 75% e 77%, respectivamente, das espécies de *Aspergillus ochraceus* e *Aspergillus carbonarius*, foram produtores de OTA. Somente 3% das espécies de *Aspergillus niger* foram capazes de produzir OTA. O período de colheita prolongado aumenta consideravelmente a ocorrência do café tipo bóia. Amostras de café provenientes de regiões onde a colheita é mais tardia apresentaram maior colonização dos grãos de café por *Aspergillus ochraceus* (Freitas et al., 2000).

## **2.6 Detecção e quantificação de fungos em grãos e frutos de café**

O fruto do cafeeiro se apresenta com um pericarpo bem desenvolvido com três tipos de tecidos bem definidos: exocarpo, mesocarpo e endocarpo (Salazar et al., 1994). O exocarpo é constituído de uma camada externa de células parenquimatosas que externamente são de cor verde quando o fruto está imaturo e vermelho ou amarelo, dependendo da variedade, quando este amadurece. No mesocarpo são encontradas várias camadas de células, sendo a sua composição química rica em açúcares e compostos fenólicos. O endocarpo é formado por 5 a 7 camadas de células esclerenquimáticas que recobrem o grão do cafeeiro (Salazar et al., 1994; Rojas et al., 2003). A diversidade química e física encontrada no fruto faz deste um ambiente adequado ao desenvolvimento de diferentes grupos de fungos. A presença de microrganismos é natural no fruto, sendo condição essencial até no processamento, quando este é realizado utilizando processos fermentativos. Porém, algumas espécies de fungos

filamentosos, como *Aspergillus ochraceus* e *Aspergillus carbonarius* podem produzir micotoxinas como a ocratoxina A, que tem efeito tóxico para seres humanos e animais (Pfohl-Leszkowicz et al., 2000).

O estudo da composição das espécies presentes nas diferentes partes do fruto é essencial, tanto para o conhecimento da ecologia das espécies presentes quanto para a proposição de práticas no campo que garantam a segurança do alimento.

Os fungos presentes no exterior do fruto são conhecidos, sendo formados, principalmente, por leveduras e espécies, como *Fusarium*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Aspergillus* e alguns zigomicetos (Silva et al., 2000; Suárez-Quiroz et al., 2005).

No mesocarpo, o principal grupo de fungos encontrado são as leveduras, com dados escassos sobre a presença de fungos filamentosos (Rouss et al., 1995).

Os fungos associados ao endocarpo e ao grão são os mais conhecidos, destacando-se as espécies mais xerofílicas de *Aspergillus* e *Penicillium* e as espécies de ampla distribuição, como *Fusarium* e *Penicillium* (Batista, 2005; Taniwaki et al., 2003).

O processamento do café nas fazendas é baseado, principalmente, na perda de água e na retirada das estruturas do pericarpo, podendo as estruturas serem retiradas parcialmente com o fruto recém-colhido ou após a secagem. O estudo da composição fúngica de cada comunidade pode contribuir na proposição de práticas que melhorem a qualidade do produto e garantam a sua segurança.

O desenvolvimento de técnicas seguras que permitam a detecção, isolamento e identificação de fungos em alimentos, visando facilitar o estudo da ecologia dos fungos, é uma recomendação da *International Commission on Food Mycology* – ICFM (Taniwaki, 1996). Entre as técnicas que podem ser utilizadas no estudo da detecção, podem-se utilizar metodologias baseadas em técnicas

moleculares, como PCR ou baseadas em testes bioquímicos, como ergosterol (Fungaro et al., 2004; Schmid et al., 2004; Saxena et al., 2001). Porém, estas metodologias estão em desenvolvimento e possuem um custo, até o momento, relativamente alto. As metodologias de plaqueamento e contagem das unidades formadoras de colônia ainda o uma boa opção para o monitoramento de fungos. A escolha do diluente utilizado, do meio de cultura e das técnicas de separação das diferentes comunidades é o ponto definitivo no sucesso de uma metodologia. Um bom meio de cultura para fungos deve apresentar uma alta capacidade de recuperação de espécies, inibir o crescimento de bactérias, restringir o desenvolvimento de espécies de crescimento muito rápido, induzir a formação de colônias compactas, não inibir o crescimento de leveduras e permitir sua diferenciação dos fungos filamentosos e facilitar a identificação das espécies (Taniwaki & Silva, 2001; Taniwaki, 1996).

Os fungos ocratoxigênicos podem ser considerados como fungos moderadamente xerofílicos. Assim, o meio de cultura utilizado na sua recuperação deve conter algum tipo de soluto que iniba a disponibilidade de água (Taniwaki, 1996). Além da redução da disponibilidade de água, o meio deve conter agentes capazes de inibir o crescimento de zigomicetos e de bactérias.

O meio DG 18 (176g de glicerol, 8,0g de glicose, 4,0g de peptona, 0,80g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,4g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 800ml de água, 15g de ágar, 75mg de chloramphenicol e 2mg de dichloran) apresenta características desejáveis para a recuperação de espécies potencialmente ocratoxigênicas. DG18 contém glicerol que diminui a disponibilidade de água, favorecendo fungos com tendências xerofílicas. Possui, em sua composição, dichloran e cloramphenicol, adequados agentes fungicidas e bactericidas, respectivamente e permite uma fácil leitura com as cores dos fungos bem definidas. Uma desvantagem do DG18 é o preço



um pouco mais elevado do que dos meios comuns e a dificuldade de se conseguir o dichloran no Brasil.

A opção pela lavagem, diluição e plaqueamento da suspensão ou o plaqueamento direto também pode ser um fator decisivo na eficiência de um método. O plaqueamento direto é uma boa opção para grãos, aumentando o limite de detecção do método. Em grãos de cevada *Aspergillus restrictus* não pôde ser detectado quando utilizou-se o método de diluição, porém o plaqueamento direto da mesma amostra revelou uma colonização de até 41% dos grãos pelo fungo (Rabie et al., 1997).

O método da diluição é eficiente quando amostras contêm uma carga microbiana elevada com algumas espécies em altas proporções (Rabie et al., 1997). O plaqueamento direto de frutos tipo cereja de café utilizando meio BDA permitiu o isolamento de espécies de *Fusarium*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Colletotrichum* e *Phoma*, não sendo recuperada nenhuma espécie de *Penicillium* ou *Aspergillus* (Alves e Castro, 1998). Porém, frutos do tipo cereja de uma área próxima, quando submetidos a lavagem e diluição da suspensão de propágulos em meio DG18, permitiram a recuperação das mesmas espécies e mais uma grande diversidade espécies de *Penicillium* e *Aspergillus* (Pereira et al., 2006, dados não publicados) No caso para o estudo de diferentes partes do fruto, uma opção a ser considerada seria o uso da diluição para os fungos da comunidade externa e do mesocarpo e o plaqueamento direto dos grãos.

## **2.7 O sistema HACCP como forma de certificação da qualidade**

A produção integrada de alimentos, de forma a garantir a sustentabilidade dos sistemas agrícolas, tem figurado com uma exigência ao comércio internacional de alguns produtos, como frutas, por exemplo. Estes sistemas são baseados na utilização de recursos da melhor forma possível e na produção com qualidade total. Uma das exigências de um sistema de produção

integrada de café seria a implantação do sistema de boas práticas agrícolas e se possível a implementação de um sistema de garantia de segurança como o HACCP. Apesar da ampla utilização na indústria, o desenvolvimento de um plano de implementação do sistema HACCP no campo ainda passa por uma fase inicial.

### **2.7.1 HACCP - breve histórico**

O conceito *Hazard Analysis and Critical Control Point* - HACCP ou Análise dos Perigos e Pontos Críticos de Controle - APPCC originou-se por volta de 1960 com a *Pillsbury Company* trabalhando com a Agência Aeroespacial Americana – NASA e o exército norte-americano (SEBRAE, 2000a; SEBRAE, 2000b; Mortimore e Wallace, 2001). O sistema é baseado em uma ferramenta de engenharia conhecida como análise de falha, modo e efeito, que busca as potenciais falhas em uma operação e os seus efetivos mecanismos de controle. A partir da década de 1970, o sistema se difundiu para a indústria de alimentos, sendo inicialmente implantado na indústria de pescado. No Brasil sua importância foi reconhecido em 1993 e, a partir de então, algumas ações foram desenvolvidas para implementação em setores da indústria alimentícia (Brasil, 1993; Brasil, 1998). Como discutido, o sistema foi essencialmente desenvolvido para indústria, porém, foi levantada a possibilidade de seu uso no campo, como forma de garantir a qualidade da matéria prima.

### **2.7.2 Passos para a implementação do sistema HACCP**

Na prática, a implementação do plano HACCP, segundo Mortimore e Wallace (2001), pode ser discutida em quatro passos:

- 1) preparação para o desenvolvimento do plano de HACCP;
- 2) aplicação dos princípios (Estudo do plano de HACCP);
- 3) implementação do plano de HACCP;

- 4) manutenção do sistema HACCP.

### **2.7.3 Preparação para o desenvolvimento do plano de HACCP**

**Descrição completa do produto:** a descrição completa do produto é necessária para que todas as equipes envolvidas no plano HACCP tenham a real dimensão da cadeia produtiva. Além das pessoas envolvidas diretamente na implementação, a descrição é necessária devido à necessidade de auditoria no sistema. Assim, a descrição do produto deve fornecer todas as informações para que o plano possa ser corretamente analisado (SEBRAE, 2001a; Mortimore & Wallace, 1996).

**Descrição dos fatores e elementos que levam à obtenção de um produto seguro:** neste passo deve-se descrever, com base nas informações coletadas e dados de literatura, como um produto seguro é obtido.

**Construção de um fluxograma de produção:** o fluxograma de produção deve ser construído analisando-se toda a cadeia produtiva. Nele são destacados todos os pontos que podem levar risco à obtenção do produto.

**Validação do fluxograma de produção:** após a construção, o fluxograma deve ser validado quanto à sua representatividade e precisão para descrever o processo.

### **2.7.4 Aplicação dos princípios (estudo do plano HACCP)**

Após este estudo inicial, a próxima fase é aplicar os sete princípios do sistema que são:

- 1) condução de uma análise de perigos;
- 2) determinação dos pontos críticos de controle – PCCs;

- 3) estabelecimento dos limites críticos;
- 4) estabelecimento de um sistema de monitoramento dos PCCs;
- 5) estabelecimento de ações corretivas, quando houver indicação que um PCC está fora do controle;
- 6) estabelecer procedimentos de verificação se o sistema HACCP está funcionando corretamente;
- 7) estabelecer procedimentos de documentação e registro do sistema HACCP;

#### **2.7.4.1 PRINCÍPIO 1 - Condução da análise de perigo**

Nesta fase a equipe de implementação do plano deve destacar em toda a cadeia de produção, considerando os riscos, tudo que possa influenciar na segurança do produto.

A análise de risco deve ser conduzida considerando três grupos de perigo à segurança do produto, os quais são descritos a seguir.

**Perigos físicos:** são ocasionados pela presença de corpos ou materiais estranhos no produto. Estes elementos presentes no alimento podem causar ferimentos, dor, sufocação, engasgamento ou injúrias nos dentes. Os exemplos destes perigos são a presença no alimento de pedaços de madeira, vidro, plástico, metal, ossos e pragas (insetos grandes, pedaços de roedores ou pássaros).

**Perigos químicos:** são elementos de natureza química ou seus resíduos que em níveis inaceitáveis, podem causar danos à saúde do consumidor (Corlett,1998). Entre os perigos químicos estão as toxinas naturais, encontradas em algumas bactérias marinhas, metais pesados, como chumbo, cádmio, mercúrio, etc. agrotóxicos e produtos veterinários, conservantes de alimentos em níveis inadequados e as micotoxinas. As micotoxinas são substâncias produzidas por

fungos que, mesmo em baixa concentração, podem causar danos à saúde do consumidor (Sanson et al., 2000).

As principais espécies de fungos produtores de micotoxinas são *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Claviceps*. As micotoxinas mais importantes e os fungos produtores estão destacados na Tabela 3.

**TABELA 3** Micotoxinas mais importantes para a saúde humana e animal e seus agentes produtores, (FAO, 1997).

Micotoxina	Fungo produtor
Aflatoxina	<i>Aspergillus flavus</i>
Ocratoxinas	<i>Aspergillus ochraceus</i> , <i>A. carbonarius</i> e <i>Penicillium verrucosum</i>
Fumonisinias	<i>Fusarium verticillioides</i> ( <i>moniliforme</i> )
Tricotecenos	
Toxina T2	<i>Fusarium sporotrichioides</i>
Deoxinivalenol (DON vomitoxina)	<i>Fusarium graminearum</i>

Os fungos produtores de micotoxina podem ser agentes patogênicos de plantas, como *F. graminearum* (deoxinivalenol, nivalenol), fungos que crescem em plantas senescentes ou estressadas, como as *F. moniliforme* (fumosinas) ou fungos que inicialmente colonizam a planta no campo e predispõem o produto à contaminação após a colheita, como *A. flavus* (aflatoxina) *P. verucossum*, *Aspergillus ochraceus* e *A. carbonarius* (ocratoxina).

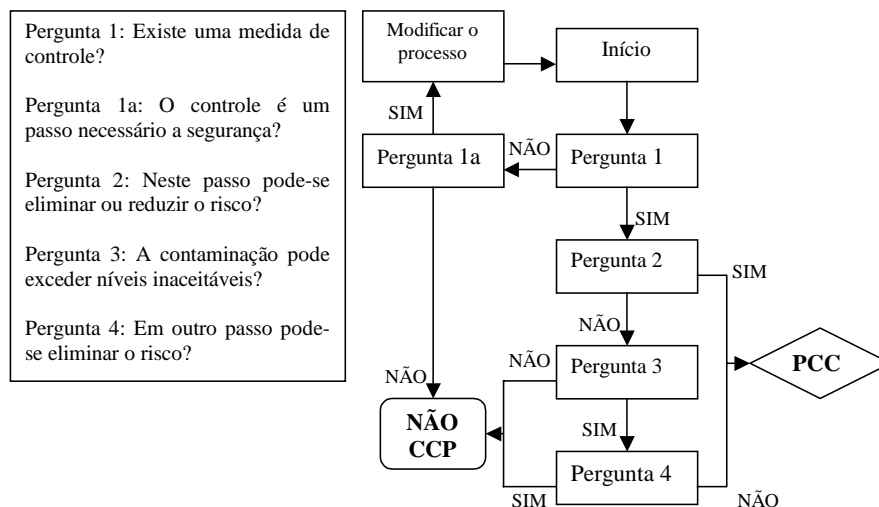
**Perigos biológicos:** são aqueles provocados pela presença de microrganismos ou suas toxinas nos alimentos. Geralmente, são ocasionados pela presença de bactérias. Exemplos de bactérias que causam intoxicações alimentares são *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Escherichia coli* e *Shigella* (SEBRAE, 2000b). Gêneros como *Shigella* e *Salmonella* já foram isolados de frutos de café

(Silva et al.,2000). Porém, pelo tipo de processamento que o produto sofre, estas bactérias não trazem riscos à saúde do consumidor. Quando ocorre a ingestão de células viáveis do microrganismo, colonização e invasão do organismo, a doença é conhecida como infecção alimentar. A ingestão de uma toxina produzida pela bactéria ou fungo, não estando a mesma necessariamente presente no alimento, é conhecida como intoxicação alimentar. A ingestão de micotoxinas é, portanto, intoxicação alimentar gerada por um perigo biológico. Porém, as micotoxinas, por serem substâncias químicas, são classificadas como perigos químicos, como foi anteriormente discutido.

Neste passo, faz-se uma criteriosa análise de todas as fases de produção e dos seus perigos, procurando enquadrá-los dentro dos três grupos. Uma ampla pesquisa bibliográfica no meio científico deverá ser feita para verificar se existe realmente o perigo. Vale ressaltar que a análise de perigo é dinâmica, necessitando de envolvimento da comunidade científica no que diz respeito ao constante monitoramento, análise e manejo dos perigos (Kuiper-Goodman, 1999).

#### **2.7.4.2 PRINCÍPIO 2 – Determinação dos pontos críticos de controle**

Um ponto crítico de controle é uma fase na qual um controle pode ser aplicado, sendo essencial para prevenir, eliminar ou reduzir um risco (Codex, 1997). Na identificação de um ponto crítico de controle, deve-se fazer um questionamento a respeito da fase de produção: a perda de controle daquele ponto pode efetivamente levar a um risco de contaminação pelo consumidor? Se a resposta for sim, então, o ponto deve ser reconhecido como um ponto crítico de controle (Mortimore & Wallace, 1996, 2001). Na identificação de um ponto crítico de controle, uma ferramenta bastante útil é a chave decisória de pontos críticos de controle (Figura 1).



**FIGURA 1** Fluxograma decisório para identificação de pontos críticos de controle

### 2.7.4.3 PRINCÍPIO 3 – Estabelecimento dos limites críticos

Os limites críticos são critérios que diferenciam um produto seguro de um potencialmente perigoso (CODEX, 1997). Os limites são parâmetros que podem ser medidos por meio de testes durante o processo de monitoramento na cadeia produtiva. Os limites críticos são determinados por meio de estudos científicos e o seu estabelecimentos é feito na forma de leis e regulamentos. As principais toxinas já possuem um regulamento que caracteriza um produto inadequado ao consumo se os valores da toxina excederem este limite. O limite imposto pela norma regulativa 123/2005 da União Européia, para café torrado, de no máximo 5µg de ocratoxina A por kg de café é o exemplo de um limite crítico (UE, 2005).

#### **2.7.4.4 PRINCÍPIO 4 – Estabelecimento de um sistema de monitoramento**

Monitorar consiste em medir ou observar determinado parâmetro para garantir que ele está sob controle. Os testes mais aplicados no monitoramento e os preferíveis são aqueles que fornecem um resultado imediato, como temperatura, umidade, detecção de metais, etc. Os testes microbiológicos não são usualmente aplicados ao monitoramento no sistema HACCP devido à praticidade e ao tempo de execução. No caso da detecção de micotoxinas, o monitoramento é feito no produto final, sendo um dos poucos casos na indústria de alimentos em que isso é permitido. Todos os testes realizados durante a fabricação do produto devem ser registrados e armazenados.

#### **2.7.4.5 PRINCÍPIO 5 – Estabelecimento de ações corretivas quando for detectado que determinado parâmetro está fora do controle**

As ações corretivas são definidas para garantir a qualidade dos produtos e que o controle é realmente efetivo. Como o sistema HACCP é preventivo, a criação de mecanismos de ação para agir, caso a segurança do produto esteja comprometida, também é parte integrante do sistema. As ações corretivas devem ser planejadas em duas frentes:

- 1) descartar o produto o que está fora da especificação;
- 2) corrigir o sistema de produção para que o produto tenha a segurança garantida.

É importante destacar que, quando um desvio ocorre, a equipe responsável pela elaboração do plano deve elaborar estratégias para evitar que este ocorra novamente, propondo, se necessário, modificação no sistema de produção.



#### **2.7.4.6 PRINCÍPIO 6 – Estabelecer procedimentos para verificar se o sistema HACCP está funcionando**

Após a implementação do plano, é necessário verificar se o mesmo está efetivamente funcionando. Segundo o CODEX (1997), validar é obter evidências de que os elementos do plano HACCP estão efetivamente funcionando. Verificação é a aplicação de métodos, procedimentos, testes e avaliações adicionais ao monitoramento para determinar conformidade com plano HACCP. Nesta fase do processo, a presença de auditorias internas e externas é essencial para efetivar o plano. A validação do sistema busca, em resumo, responder se o sistema está realmente implementado.

#### **2.7.4.7 PRINCÍPIO 7 – Procedimentos de documentação e registro dos dados do sistema**

A documentação do sistema é necessária para certificar o funcionamento. O tempo de registro das informações pode ser definido pela legislação ou pelo tempo de duração do produto. Neste ponto é importante salientar que a implementação de um sistema da complexidade do HACCP demanda recursos que só poderão gerar retorno econômico ao produtor se algum tipo de certificação for implementada. Assim, as certificadoras irão determinar qual o tipo de registro necessário.

### 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABARCA, M.L. et al. Current importance of ochratoxin A-producing *Aspergillus* spp. **Journal of Food Protection**, v.64, p.903-906, 2001.

ALVES, E.; CASTRO, H.A. Fungos associados ao café (*Coffea arabica* L.) nas fases de pré e pós-colheita em lavouras da região de Lavras. **Summa Phytopathologica**, v.24, p.4-7, 1998.

BATISTA, L.R. **Incidência de fungos produtores de ocratoxina A em grãos de café (*Coffea arabica* L.) pré-processados por via seca e úmida.** 2005. 218p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

BATISTA, L.R. et al. Toxigenic fungi associated with processed (green) coffee beans (*Coffea arabica* L.). **International Journal Food Microbiology**, v.25, p.293-300, ago. 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Manual genérico de procedimentos para APPCC em indústrias de produtos de origem animal. Portaria n. 46 – 10 fev. 1998. **Diário Oficial da União**. Seção 1, p. 24-28, 16 mar.1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. Regulamento técnico para inspeção sanitária de alimentos, Portaria n. 1428, 26 nov. 1993. **Diário Oficial da União**. Seção 1, n. 229, 02 dez. 1993.

BUCHELI, P.; TANIWAKI, M.H. Research on the origin, and on the impact of post-harvest handling and manufacturing on the presence of ochratoxin A in coffee. **Food Additives and Contaminants**, v.19, p. 655-665, 2002.

CAIXETA, I.F. **Maturação fisiológica da semente do cafeeiro (*Coffea arabica* L.) Cv. Mundo Novo.** 1981. 48p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)–Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

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

CODEX, Committee on food hygiene. **HACCP System and guidelines for its Application**. Annexe to RCP 1-1969, Rev 3 in Codex Alimentarius Commission Food Hygiene Basic Texts. Rome, FAO/WHO, 1997.

CORLETT, D.A. **HACCP user's manual**. Aspen: Gaithersburg. 1998. 134p.

FAO. Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003, **FAO Food and Nutrition Paper**, Roma, n.81, 2004.

FAO. Risk management and Food Safety. **FAO Food and Nutrition Paper**, Roma, n. 65, 1997, 32p.

FRANK, J.M. On the activity of fungi in coffee in relation to ochratoxin A production. In: ASIC COFFEE CONFERENCE, 19., 2001, Trieste. **Proceedings...** Trieste, Italy, 2001.

FRANK, M. Mycotoxin prevention and decontamination. In: FAO/WHO/UNEP INTERNATIONAL CONFERENCE, 3., 1999. Tunis. **Proceedings...** Tunis: FAO/WHO/UNEP, 1999. p.01-11

FREITAS, R.F. et al. Ocorrência e severidade da contaminação de grãos de café (*Coffea arabica*) por fungos do gênero *Aspergillus* em diversas propriedades do Sul do Estado de Minas Gerais. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DE CAFÉS DO BRASIL, 1., 2000, Poços de Caldas. **Anais...** Brasília: EMBRAPA, 2000. p.245-248.

FUNGARO, M.H. et al. A molecular method for detection of *Aspergillus carbonarius* in coffee beans. **Current Microbiology**, v.49, p.123-127, 2004.

HARRIS, J.P.; MANTLE, P.G. Biosynthesis of ochratoxins by *Aspergillus ochraceus*. **Phytochemistry**, v.58, p.709-716, 2001.

IARC. **Ochratoxin A**: a monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. Lyon france: World Health Organization-IARC Working group. 1993. v.56, p.250-277.

JOOSTEN H.M. et al. Production of ochratoxin A by *Aspergillus carbonarius* on coffee cherries. **International Journal Food Microbiology**, v.11, p.39-44, 2001.

KAMPA, H.G. Ochratoxin A: induction of (oxidative) DNA damage, cytotoxicity and apoptosis in mammalian cell lines and primary cells. **Toxicology**, v.206, p.413-425, 2005.

KLICH, M.A. **Identification of common *Aspergillus* species**. 5.ed. Utrecht: CBS, 2002. 116p.

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

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

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

KUIPER-GOODMAN, T. Approaches to the risk analysis of mycotoxins in the food supply. In: FAO/WHO/UNEP INTERNATIONAL CONFERENCE ON MYCOTOXINS, 3., 1999, Tunis, Tunisia. **Proceedings...** Tunis, Tunisia, 1999.

LEONI, L.A.B. et al. Ochratoxin A in Brazilian green coffee. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.21, p.105-107, 2001.

LEONI, L.A.B.; SOARES, L.M.V.; OLIVEIRA, P.L.C. Ochratoxin A in Brazilian roasted and instant coffees. **Food Additives and Contaminants**, v.17, p.867-870, 2000.

LEVI, C.P.; TRENK, H.L.; MOHR, H.K. Study of the occurrence of ochratoxin A in green coffee beans, **Journal of Association Official Analytical Chemistry**, v.57, p.866-870, 1974.

MANTLE, P.G.; CHOW, A.M. Ochratoxin formation in *Aspergillus ochraceus* with particular reference to spoilage of coffee. **International Journal Food Microbiology**, v.56, p.105-109, 2000.

MARIN-LOPEZ, S.M. et al. Relación entre el estado de madurez del fruto del café y las características de beneficio, rendimiento y calidad de la bebida. **CENICAFÉ**, Chinchina, v.54, p.297-315, 2003.

MARTINS M.L.; MARTINS H.M.; GIMENO A. Incidence of microflora and of ochratoxin A in green coffee beans (*Coffea arabica*). **Food Additives and Contaminants**, v.20, p.1127-1131, 2003.

MATOS, E.R.; PEREIRA, R.T.G.; PFENNING, L.H. Produção de ocratoxina A por isolados de *Aspergillus carbonarius* e *Aspergillus ochraceus* em diferentes condições de atividade de água e temperatura. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE MICOLOGIA, 5., 2005, Brasília. **Anais...** Brasília, DF: ALAM: 2005. p.126.

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. Incidence of toxigenic and other molds in green coffee beans. **Journal of Food Protection**, n.46, p.969-973, 1983.

MORTIMORE, S.; WALLACE, C. **Food industry briefing series: HACCP.** London: Blackwell Science, 2001. 136p.

MORTIMORE, S.; WALLACE, C. **HACCP: enfoque práctico.** Acribia: Saragoza, 1996.

NORTHOLT, M.D.; BULLERMAN, L.B. Prevention of mold growth and toxin production through control of environmental conditions. **Journal of Food Protection**, v.45, p.519-526, 1982.

OTTENEDER, H.; MAJERUS, P. Ochratoxin A (OTA) in coffee: nation-wide evaluation of data collected by German food Control 1995-1999. **Food Additives and Contaminants**, v.18, p.431-435, 2001.

PALACIOS-CABRERA, H. et al. Growth of *Aspergillus ochraceus*, *A. carbonarius* and *A. niger* on culture media at different water activities and temperatures. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.36, p.24-28, 2005.

PALACIOS-CABRERA, H. et al. The production of ochratoxin A by *Aspergillus ochraceus* in raw coffee at different equilibrium relative humidity and under alternating temperatures, **Food Control**, v.15, p.531-535, 2004.

PARDO, E. et al. Occurrence of ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in green coffee from different Origins. **International Journal of Food Science Technology**, v.10, p.45-50, 2004a.

PARDO, E. et al. Modeling of germination and growth of ochratoxigenic isolates of *Aspergillus ochraceus* as affected by water activity and temperature on a barley-based medium. **Food Microbiology**, v.21, p.267-274, 2004b.

PATERSON, R.R.M.; KOZAKIEWICZ, Z. *Penicillium* and *Aspergillus* Mycotoxins – Diagnostic characters and quantitative data from commodities and cultures, In: EUROPEAN *FUSARIUM* SEMINAR, 5., 1997, Szeged, Hungary. **Proceedings...** Szeged, Hungary, 1997. p.271-275.

PFOHL-LESZKOWICZ, A. et al. Balkan endemic nephropathy and associated urinary tract tumours: a review on aetiological cause and the potential role of mycotoxins. **Food Additives and Contaminants**, v.19, p.282-302, 2002.

PITT, J.I. **A laboratory guide to common *Penicillium* species**. 3.ed. Australia: Food Science. 2000. 197p.

PITT, J.I. et al. Distribution of *Aspergillus ochraceus*, *A. niger* and *A. carbonarius* in coffee in four regions of Brazil. In: ASIC COFFEE CONFERENCE, 19., 2001, Trieste, Italy. **Proceedings...** Trieste, Italy, 2001.

RABIE, C.J. et al. Enumeration of fungi in barley. **International Journal Food Microbiology**, v.35, p.117-127, 1997.

RENA, A.B. **Cultura do cafeeiro: fatores que afetam a produtividade**. Piracicaba: POTAFOS, 1986. 447 p.

ROJAS, U.J.B. et al. Biological treatments affect the chemical composition of coffee pulp. **Bioresource Technology**. v.89, p.267-274, 2003.

ROSSO, L.; ROBINSON, T.P. A cardinal model to describe the effect of water activity on the growth of moulds. **International Journal Food Microbiology**, v.63, p.265-273, 2001.

ROUSSOS, S. et al. Biotechnological management of coffee pulp isolation, screening, characterization, selection of caffeine-degrading fungus and natural microflora present in coffee pulp and husk. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.42, p.756-762, 1995.

SALAZAR, G.M.R. et al. Estudio anatomico y ultraestructural del fruto de cafe *Coffea arabica*. **Cenicafé Revista del centro nacional de investigaciones de café**, Caldas, Colômbia, v.45, p.93-105, 1994.

SAMSON, R.A. et al. **Introduction to food and air-borne fungi**. 6.ed. Baarn, The Netherlands: CBS, 2000. 389p.

SAXENA, J.; MUNIMBAZI, C.; BULLERMAN, L.B. Relationship of mould count, ergosterol and ochratoxin A production. **International Journal Food Microbiology**, v.71, p.29-34, 2001

SCHMIDT, H. et al. Detection and quantification of *Aspergillus ochraceus* in green coffee by PCR. **Letters in Applied Microbiology**, v.38, p.464-469, 2004.

SEBRAE. Serviço brasileiro de apoio às micro e pequena empresas. **Guia para elaboração do plano APPCC: frutas hortaliças e derivados**. Brasília, 2000a. 141p. (Serie Qualidade e Segurança Alimentar).

SEBRAE. Serviço brasileiro de apoio às micro e pequena empresas. **Elementos de apoio para o sistema APPCC**. Brasília, 2000b. 361p. (Serie Qualidade e Segurança Alimentar).

SHEWFELT, R.L. What is quality? **Postharvest biology and technology**, v.15, p.197-200, 1999.

SILVA, C.F. et al. Microbial diversity during maturation and natural processing of coffee cherries of *Coffea arabica* in Brazil. **International Journal Food Microbiology**, v. 60, p. 251-260, 2000.

STEGEN, G. et al. Screening of European coffee final products for occurrence of ochratoxin A (OTA) **Food Additives and Contaminants**, v.14, p.211-216, 1997.

SUÁREZ-QUIROZ, M. et al. Effect of the post-harvest processing procedure on OTA occurrence in artificially contaminated coffee, **International Journal Food Microbiology**, v.103, p.339-345, 2005.

SUÁREZ-QUIROZ, M.; et al. Study of ochratoxin A-producing strains in coffee processing. **International Journal of Food Science Technology**, v.39, p.501-507, 2004.

TANIWAKI, M.H. Meios de cultura para contagem de fungos em alimentos. **Boletim Sociedade Brasileira Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.30, p.132-141, 1996.

TANIWAKI, M.H.; PITT, J.I.; TEIXEIRA, A.A.; IAMANAKA, B.T. The source of ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to processing methods. **International Journal Food Microbiology**, v.25, p.173-179, 2003.

TANIWAKI, M.H.; SILVA, N. da. **Fungos em alimentos: ocorrência e detecção**. Campinas: ITAL, 2001. 82p.

UE, EUROPEAN UNION. Commission Regulation N° 123/2005 of January 2005 amending Regulation (EC) n. 466/2001. **Official Journal of the European Union**. Jan. 2005. (As regard ochratoxin A.)

URBANO, G. R. et al. Occurrence of ochratoxin A producing fungi in raw Brazilian coffee. **Journal of Food Protection**, v.64, p.1226-1230, 2001.

VAN DER MERWE, K. J. et al. **A new fungal toxin: ochratoxin A**, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. Nature, v. 205, p. 1112, 1964.



## **CAPÍTULO 2**

### **DETECÇÃO E MONITORAMENTO DE FUNGOS EM FRUTOS E GRÃOS DO CAFEIEIRO, DURANTE DIFERENTES FASES DO PROCESSAMENTO**

## RESUMO

PEREIRA, Ricardo Tadeu Galvão. Detecção e monitoramento de fungos em frutos e grãos do cafeeiro, durante diferentes fases do processamento. In:\_\_\_\_\_. **Diversidade e frequência de fungos associados a frutos e grãos de café.** 2006. Cap. 2, p.37-59. Tese (Doutorado em Agronomia-Fitopatologia), Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. \*

A maneira como o café é processado pode influenciar no desenvolvimento de fungos e, em consequência, na qualidade e segurança do café. O monitoramento dos fungos associados aos diferentes tipos de café é fundamental na proposição de práticas para garantir a segurança do produto. Objetivo deste trabalho foi detectar e monitorar a presença de fungos em grãos de diferentes tipos de café, com ênfase nos potenciais produtores de ocratoxina A (OTA). Foram coletadas 178 amostras de café dos tipos natural, bóia, verde, cereja descascado e varrição em três regiões produtoras nos anos agrícolas 2002 e 2003. As amostras foram descascadas, desinfestadas e, em seguida, 50 grãos colocados em meio DG18. A avaliação foi feita após 7 dias de incubação. Foram avaliadas a ocorrência de determinada espécie de fungo em uma amostra (incidência) e a porcentagem de grãos colonizados dentro da amostras (frequência). Todas as amostras analisadas apresentavam incidência de pelo menos uma espécie de fungo. Os gêneros de maior incidência foram *Penicillium*, *Fusarium*, *Aspergillus* e *Cladosporium*. *Penicillium* e *Fusarium* estavam presentes em 86 e 78% das amostras, respectivamente. *Aspergillus ochraceus* e *A. niger* estavam presentes em 66 e 60 % das amostras, respectivamente. Os gêneros com maior frequência também foram *Penicillium* e *Fusarium*, colonizando, em média, 12 e 7% dos grãos da amostra, respectivamente. As espécies potencialmente ocratoxigênicas encontradas foram *A. ochraceus*, de ampla distribuição nas amostras e *Aspergillus carbonarius*, encontrado somente em duas amostras. Não houve diferença significativa entre os tipos de cafés quanto à incidência de *A. ochraceus*, a não ser para os cafés de varrição, que apresentaram maior quantidade de grãos colonizados em 2002. *A. ochraceus* foi encontrado em 66% das amostras analisadas, porém, a frequência foi de 5%. Não houve diferença significativa entre os anos de 2002 e 2003 quanto à colonização, por fungos potencialmente ocratoxigênicos.

---

\* Comitê de Orientação: Ludwig H. Pfenning – UFLA (orientador); Hilário Antônio de Castro – UFLA (co-orientador)

## ABSTRACT

PEREIRA, Ricardo Tadeu Galvão. Detection and monitoring of fungi in fruits and grains of the coffee plant, during different phases of the processing. In: \_\_\_\_\_. **Diversity and frequency of fungus associated to fruits and beans of arabic coffee**. 2006. Cap. 2, p.37-59. Thesis (Doctorate in Agronomy-Phytopathology), Federal University of Lavras, Lavras, MG.\*

The way of coffee processing is complex and can influence on the development of fungi and, by consequence, on quality and safety of the final product. Monitoring of fungi living in natural association with different types of coffee is a prerequisite for the proposal of recommendations which aim to guarantee safety of coffee. Objective of the present study was to evaluate diversity and frequency of fungi associated to cherries and parchments in different types of coffee, with emphasis on ochratoxin producing species. For monitoring fungi in different types of coffee like natural, semi-washed, boia, immature and “varrição” coffee, 178 samples were collected in 2002 and 2003 in the regions South and Mountains of Minas Gerais and Mountains of Espírito Santo. Samples were processed by dehusking, superficial desinfestation and incubation of 50 parchments of each sample on culture medium DG18. Growth of fungi was evaluated after 7 days. Incidence of species in a sample was registered as well as frequency, given as the percentage of parchments colonized within a individual sample. Each sample analysed was colonized by at least one fungal species. Genera with highest incidence were *Penicillium*, *Fusarium*, *Aspergillus* and *Cladosporium*, with *Penicillium* and *Fusarium* present in 86 and 78% of the samples, respectively. *Aspergillus niger* was present in 66 % and *Aspergillus ochraceus* in 60 % of the samples. Indeed, frequency was very low with 5 %. Most frequent have been species of *Penicillium* and *Fusarium*, colonizing 12 and 7% of the parchments of the sample, respectively. The potentially ochratoxigenic species *A. ochraceus* and *A. carbonarius* were identified, the former showing a wide, the latter a quite restricted distribution. No difference in frequency of *Aspergillus ochraceus* could be observed in different types of coffee, except in “varrição” coffee.

\* Advising Committee : Ludwig H. Pfenning – UFLA (adviser); Hilário Antônio de Castro – UFLA (co-adviser)

## 1 INTRODUÇÃO

A qualidade do café pode ser influenciada por diversos fatores, entre eles a espécie, a cultivar utilizada, o manejo da lavoura, o processamento e a presença e a atuação de microrganismos, principalmente fungos filamentosos.

Os fungos podem influenciar a qualidade do café de duas maneiras distintas, agindo sobre os grãos, interferindo nas características organolépticas do produto e alterando seu sabor e odor, ou produzindo metabólitos tóxicos ao homem, conhecidos como micotoxinas, destacando-se a ocratoxina A, a qual já chegou a limitar a exportação em alguns países. A OTA é uma micotoxina produzida por algumas espécies de fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium*. Os efeitos agudos, nefrotóxicos, imunossupresivos e carcinogênicos da OTA já estão bem caracterizados em animais, sendo também, possivelmente, carcinogênico a humanos (IARC, 2003; Pfohl-Leszkowicz et al., 2002).

As principais espécies potencialmente ocratoxigênicas presentes em grãos e frutos de café no Brasil são *Aspergillus ochraceus*, de ampla distribuição nas principais regiões produtoras e *Aspergillus carbonarius*, de ocorrência aparentemente restrita (Batista et al., 2003; Taniwaki et al., 2003). Apesar da inconsistência dos dados entre contaminação por fungos e presença de OTA, a colonização de grãos de café por fungos potencialmente ocratoxigênicos envolve o risco de contaminação pela OTA, não existindo, até o momento, evidências da contaminação sem a presença de fungos.

Existe uma grande diversidade de tipos de processamento de café praticados no país, o que gera uma ampla variedade de substratos. Estes substratos são os diferentes tipos de café, destacando-se os naturais, os cerejas descascados, os bóias, os verdes, os secos na planta e os de varrição.

A presença de fungos em diferentes tipos de café já foi estudada por alguns autores (Batista, 2005; Batista et al., 2003; Taniwaki et al., 2003). Entretanto, existe uma grande diferença entre as metodologias adotadas, o que impossibilita uma comparação direta dos resultados dados e a suposição dos verdadeiros riscos de cada tipo de café.

O monitoramento das espécies de fungos presentes nos grãos de café pode fornecer, ainda, dados importantes sobre a ecologia destes fungos e, assim, facilitar a proposição de técnicas de manejo que minimizem o risco da contaminação pela toxina baseado em dados científicos.

Assim, o objetivo do presente capítulo foi monitorar a presença de fungos, especialmente os potencialmente ocratoxigênicos, em amostras de diferentes tipos de café.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Amostras

Foram coletadas 178 amostras de café, em propriedades cafeeiras de três importantes regiões produtoras de café no Brasil, Sul e Zona da Mata do estado de Minas Gerais e Montanhas do estado do Espírito Santo, entre as latitudes de 20°07' a 21°43S e longitudes de 41°11' a 45°31' W e altitudes entre 711 m e 1176, nos anos de 2002 e 2003. Aproximadamente dois quilos de café foram coletados diretamente nos terreiros de café, em sacos de papel limpo. A seguir faz-se uma breve caracterização dos tipos de café coletados.

**Cereja:** é o fruto maduro do cafeeiro. É caracterizado pela cor amarela ou vermelha intensa, dependendo da variedade. No processamento, este tipo de fruto é, normalmente, colhido junto com todos os outros tipos de frutos e separado em um equipamento conhecido como lavador/separador, no qual a fração cereja+verde é depositada separadamente. As amostras caracterizadas como cereja em nosso estudo foram coletadas diretamente nas plantas, separando-se os frutos com maturação incompleta ou que apresentassem sinais da presença de patógenos.

**Natural:** as amostras caracterizadas como cafés do tipo natural são aquelas secas em terreiro ou secador, sem passar por qualquer tipo de pré-processamento. Os cafés naturais são uma mistura de cafés do tipo verde, bóia e cereja, secos em terreiro ou secador, exatamente como são coletadas no campo. São conhecidos também como cafés da roça. Alguns autores consideram como cafés naturais os produzidos pela via seca. Neste estudo foram considerados como naturais os cafés com as características citadas.

**Bóia:** este tipo de amostra tem como característica a menor densidade, principalmente devido à perda de água ocasionada pela secagem. Os frutos do tipo bóia são facilmente separados no lavador separador, sendo, em muitas propriedades, secos separadamente dos demais tipos.

**Bóia descascado:** é obtido procedendo-se um descascamento mecânico nos frutos assim que eles saem do lavador/separador. Os frutos do tipo bóia passam por um cilindro duplo rotativo na presença de grande quantidade de água onde a casca é removida. Este tipo de café foi observado, principalmente, em propriedade do estado do Espírito Santo.

**Verde:** é o fruto imaturo do cafeeiro, caracterizado pela cor verde-cana e pela presença de grande quantidade de compostos fenólicos. Pode ser encontrado no terreiro, juntamente com os frutos do tipo cereja ou isoladamente onde se faz o descascamento de cerejas.

**Varrição:** são os frutos coletados diretamente do chão, normalmente antes da realização da colheita. Constitui-se, em proporções variáveis, de uma mistura de terra, paus, pedras e cafés dos tipos cereja, verde, e secos que caíram da planta. O tempo de permanência em contato com o solo e a quantidade de varrição de uma lavoura são variáveis, mas, normalmente, se acentuam no final da colheita.

**Cereja descascado:** é o tipo de café mais comum obtido pela via úmida de processamento. Os cafés vindos diretamente da colheita são separados e a fração cereja+verde é passada em uma peneira rotativa, na qual as cascas das cerejas se desprendem e os grãos sem casca são forçados a passar por orifícios onde são separados. Os frutos verdes são separados em função de sua resistência ao descascamento.

**Desmucilado:** os cafés cereja descascado, obtidos como descrito no processo anterior, podem, ainda, passar por um cilindro na presença de água, em que resíduos da mucilagem são removidos.

**Seco na planta (SNP):** este tipo de café é coletado diretamente na planta e apresenta características semelhantes aos do tipo bóia.

O critério utilizado na coleta das amostras foi o de recolhimento de todos os tipos possíveis de cafés presentes nas propriedades, gerando uma estratificação natural das amostras (Tabela 1).

**TABELA 1** Tipos, características e quantidade de amostras coletadas nos anos de 2002 e 2003.

Tipo	Nº de amostras analisadas	
	2002	2003
Cereja (CR)	9	7
Natural (NA)	22	11
Bóia (BO)	26	10
Bóia descascado (BD)	2	4
Verde (VE)	13	4
Varrição (VR)	9	4
Cereja descascado(CD):	26	7
Desmucilado (DM)	4	2
Seco na planta (SNP):	14	4
<b>Total</b>	<b>125</b>	<b>53</b>

## 2.2 Processamento

Todas as amostras foram descascadas em descascador manual separando-se a casca e os grãos. Os grãos foram desinfestados com hipoclorito 1% por 1 minuto e enxaguados em água estéril. Após a secagem em papel de filtro, sessenta grãos foram plaqueados com a face plana voltada para baixo,



divididos em 3 placas de 15 cm de diâmetro contendo meio DG18 (176 g de glicerol, 8,0 g de glicose, 4,0 g de peptona, 0,80 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,4 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 800 mL de água, 15g de agar, 75 mg de chloramphenicol e 2mg de dichloran).

Para o estudo da comunidade interna dos frutos tipo cereja, as cascas dos grãos foram removidas manualmente e os grãos foram agitados em solução de NaOH 0,2 N por 10 minutos com a finalidade de remover a mucilagem residual. Os grãos foram colocados sob papel de filtro em câmara de fluxo laminar por duas horas, para a remoção da água em excesso e foram plaqueados, conforme o procedimento anterior.

Avaliou-se, diretamente na placa, a colonização dos grãos por diferentes morfo-tipos, separando grupos de acordo com a morfologia, textura, coloração, formato dos esporos, etc. Todos os morfo-tipos considerados diferentes foram isolados em meio de extrato de malte 2% (20 g de extrato de malte, 16 g de Agar e 1 litro de água). Foi registrado, na leitura, o número de grãos colonizados por determinados tipos de fungos. Posteriormente, os dados foram transformados em percentagem de grãos colonizados por cada espécie.

### **2.3 Transformação dos dados e análises estatísticas**

A porcentagem de grãos colonizados foi calculada multiplicando-se o número de grãos colonizados por 100 e dividindo-se pelo número de grãos plaqueados. A identificação dos fungos foi feita utilizando informações da literatura especializada. Foram utilizados os termos incidência, para indicar a presença ou não de um determinado fungo em uma amostra e frequência, para indicar a porcentagem de grãos colonizados em determinada amostra.

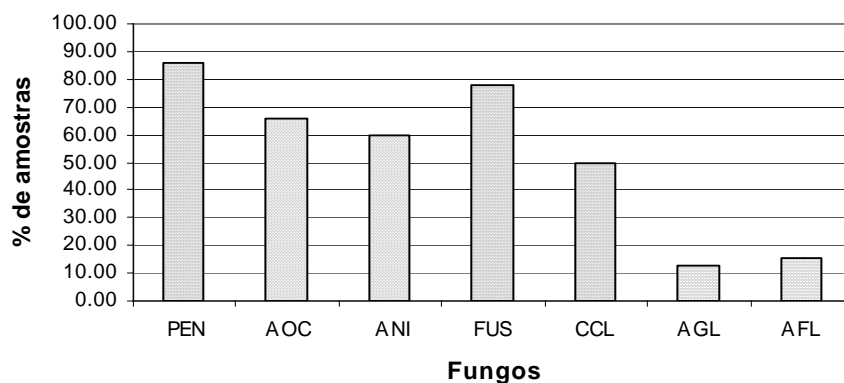
Foi realizada análise estatística dos dados com desdobramento dos tipos dentro de cada ano. Foram realizado teste f para o fator ano e para o fator tipo foi utilizado o teste Scott-Knott. Para fins de análise os dados foram

transformados em raiz quadrada de  $x + 0,5$ . A análise global das comunidades de fungos foi feita por meio de análise multivariada de classificação. Foi gerado um dendrograma considerando os dados da colonização das amostras por *Penicillium spp.*, *Cladosporium cladosporioides*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* e *Eurotium spp.*, utilizando o programa Biodiversity Pro 2.0. As análises estatísticas foram feitas utilizando-se o programa Sisvar versão 4.6 e o pacote estatístico do Excel 2000.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Ocorrência e frequência de fungos

Houve incidência de, pelo menos, uma espécie de fungos nas 178 amostras analisadas. Os gêneros de maior incidência nas amostras foram *Penicillium*, *Fusarium*, *Aspergillus* e *Cladosporium* (Figura 1). *Penicillium* e *Fusarium* estavam presentes em 86% e 78% das amostras, respectivamente. *Aspergillus* do grupo *ochraceus* e do grupo *niger* estava presente em 66% e 60% das amostras, respectivamente.



PEN: *Penicillium* spp; AOC: *Aspergillus ochraceus*; ANI: *Aspergillus niger*; FUS: *Fusarium* spp.; CCL: *Cladosporium cladosporioides*; AGL: *Aspergillus glaucus*; AFL: *Aspergillus flavus*.

**FIGURA 1** Incidência média nas amostras de diferentes espécies de fungos. Lavras, MG. 2006

Os gêneros de maior frequência foram *Penicillium* e *Fusarium* colonizando, em média, 12% e 7% dos grãos, respectivamente. Dentro do gênero *Aspergillus*, destacaram-se as espécies do grupo *ochraceus*, *niger*, *flavus*

e *glaucus*, colonizando, respectivamente, 5%, 4%, 0,4% e 0,2% dos grãos de cada amostra.

**TABELA 2** Porcentagem média de amostras com ocorrência (**incidência**) e porcentagem média de grãos colonizados (**freqüência**) por determinado tipos de fungos. Média de dois anos para os diversos tipos de café. Lavras, MG 2006.

	Fungos						
	PEN	AOC	ANI	FUS	CCL	AGL	AFL
% de amostras com presença do fungo	85,96	65,73	59,55	78,09	50,00	12,92	15,17
% de grãos colonizados por amostras	12,37	5,20	4,09	7,26	2,11	0,42	0,21

PEN: *Penicillium* spp; AOC: *Aspergillus ochraceus*; ANI: *Aspergillus niger*; FUS: *Fusarium* spp.; CCL: *Cladosporium cladosporioides*; AGL: *Aspergillus glaucus*; AFL: *Aspergillus flavus*.

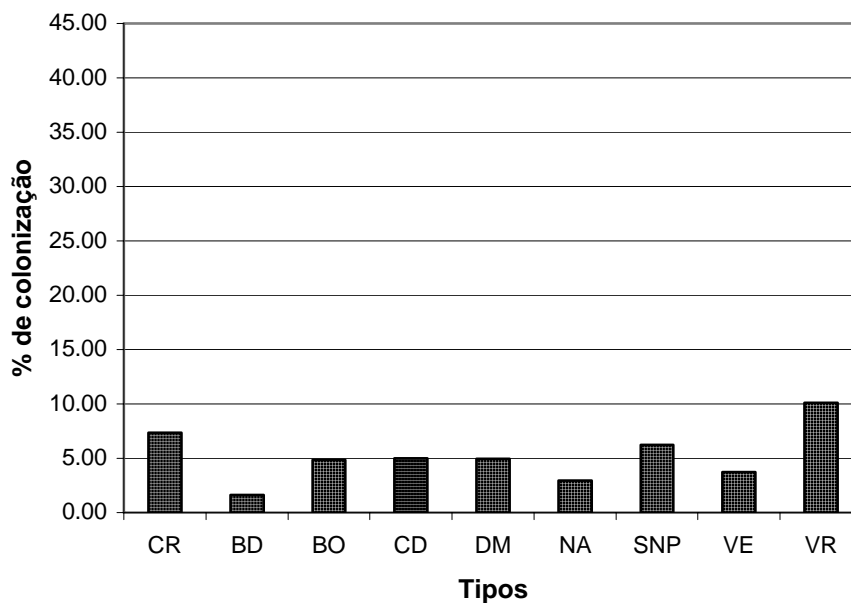
### 3.2 Incidência e freqüência e o ano agrícola

Não houve diferença significativa entre os dois anos, quanto à colonização por fungos, pelo teste f a 95% de confiança.

### 3.3 Incidência e freqüência de espécies toxigênicas nos diferentes tipos de café

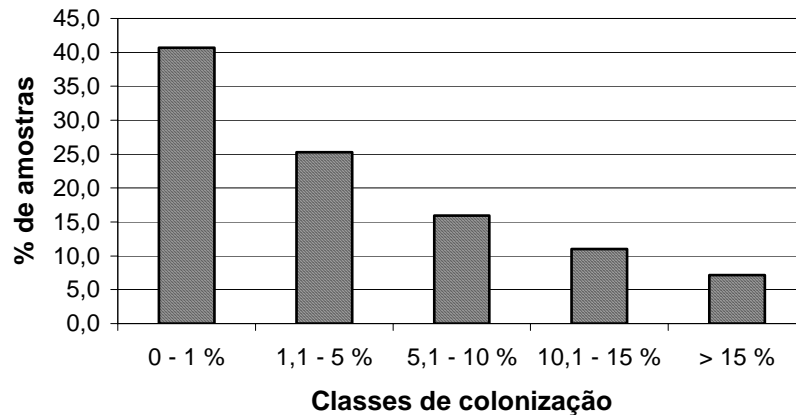
Duas espécies potencialmente ocratoxigênicas foram encontradas, *Aspergillus ochraceus* e *Aspergillus carbonarius*. A análise estatística do desdobramento do fator tipo de café evidenciou que, no ano de 2002, somente houve diferença estatística quanto à colonização por *Aspergillus ochraceus* nos cafés de varrição que apresentaram uma maior quantidade de grãos colonizados. No ano de 2003, não houve diferença estatística quanto à colonização por *Aspergillus ochraceus*, nos diferentes tipos de café.

A incidência de *Aspergillus ochraceus* é relativamente alta, porém, com baixa frequência de grãos colonizados. Do total de 65% de amostras com incidência de *Aspergillus ochraceus*, somente em 4% das amostras mais de 20% dos grãos estavam colonizados (Figura 2). A distribuição das frequências é decrescente, não tendo sido encontrado *Aspergillus ochraceus* em 34% das amostras (Figura 3). Além da principal espécie produtora de OTA, outras espécies produtoras da seção circumdati foram encontradas, sendo estas *Aspergillus melleus*, *Aspergillus sclerotiorum*, *Aspergillus sulphureus*. *Aspergillus carbonarius*, outra espécie potencialmente toxigênica, teve ocorrência restrita a duas amostras.



CR: Cereja; BD: Bóia descascado BO: Bóia; CD: Cereja Descascado; DM: Desmucilado; NA: Natural; SNP: Seco no Pé; VE: Verde; VR: Varrição

**FIGURA 2** Porcentagem de grãos colonizados por *Aspergillus ochraceus* em diferentes tipos de café. Lavras, MG, 2006.



**FIGURA 3** Distribuição das amostras, de acordo com a porcentagem de grãos colonizados por *Aspergillus ochraceus*.

### 3.4 Ocorrência e frequência de espécies de *Fusarium* spp nos diferentes tipos de café

Houve diferença significativa na colonização dos grãos por espécies de *Fusarium* somente nos cafés do tipo cereja e bóia, em que 29,5% e 12% dos grãos estavam colonizados no ano de 2002. No ano de 2003, nenhuma diferença significativa entre os tipos de café estudados e a colonização foi registrada. As espécies de *Fusarium* encontradas foram *Fusarium stilboides*, *F. semitectum* e *F. oxysporum*.

### 3.5 Ocorrência e frequência de *Cladosporium cladosporioides* nos diferentes tipos de café

*Cladosporium cladosporioides* colonizou principalmente os frutos do tipo cereja, com frequência de 7%, e 14% dos grãos, nos anos de 2002 e 2003, respectivamente. Não houve diferença significativa entre os anos de 2002 e

2003. Uma única espécie de *Cladosporium* foi encontrada, identificada como *Cladosporium cladosporioides*.

### **3.6 Ocorrência e frequência de *Penicillium* spp. diferentes tipos de café**

Houve diferença significativa em relação à incidência de *Penicillium* spp. nas amostras nos anos de 2002 e 2003. No ano de 2003, 13% dos grãos estavam colonizadas por *Penicillium* spp., enquanto que em 2002, em média 10% dos grãos estavam colonizados. No ano de 2002, não houve diferença entre a colonização por *Penicillium* spp. nos diferentes tipos de café. Em 2003, as amostras de café seco no pé, cereja e desmucilado foram as com maior porcentagem de grãos colonizados com 4,5%, 4,9 e 6,3% dos grãos colonizados, respectivamente. Dentro do gênero *Penicillium* foram identificadas as espécies *Penicillium solitum*, *P. commune*, *P. brevicompactum*, *P. glabrum*, *P. purpurogenum*, *P. raistrickii*, *P. citrinum*, *P. crustosum* e *P. funiculosum*. A identificação das espécies de *Penicillium* diretamente na placa de leitura não é confiável, sendo necessários o isolamento e a identificação, utilizando métodos específicos.

### **3.7 Análise de agrupamento dos tipos**

A análise de agrupamento dos tipos de café estudados, considerando a colonização pelas principais espécies encontradas, revelou uma maior similaridade entre os cafés tipo seco no pé, natural, verde e cereja descascado, sendo um grupo particular reservado aos cafés varrição e cereja (Figura 4).



CR: cereja; BO: bóia; CD: cereja descascado; NA: natural; SNP: seco no pé; VE: verde; VR: varrição

**Figura 4** Dendrograma diferenciando os tipos de cafés de acordo com a percentagem total de colonização por fungos.



## 4 DISCUSSÃO

*Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium* e *Cladosporium* são os principais gêneros de fungos associados a frutos e grãos do cafeeiro (Batista, 2005; Suarez-Quiroz et al., 2004; Batista et al., 2003; Martins et al., 2003; Joosten et al., 2001; Silva et al., 2000; Alves e Castro, 1998). *Penicillium*, *Fusarium*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus niger* e *Cladosporium cladosporioides* têm ampla incidência nas amostras e uma frequência de grãos colonizados relativamente baixa.

Especificamente para *Aspergillus ochraceus*, espécie de maior risco para qualidade do produto, esta característica de alta incidência e baixa frequência, é bem evidente e foi também constatado por Batista (2005). *Aspergillus ochraceus* estava presente em 65% das amostras, porém, a quantidade de amostras com mais de 20% dos grãos colonizados não ultrapassa 4%. Índices de ocorrência de *Aspergillus ochraceus* de até 80% já foram constatados quando se analisaram amostras de café do tipo varrição (Batista, 2005).

Comparando diferentes tipos de café, maiores índices de colonização por *Aspergillus ochraceus* foram verificados no tipo varrição. Os riscos dos cafés de varrição já foram evidenciados por diversos autores (Taniwaki et al., 2003; Martins et al., 2003; Moraes et al., 2003; Bucheli & Taniwaki, 2002). Em frutos de varrição coletados em diferentes regiões do Brasil e plaqueados diretamente em meio DG18 até 6% dos grãos estavam colonizados por *Aspergillus ochraceus* (Taniwaki et al., 2003). Frutos de cafés do tipo varrição, coletados em diversos municípios de Minas Gerais, apresentaram níveis de colonização dos grãos por *Aspergillus ochraceus* de até 72% (Batista et al., 2003). A contaminação em níveis muito acima do permitido pela legislação, com conteúdo de ocratoxina de 71 µg/kg já foi constatada em cafés coletados em

diversas propriedades do Brasil (Moraes et al., 2003). Neste estudo, foram analisados os fungos que, efetivamente, estão em contato com o grão e os níveis de colonização por *Aspergillus ochraceus* foram de 12%, em média. Nas fazendas, os cafés de varrição podem permanecer em contato com o solo por um período de algumas horas ou até meses. Nesse período, se o café for exposto a condições climáticas que favoreçam a produção de toxina pelo fungo, os níveis de contaminação podem ser elevados (Palácios-Cabrera et al., 2004).

Os níveis de colonização semelhantes encontrados nas amostras ajudam a reforçar a hipótese de que a colonização por *Aspergillus ochraceus* ocorre ainda no campo, com o fruto aderido a planta. Assim, utilizando-se a metodologia adequada, foi possível recuperar os fungos potencialmente toxigênicos em todos os tipos de café e com a segurança de que estes fungos efetivamente estavam em contato com grãos, pois a casca foi retirada. A comparação entre diferentes tipos de processamento e a colonização por espécies produtoras de OTA em cafés do México também não revelou diferenças entre os tipos de café (Suarez-Quiroz, 2004).

Apesar da semelhança entre os níveis de colonização das amostras, alguns tipos de café podem oferecer maior risco à segurança do produto. A umidade acima de 12% já foi comprovada como um risco à segurança do produto, principalmente quando o tempo de permanência nesta condição é prolongado (Palácios-Cabrera et al., 2004). O tipo de café que pode permanecer com teores de umidade elevados por mais tempo no campo são os que secam aderidos à planta. Estes nada mais são que frutos que passaram do ponto ideal de colheita e dependendo do clima se as condições de umidade e temperatura ideais a produção da OTA forem atingidas, pode haver contaminação dos grãos. Dependendo do tempo em que estas condições forem mantidas, altos índices de contaminação podem ser alcançados. A ocorrência de *Aspergillus ochraceus* em frutos coletados diretamente das plantas já foi observada em outros estudos. Em

análise de frutos coletados diretamente da planta sem a retirada da casca, até 2% dos frutos estavam colonizados por *Aspergillus ochraceus* (Taniwaki et al., 2003).

Os cafés do tipo cereja, apesar de atenderem às condições para a produção de toxina como Aw adequado, restringem o desenvolvimento de *Aspergillus ochraceus*. A grande disponibilidade de água, espécies de leveduras e fungos filamentosos, como *Fusarium* e *Cladosporium*, levam grande vantagem competitiva, não permitindo a colonização por *Aspergillus ochraceus*, que tem caráter mais xerofílico (Frank, 2001; Suarez-Quiroz et al., 2004). Esta colonização acentuada por espécies que crescem mais adequadamente em ambientes com maior disponibilidade de água também foi constatada em nosso trabalho, tendo as espécies de *Fusarium* e *Cladosporium* sido recuperadas em maior quantidade no fruto cereja. Além da restrição com relação à competição, o fruto cereja ainda contém compostos fenólicos que apresentam efeito fungistático e são degradados a medida que o fruto perde água.

Cereja descascado e desmucilado são cafés que dificilmente, em propriedades bem manejadas, sofrerão a contaminação pela OTA. Os cafés cereja descascado e desmucilado tiveram uma média de 4,75 e 4,2% de grãos colonizados, respectivamente, porém, este tipo de café é semelhante ao café cereja até o seu processamento. Após o processamento, torna-se um produto que perde água muito rapidamente. Normalmente, as condições climáticas nos meses de secagem de café são de baixa umidade relativa; cafés sem a casca, como os cereja descascado e desmucilado, não permanecem com umidades superiores a 12% por períodos maiores que 7 dias, sendo este período muito curto para a produção da OTA. Com umidade relativa de 80% foram necessários mais de 46 dias de incubação para que a OTA fosse detectada em níveis de 1,9 µg/kg em grãos de café (Palácios-Cabrera et al., 2004).

Os cafés do tipo verde também constituem um baixo risco à segurança do produto. A presença de uma alta quantidade de compostos fenólicos impede o desenvolvimento de fungos (Ramirez-Coronel et al., 2004).

O agrupamento considerando a população total de fungos também está relacionado aos fatores ambientais discutidos acima. Os cafés de varrição são agrupados devido à maior colonização proveniente do contato com o solo, onde condições ideais de umidade podem ser encontradas para a colonização por fungos. O agrupamento dos cafés do tipo cereja se deve às suas características particulares diferentes de outros grupos, destacando-se a alta umidade e a possível presença de compostos fenólicos que ainda não foram degradados. O terceiro grupo é constituído por cafés do tipo cereja descascado, natural, verde e seco no pé, os quais possivelmente se agrupam por serem submetidos à secagem, que tende a nivelar as comunidades de fungos existentes. Dentro deste subgrupo pode-se destacar, ainda, a semelhança entre os cafés do tipo verde e cereja descascado. Esta similaridade pode ser explicada pela menor incidência de fungos, sendo a do cereja descascado em função da secagem rápida e a do verde pela presença de compostos fenólicos.

A colonização do grão por um fungo potencialmente ocratoxigênico não significa que o mesmo esteja contaminado por OTA (Frank, 2001). Entretanto, a importância da carga microbiana no aumento do risco da contaminação pela OTA já foi comprovada. O aumento do número de esporos de *Aspergillus ochraceus* em grãos de arroz de  $10^1$  para  $10^6$  conídios/g incrementou a produção de OTA após 7 dias de incubação a 25° C de 2µg/g para 7µg/g (Saxena et al., 2001). Comparando-se os resultados desse autor com os dados obtidos em nosso trabalho, poder-se-ia considerar os cafés de varrição, com até 15% de grãos colonizados, com um risco até 3,5 vezes maior, quando comparado com um café desmucilado com 1% de colonização, quando as condições ideais para a produção da toxina forem atingidas.

## 5 CONCLUSÕES

1. A colonização por *Aspergillus ochraceus* é semelhante, independente do tipo de café, exceto para os cafés de varrição que, em geral, apresentaram uma maior porcentagem de grãos colonizados.
2. Não houve diferença significativa entre os anos, quanto à colonização pelos diferentes tipos de fungos.
3. As principais espécies de fungos recuperadas de grãos de cafés são *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus* e *Cladosporium*.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

ALVES, E.; CASTRO, H.A. Fungos associados ao café (*Coffea arabica* L.) nas fases de pré e pós-colheita em lavouras da região de Lavras. **Summa Phytopathologica**, v.24, p.4-7, 1998.

BATISTA, L.R. **Incidência de fungos produtores de ocratoxina A em grãos de café (*Coffea arabica* L.)** pré-processados por via seca e úmida. 2005. 218 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

BATISTA, L.R. et al. Toxigenic fungi associated with processed (green) coffee beans (*Coffea arabica* L.) **International Journal of Food Microbiology**, v.25, p.293-300, 2003.

BUCHELI, P.; TANIWAKI, M.H. Research on the origin, and on the impact of post-harvest handling and manufacturing on the presence of ochratoxin A in coffee. **Food Additives and Contaminants**, n.19, p.655-665, 2002. Revisão.

FRANK, M. Mycotoxin prevention and decontamination. In: FAO/WHO/UNEP INTERNATIONAL CONFERENCE, 3., 2001, Tunis. **Proceedings...** Tunis: FAO/WHO/UNEP, 2001.

IARC, International agency for research cancer. **Ochratoxin A:** a monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. Lyon france: World Health Organization-IARC Working group, 1993. v.56, p. 250-277.

JOOSTEN H.M. et al. Production of ochratoxin A by *Aspergillus carbonarius* on coffee cherries. **International Journal of Food Microbiology**, v.11, p.39-44, 2001.

MARTINS, M.L.; MARTINS H.M.; GIMENO A. Incidence of microflora and of ochratoxin A in green coffee beans (*Coffea arabica*). **Food Additives and Contaminants**, v.20, p.1127-1131, 2003.

MORAES, M.H.P.; LUCHESE, R.H. Ochratoxin a on green coffee: influence of harvest and drying processing procedures. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.51, p.5824-5828, 2003.

PALACIOS-CABRERA, H. et al. The production of ochratoxin A by *Aspergillus ochraceus* in raw coffee at different equilibrium relative humidity and under alternating temperatures, **Food Control**, v.15, p.531-535, 2004.

PFOHI-LESZKOWICZ, A. et al. Balkan endemic nephropathy and associated urinary tract tumours: a review on aetiological cause and the potential role of mycotoxins. **Food Additives and Contaminants**, v.19, p.282-302, 2002.

RAMIREZ-CORONEL, M.A. et al. Characterization and estimation of proanthocyanidins and other phenolics in Coffee Pulp (*Coffea arabica*) by thiolysis-high-performance liquid chromatography. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.52, p.1344-1349, 2004.

SAXENA, J.; MUNIMBAZI, C.; BULLERMAN, L.B. Relationship of mould count, ergosterol and ochratoxin A production. **International Journal of Food Microbiology**, v.71, p.29-34, 2001.

SILVA, C.F. et al. Microbial diversity during maturation and natural processing of coffee cherries of *Coffea arabica* in Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v.25, p.251-260, Sept., 2000.

SUAREZ-QUIROZ, M. et al. Study of ochratoxin A-producing strains in coffee processing. **International Journal of Food Science and Technology**, v.39, p.501-507, 2004.

TANIWAKI M.H. et al. The source of ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to processing methods. **International Journal of Food Microbiology**, v.25, p.173-179, 2003.

URBANO, G.R. et al. Occurrence of ochratoxin A producing fungi in raw Brazilian coffee. **Journal of Food Protection**, v.64, n.8, p.1226-1230, 2001.

## **CAPÍTULO 3**

### **FUNGOS EM FRUTOS E GRÃOS DE CAFÉ COM PERMANÊNCIA PROLONGADA NA PLANTA.**



## RESUMO

PEREIRA, Ricardo Tadeu Galvão. Fungos em frutos e grãos de café com permanência prolongada na planta. In: \_\_\_\_\_. **Diversidade e frequência de fungos associados a frutos e grãos de café**. 2006. Cap. 3, p.60-86. Tese (Doutorado em Agronomia-Fitopatologia), Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.\*

Diversas espécies de fungos podem ser encontradas em associação natural com o fruto do cafeeiro. Antes do início da senescência esta comunidade mantém um equilíbrio com o fruto e a associação é assintomática. Estes saprófitas podem ter papel na degradação dos tecidos do fruto e às vezes podem esporular visivelmente sob o fruto maduro. Entre estes fungos estão espécies micotoxigênicas sendo a mais importante em café *Aspergillus ochraceus*. Outras espécies podem depreciar a qualidade da bebida, mas, sem conseqüências à saúde. Todos estes fungos podem ser encontrados nos frutos saudáveis antes da colheita. Este cenário sugere que os frutos que secam aderidos a planta mais lentamente que no terreiro, pode facilitar o desenvolvimento de fungos indesejáveis comprometendo a qualidade e a segurança. O objetivo deste estudo foi avaliar o desenvolvimento de fungos e contaminação por OTA durante a secagem aderido a planta comparando com a secagem no terreiro. Amostras de 20 L de café foram coletadas em duas áreas experimentais próximas a Lavras, Sul do estado de Minas Gerais, em três ocasiões de junho a agosto de 2004. Estas amostras foram divididas e analisadas imediatamente após a colheita ou após a secagem em terreiro. As coletas foram feitas no ponto ideal de colheita quando aproximadamente 70% das frutas estavam maduros, depois de 30 dias e finalmente após de 60 dias. Cada amostra foi caracterizada quanto ao seu perfil de maturação, atividade de água, colonização por fungos e contaminação por OTA nas cascas e grãos. A porcentagem de grãos colonizados com de *A. ochraceus* após 0, 30 e 60 dias após o tempo ideal de colheita foi de 2, 8 e 6% respectivamente. Após a secagem no terreiro, a taxa de colonização para a maioria das espécies de fungos diminuiu, porém a de *A. ochraceus* não mudou. Análise de OTA mostrou que 9 das 96 amostras continham níveis detectáveis de OTA. Cinco eram da casca e quatro de grãos. O valor mais alto encontrado foi na casca do tratamento que secou no pé por 30 dias seguido da secagem em terreiro. Esta também era a única amostra com OTA na casca e no grão. Oito das

---

\* Comitê de Orientação: Ludwig H. Pfenning – UFLA (orientador); Hilário Antônio de Castro – UFLA (co-orientador)

amostras positivas secaram na planta após 30 ou 60 dias, e cinco não secaram no terreiro. O aumento observado na frequência de colonização dos grãos por *Aspergillus ochraceus*, uma espécie produtora de OTA espécies, durante a secagem do fruto aderido a planta indica que há um maior risco de contaminação pela OTA se a colheita passa do ponto ideal, pelo menos em áreas onde condições climáticas não são secas durante o período de colheita.

## ABSTRACT

PEREIRA, Ricardo Tadeu Galvão. Fungy in fruits and grains of coffee with prolonged permanence in the plant. In: \_\_\_\_\_. **Diversity and frequency of fungi associated to fruits and beans of coffee**. 2006. Cap. 3, p.60-86. Thesis (Doctorate in Agronomy-Phytopathology), Federal University of Lavras, Lavras, MG.\*

Several species of fungi can be found in natural association with the coffee fruit. Before the onset of senescence this community maintains an equilibrium with the fruit and the association is symptom-less. These saprophytes may play a role in the degradation of the fruit tissue and sometimes produce visible sporulating structures on over-mature fruits. Among these fungi are mycotoxigenic species being the most important one in coffee *Aspergillus ochraceus*. Other species may produce taints in the cup but no adverse health consequences. All these fungi can be found in the healthy fruit before harvest. This scenario suggests that tree dried fruits, which dry more slowly than by terrace drying, may encourage the development of undesirable fungi and compromise its quality and safety. The objective of this study was to evaluate the development of fungi and OTA contamination during tree-drying compared to terrace drying. Samples of about 20 L were collected at two experimental plots near Lavras, South of Minas Gerais State, on three occasions from June to August 2004. These samples were divided with one analyzed immediately after harvest and the other dried in terrace for comparison. The first sampling was at the ideal point of harvest when about 70% of the fruits were ripe, after a further 30 days, and finally after 60 days. Each sample was characterized with respect to its maturity profile, water activity, colonization by fungi and contamination by OTA in the husks and grains. The average percentage of grains infected with *A. ochraceus* after 0, 30 and 60 days after the ideal harvest time was 2, 8 and 6% respectively. After these samples were fully dried on the drying terrace, the infection rates of most fungal species fell, however that of *A. ochraceus* did not change. Analysis for OTA showed 9 of 96 samples contained detectable OTA, five of which were husk and four of beans. The highest value was found in the husk from the treatment of tree drying for 30 days followed by terrace drying. This was also the only sample with detectable OTA both in the husk and the grain. Eight of the positive samples were from the tree dried treatments (30 or 60 d), and five from the treatment without drying on the terrace. The observed

---

\* Advising Committee : Ludwig H. Pfenning – UFLA (adviser); Hilário Antônio de Castro – UFLA (co-adviser)

increase in the frequency of infection of the bean by *A. ochraceus*, an OTA producing species, during tree drying indicates that there is a greater risk of OTA contamination if harvest is delayed past the ideal point, at least in areas where climatic conditions are not constantly dry during the harvest period.

## 1 INTRODUÇÃO

Ocratoxina A (OTA) é uma micotoxina produzida por algumas espécies de fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium*. Os efeitos agudos, nefrotóxicos, imunossupresivos e carcinogênicos da OTA já estão bem caracterizados em animais, sendo ela também nociva a humanos (IARC, 1993; Pfohl-Leszkowicz et al., 2002). As fontes de ingestão de OTA são cereais, sucos de uva, vinhos, carnes, cerveja e café (Abarca et al., 2001; Mantle et al., 2000). Devido aos prováveis danos à saúde, a União Européia fixou limite máximo de contaminação de grãos de café torrados pela OTA em 5µg/kg (UE, 2005) levando a preocupação aos países produtores em melhorar a segurança do produto, evitando perdas comerciais.

As principais espécies potencialmente ocratoxigênicas presentes em grãos de café no Brasil são *Aspergillus ochraceus*, de ampla distribuição nas regiões produtoras e *Aspergillus carbonarius*, de ocorrência restrita (Batista et al., 2003; Taniwaki et al., 2003; Urbano et al., 2001). O estudo dos pontos onde possa ocorrer a contaminação pela OTA é fundamental na proposição de práticas que minimizem os riscos à segurança do produto (Bucheli & Taniwaki, 2003). A permanência prolongada na planta, de frutos de café após o ponto de colheita dando origem aos frutos conhecidos como “seco no pé”, é uma situação na qual pode ocorrer colonização por fungos e conseqüente contaminação por OTA. Também condições climáticas favoráveis ao fungo, após o ponto ideal de colheita, podem levar a altos níveis de contaminação. Frutos de cafés que secaram na planta coletados e plaqueados em DG18 sem a retirada da casca apresentaram percentual de colonização por *Aspergillus ochraceus* de até 1% (Taniwaki et al., 2003). Em relação à contaminação, cafés que secaram na planta apresentaram níveis de ocratoxina de até 0,2µg/kg (Taniwaki et al., 2003).

Assim, o objetivo do presente trabalho foi estudar o efeito da permanência prolongada do fruto aderido à planta na colonização por fungos e contaminação por OTA.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Local

O experimento foi instalado em duas lavouras cafeeiras localizadas no município de Perdões, MG. A área denominada “Morro” localiza-se no topo de um morro, a 873 m de altitude e a área “Lago”, à beira de um lago, a 809m de altitude. A distância entre as duas áreas era de, aproximadamente, 1100m.

### 2.2 Amostragem

Amostras de frutos foram coletadas no ponto ideal de colheita e 30 e 60 dias após o ponto ideal de colheita. Considera-se o ponto ideal de colheita quando as plantas apresentam, em média, 70% de frutos maduros do tipo cereja. Em ambas as áreas, foram coletadas oito amostras de, aproximadamente, 20 litros de café cada. Uma parte das amostras foi analisada imediatamente após a colheita, outra parte foi seca em terreiro de cimento, simulando a secagem na fazenda (Tabela 1).

**TABELA 1** Amostras analisadas no experimento.

DAPI*	Área			
	Morro		Lago	
	Analisada imediatamente após a colheita	Analisada após a secagem em terreiro	Analisada imediatamente após a colheita	Analisada após a secagem em terreiro
0	4 amostras	4 amostras	4 amostras	4 amostras
30	4 amostras	4 amostras	4 amostras	4 amostras
60	4 amostras	4 amostras	4 amostras	4 amostras
Total	48 amostras			

\*Dias após o ponto ideal de colheita

## **2.3 Caracterização das amostras**

### **2.3.1 Porcentagem de frutos verdes, bóias e cerejas.**

A porcentagem de frutos dos tipos verde, bóia e cereja foi determinada mergulhando-se uma amostra de 2 litros de frutos em um tanque com água. A fração que não afundou foi recolhida e os frutos contados, sendo denominados de bóia. A fração que afundou foi separada conforme a cor em cereja e verde, sendo cada fração contada separadamente.

### **2.3.2 Porcentagem de umidade**

Para a determinação da umidade das amostras, foi utilizado o método padrão para análise de sementes, em que uma amostra é pesada e, em seguida, seca em estufa a 105°C, até peso constante. A amostra é, então, pesada novamente e a umidade calculada por diferença de peso.

### **2.3.3 Análise microbiológica**

As amostras foram analisadas separando-se o fruto em duas partes: o exocarpo e o mesocarpo foram analisados juntos (casca), e o endocarpo separado (grão). A separação das partes a serem analisadas foi feita manualmente, quando trabalhou-se com a cereja ou utilizando descascador manual de amostras, quando se trabalhou com frutos secos. Para o estudo da comunidade da casca, cinquenta frutos foram descascados e as cascas foram esmagadas em 100ml de água peptonada, com o auxílio de um mixer. A suspensão obtida foi coada em peneira estéril, diluída em série até  $10^{-3}$  e plaqueada em duplicata, em meio DG18. Os grãos provenientes do procedimento anterior foram secos em câmara de fluxo sob papel de filtro por duas horas para remover água em excesso e sessenta grãos foram plaqueados em meio DG18 com a face plana voltada para baixo. As placas foram incubadas, à temperatura ambiente, por 10 dias. A



leitura, no caso das cascas, foi feita contando-se o número de colônias de fungos presentes nas placas. No caso do grão, contou-se o número de grãos colonizados.

A porcentagem de grãos colonizados foi calculada multiplicando-se o número de grãos colonizados por 100 e dividindo-se pelo número de grãos plaqueados. As unidades formadoras de colônia por fruto foram calculadas determinando-se o número de propágulos de cada fungo na suspensão, dividido pela quantidade de cerejas analisadas.

#### **2.3.4 Contaminação por ocratoxina A**

A verificação da contaminação das amostras por ocratoxina A nas cascas e nos grãos seguiu metodologia oficial (Brasil, 2002; Brasil, 2000). As análises foram realizadas no Laboratório de Análise de Qualidade e Segurança Alimentar - LAQSA do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, em Belo Horizonte, Minas Gerais.

#### **2.4 Delineamento experimental**

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados, montado em esquema fatorial 3x2x2, com 4 repetições, sendo os fatores o local (morro ou lago), o tipo de processamento (imediatamente após a colheita ou após secagem em terreiro) e o outro o tempo após o ponto ideal de colheita (0, 30 ou 60 dias)

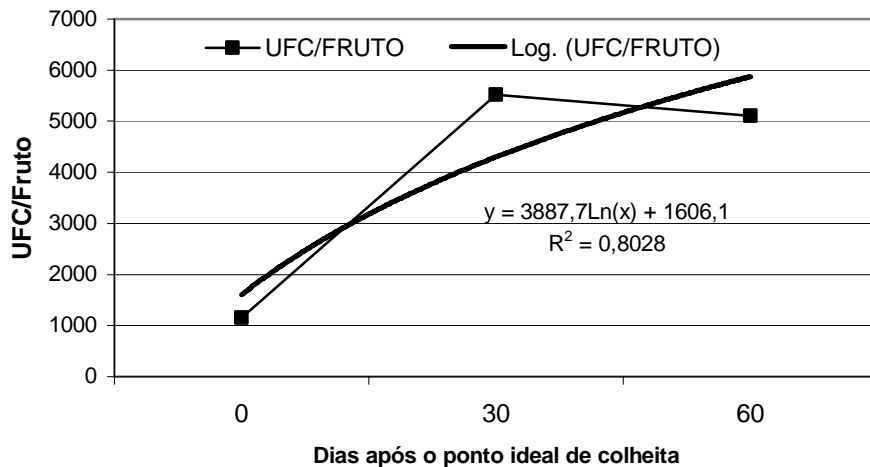
Foi realizado o teste f para o fator local e processamento, e análise de regressão para o fator tempo. Para fins de análise, os dados foram transformados em raiz quadrada de  $x + 0,5$ . As diferenças apresentadas nos resultados se referem a 95% de confiança. As análises estatísticas foram feitas utilizando-se o programa Sisvar versão 4.6 e o pacote estatístico do Excel 2000.

## 3 RESULTADOS

### 3.1 Colonização Média dos frutos

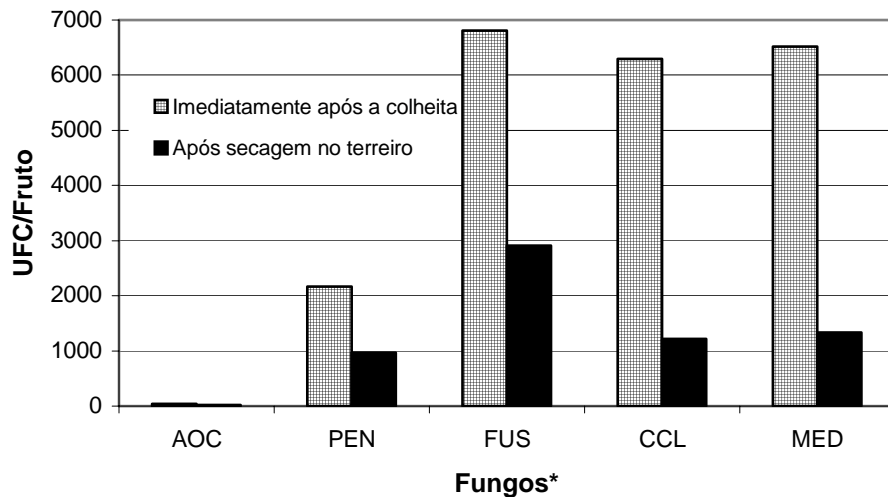
#### 3.1.1 Cascas dos frutos

Foram analisados 2.400 frutos, nas três avaliações, sendo recuperadas, no total, 942.807 unidades formadoras de colônias. A média geral de colonização dos frutos foi de 78,56 UFC/fruto. No ponto ideal de colheita (PIC) e 30 e 60 dias após o PIC, foram recuperadas, em média, 23, 110 e 102 UFC/fruto respectivamente. O maior número de UFCs recuperadas foi de espécies de leveduras, seguidas de espécies de *Fusarium*, *Cladosporium cladosporioides*, espécies de *Penicillium* e *Aspergillus ochraceus*. Houve diferença significativa entre as datas de colheita, 0, 30 ou 60 dias após o ponto ideal de colheita, e entre a forma de processamento, se imediatamente ou após secagem em terreiro. Houve aumento logarítmico da colonização dos fungos, de acordo com o ajuste do modelo com  $R^2$  de 80 % (Figura 1). O pico médio da colonização ocorreu a, aproximadamente, 30 dias após o ponto ideal de colheita.

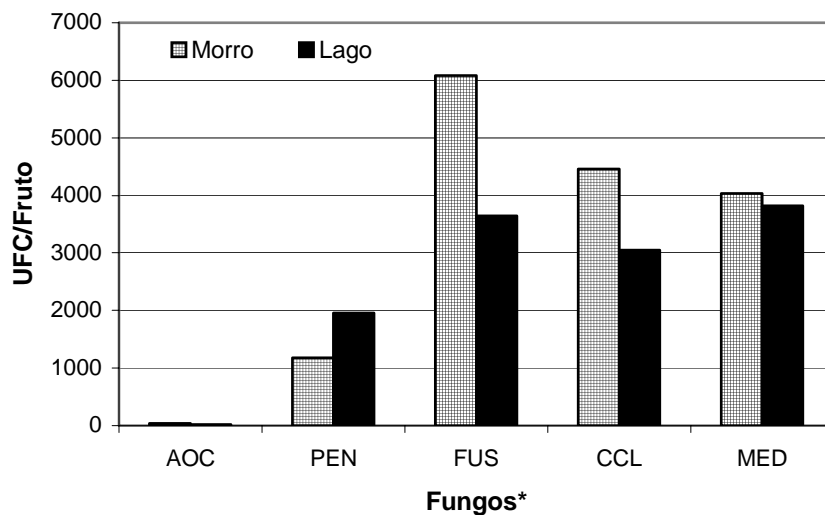


**FIGURA 1** Médias de UFC/casca de frutos em diferentes tempos de permanência no campo após o ponto ideal de colheita. Lavras, MG, 2006.

Logo após a colheita ou após a secagem no terreiro, houve redução do número de UFC/fruto. Em média, os frutos processados imediatamente após a colheita apresentaram uma carga de 6.519 UFC/fruto, sendo esta carga reduzida a 1.336 UFC/fruto após a secagem. Somente *Aspergillus ochraceus* não sofreu alteração significativa na frequência após o processamento (Figura 2). Não houve diferença significativa entre a área do Morro ou do Lago, em relação à colonização por fungos das cascas dos frutos (Figura 3).



**FIGURA 2** UFC/casca de frutos processados imediatamente após a colheita ou após a secagem em terreiro. Lavras, MG, 2006.

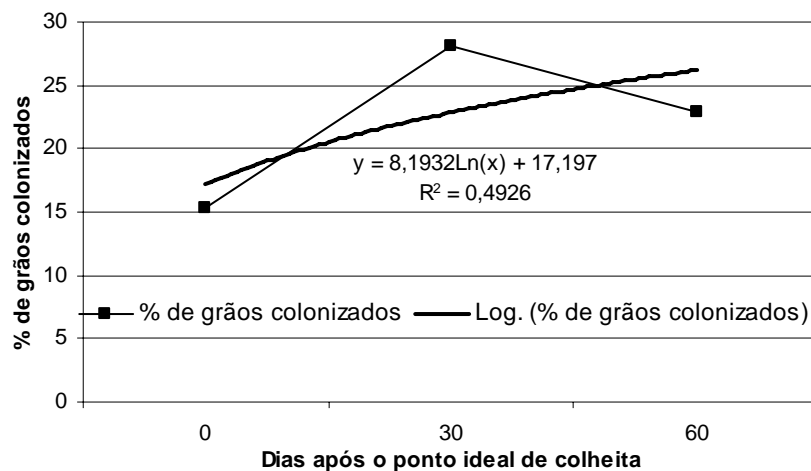


**FIGURA 3** UFC/casca de frutos provenientes de duas áreas de investigação, topo de morro e margens de um lago. Lavras, MG, 2006.

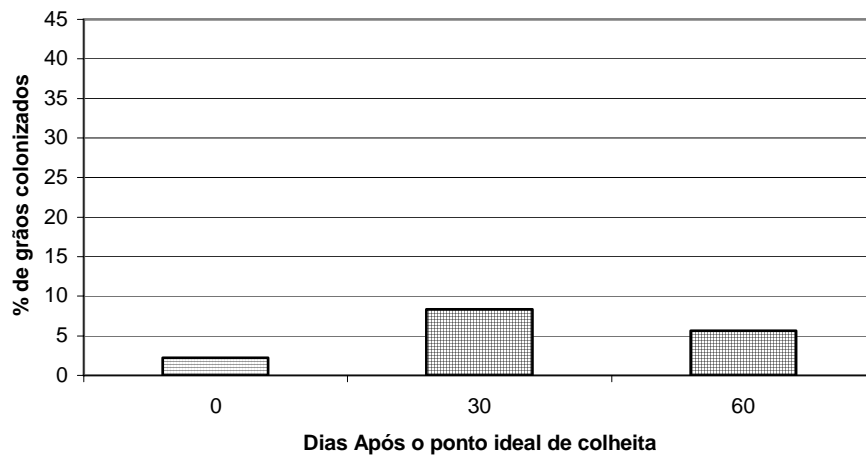
\* Legenda: AOC: *Aspergillus ochraceus*; PEN: *Penicillium* spp; FUS: *Fusarium* spp.; CCL: *Cladosporium cladosporioides*; MED: Média.

### 3.1.2 Grãos

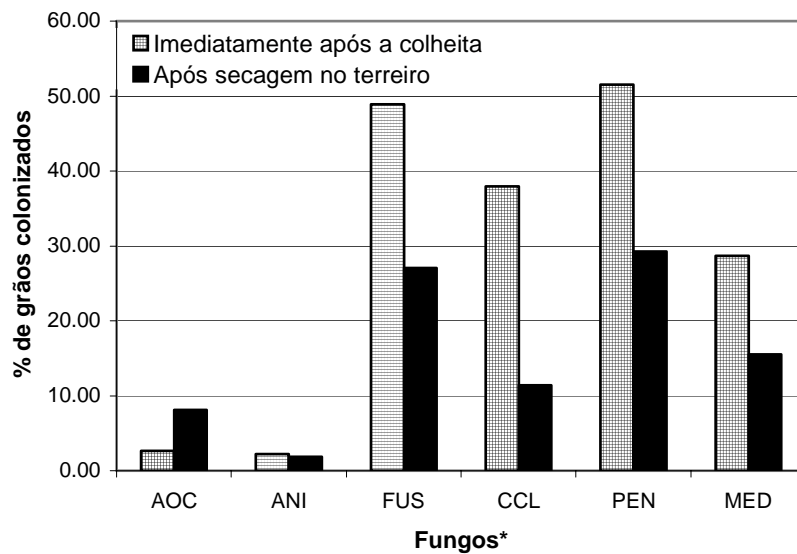
De 2.880 grãos analisados, foram recuperadas 3.190 colônias de fungos, nas três avaliações. *Fusarium* e *Cladosporium cladosporioides* foram as espécies mais recuperadas, seguidas de *Penicillium* spp., *Aspergillus niger* e *Aspergillus ochraceus*. Em média, em 22% dos grãos analisados foi observada a incidência de algum fungo. No tempo 0 dia após o ponto ideal de colheita a média de colonização dos grãos foi de 15,25%, seguido de 28,1% e 22,8% aos 30 e 60 dias após o ponto ideal de colheita respectivamente (Figura 4). *Aspergillus ochraceus* colonizou, aos 0, 30 e 60 dias, 2,2% 8,3% e 5,62% dos grãos, respectivamente (Figura 5). Exceto para *Aspergillus ochraceus*, todos os fungos sofreram redução da frequência nos grãos após a secagem no terreiro; *Aspergillus niger* permaneceu igual antes e após a secagem (Figura 6). Comparando-se as áreas do Morro e do Lago não se observa diferença significativa entre a porcentagem de grãos colonizados pelas principais espécies de fungos recuperadas (Figura 7).



**FIGURA 4** Porcentagem média de grãos colonizados por fungos em diferentes tempos de permanência no campo após o ponto ideal de colheita. Lavras, MG, 2006.

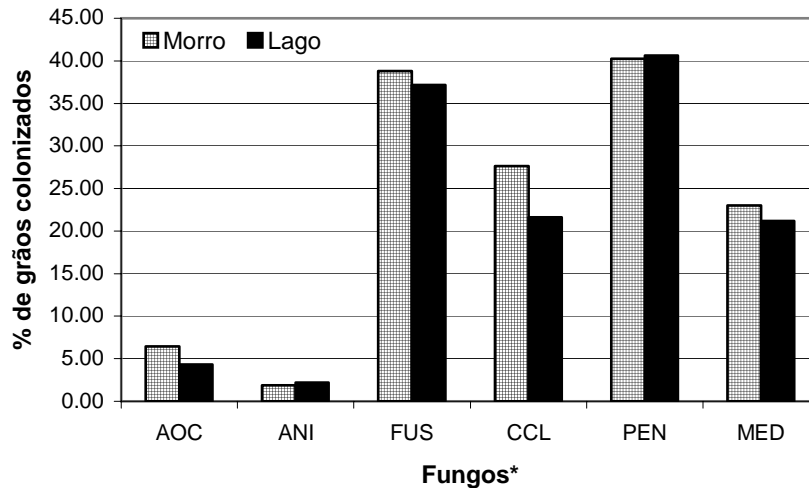


**FIGURA 5** Percentagem de grãos colonizados por *Aspergillus ochraceus*, (médias do experimento). Lavras, MG, 2006.



\* Legenda: PEN: AOC: *Aspergillus ochraceus*; ANI: *Aspergillus niger*; FUS: *Fusarium* spp.; CCL: *Cladosporium cladosporioides*; Penicillium spp; MED: Média

**FIGURA 6** Porcentagem de grãos colonizados provenientes de frutos processados imediatamente após a colheita ou após a secagem em terreiro. Lavras, MG, 2006.



\* Legenda: PEN: AOC: *Aspergillus ochraceus*; ANI: *Aspergillus niger*; FUS: *Fusarium* spp.; CCL: *Cladosporium cladosporioides*; *Penicillium* spp; MED: Média

**FIGURA 7** Porcentagem de grãos colonizados provenientes de frutos do cafeeiro de duas áreas, topo de morro e margens do lago. Lavras, MG, 2006.

### 3.2 Porcentagem de frutos tipo bóia cereja e verde

Na área do lago, no ponto ideal de colheita, 51% dos frutos eram tipo cereja, 33% tipo bóia e 16% tipo verde. Na área do morro, 70% eram tipo cereja, 23% tipo bóia e 7% verdes (Tabela 2). A  $A_w$  apresentada na Tabela 2 corresponde à atividade de água encontrada na isoterma de adsorção de café (Palácios-Cabrera, 2004) Em ambas as áreas houve aumento linear da quantidade de frutos bóia após o ponto ideal de colheita e, conseqüentemente, redução linear dos frutos do tipo cereja e verde (dados não apresentados).

**TABELA 2** Porcentagem de diferentes tipos de frutos encontrados em diferentes tempos, após o ponto ideal de colheita.

DAPI*	ÁREA DO LAGO - % de tipos de frutos		
	Verde	Cereja	Bóia
0	16,44	50,87	32,69
30	2,76	27,63	69,62
60	0,00	2,41	97,59
	ÁREA DO MORRO - % de tipos de frutos		
	Verde	Cereja	Bóia
0	7,34	69,38	23,27
30	1,14	51,00	47,87
60	0,00	2,49	97,51

\*Dias após o ponto ideal de colheita

### 3.3 Teores de umidade

O teor de umidade das amostras da área do lago e do morro não mostrou variação significativa (Tabela 3). No ponto ideal de colheita, em média, os frutos apresentavam 61% e, após 60 dias, em torno de 12% de umidade.

**TABELA 3** Umidade e atividade de água dos grãos coletados em diferentes tempos, após o ponto ideal de colheita.

Áreas	Dias após o ponto ideal de colheita					
	0		30		60	
	U%-BU	Aw*	U%-BU	Aw	U%-BU	Aw
Lago	60.4	0,98	19.8	0,92	12.5	0,81
Morro	61.3	0,99	19.7	0,92	11.5	0,78

\* Aw correspondente a umidade conforme dados de literatura (Palácios-Cabrera et al., 2004)



### 3.4 Contaminação por OTA

Foram analisadas, no total, 96 amostras, sendo 48 de cascas e 48 de grãos. Destas, apenas 8 apresentaram algum tipo de contaminação pela toxina (Tabela 4). Apenas uma amostras apresentou contaminação na casca e nos grãos. O mais alto nível de contaminação encontrado em uma amostra foi de 6,54µg/kg, após a permanência no campo por 30 dias e após a secagem em terreiro. Sete das oito amostras contaminadas foram colhidas após 30 ou 60 dias após o ponto ideal de colheita.

**TABELA 4** Características das amostras contaminadas com OTA. Lavras-MG, 2006.

DAPI*	Características		OTA µg/kg		Colonização	
	Área	Processamento	grão	casca	% de grãos colonizados por AOC**	UFC / fruto de AOC
0 Lago		Após a colheita	0	2	0	0
30 Morro		Após a secagem	0	0,5	13,33	0
30 Morro		Após a secagem	0,5	6,54	18,75	0
30 Lago		Após a colheita	0	1,24	3,33	0
30 Lago		Após a secagem	0	1,1	9,23	200
60 Morro		Após a colheita	4,34	0	1,67	100
60 Morro		Após a colheita	0,22	0	3,33	300
60 Morro		Após a colheita	0,93	0	5,00	200

\* Dias Após o ponto ideal de colheita

\*\* *Aspergillus ochraceus*

## 4 DISCUSSÃO

### 4.1 Sucessão microbiana

De modo geral, existe uma tendência clara de aumento da colonização por fungos à medida que o fruto permanece no campo, com posterior redução da colonização após 30 dias. Esta tendência à maior colonização por fungos ocratoxigênicos já foi comprovada em um estudo realizado no estado de São Paulo, no qual se verificou um aumento da colonização por *Aspergillus ochraceus* de 0,25% nos frutos tipo cereja para 1,3%, quando estes frutos eram secos em terreiro (Taniwaki et al., 2003). A dinâmica da colonização está, possivelmente, relacionada às condições no fruto, que favoreçam o estabelecimento dos fungos. No caso dos frutos de café, os principais fatores são a composição química dos frutos, a atividade de água e a própria sucessão entre as espécies.

Com relação à atividade de água ( $A_w$ ), no caso de *Aspergillus ochraceus*, o  $A_w$  mínimo varia de 0,76 a 0,88 e o ótimo situa-se entre 0,98 e 0,96 (Palácios-Cabrera et al., 2004). Aos 0, 30 e 60 DAPI, os  $A_w$  obtidos foram de 0,99; 0,92 e 0,80. Traçando-se uma curva destes valores, observa-se, que nos 30 DAPI, o  $A_w$  dos frutos se encontra próximo ao ponto ótimo de crescimento, explicando, então, o aumento da colonização exatamente após os 30 DAPI. A 0 DAPI, a atividade de água é próxima ao ideal, entretanto, o desenvolvimento de *Aspergillus ochraceus* é limitado devido à competição com outras espécies e ao seu caráter xerofílico de crescimento (Palácios-Cabrera et al., 2004). Aos 60 DAPI, a atividade de água baixa é restritiva à maioria dos fungos.

Este caráter com restrição de crescimento em  $A_w$  baixos e muito altos foi demonstrado para diversas espécies, como *Aspergillus flavus*, *A. nomius*, *A. oryzae*, *A. parasiticus*, *A. candidus*, *A. sydowii*, *Eurotium amstelodami* e *E. chevalieri* (Rosso et al., 2001). A  $A_w$  também é o principal fator que influencia

na sucessão de fungos que colonizam as cascas. A colonização de frutos por fungos é um processo natural, necessário para que o fruto seja degradado e a semente inicie o processo germinativo. No café, a colonização ocorre inicialmente, por espécies de leveduras e bactérias (Silva et al., 2000). Na medida em que o fruto perde água, a colonização por fungos filamentosos tende a aumentar. Quando estudam-se as comunidades de fungos presentes na casca, esta sucessão pode ser comprovada comparando-se a redução média percentual da colonização da comunidade da casca quando é processada imediatamente após a colheita ou quando secas no terreiro (Tabelas 5 e 6).

**TABELA 5** Redução média do número de UFC/cascas após secagem em terreiro das principais espécies de fungos. Lavras, MG, 2006.

Fungos	Processamento		Variação
	Após a colheita	Após secagem no terreiro	
AOC	37	23	- 37.83
PEN	2167	965	- 55.46
FUS	6807	2913	- 57.20
CCL	6290	1219	- 80.62
LEV	17295	1563	- 90.96
Média	6519	1336	- 79.50

Legenda: AOC: *Aspergillus ochraceus*; PEN: *Penicillium* spp; FUS: *Fusarium* spp.; CCL: *Cladosporium cladosporioides*; LEV: leveduras.

**TABELA 6** Redução média do número de grãos colonizados após secagem em terreiro das principais espécies de fungos. Lavras-MG, 2006.

Fungos	Processamento		Variação
	Após a colheita	Após secagem no terreiro	
AOC	2.64	8.11	+ 32,55
ANI	2.22	1.88	- 15,31
PEN	51.56	29.28	- 43,21
FSE	48.93	27.05	- 44,71
CCL	37.91	11.36	- 70,03
Média	28.65	15.54	- 45,75

Legenda: AOC: *Aspergillus ochraceus*; PEN: *Penicillium* spp; FUS: *Fusarium* spp.; CCL: *Cladosporium cladosporioides*; LEV: leveduras.

Espécies de leveduras mostraram-se mais sensíveis à dessecação com redução de 90% das UFC, seguidas de *Cladosporium cladosporioides*, *Fusarium*, *Penicillium* e *Aspergillus ochraceus*, que foi pouco sensível à secagem. Comportamento semelhante na sucessão também foi observado no trabalho de Alves e Castro (1998), estudando *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium* e *Aspergillus ochraceus*. A sucessão na comunidade interna é semelhante a que ocorre na casca, a não ser pelo fato do aumento da recuperação de *Aspergillus ochraceus* após a secagem. Para os fungos estudados, houve redução na colonização dos grãos após a secagem, variando de 70% para o caso de *Cladosporium cladosporioides* até 15% no caso de *Aspergillus niger*. O aumento da ocorrência de *Aspergillus ochraceus* após a secagem já foi relatado por outros autores (Taniwaki et al., 2003; Alves e Castro, 1998). Este aumento se deve possivelmente, às condições encontradas no grão retirado da cereja sem a secagem. O grão úmido não permite uma boa recuperação de *Aspergillus ochraceus*, devido à grande disponibilidade de água, que facilita a recuperação de espécies mais abundantes e de crescimento rápido.

Quando se compara a sensibilidade à diminuição da disponibilidade de água, as quatro principais espécies encontradas na casca e no grão, verifica-se um comportamento semelhante. *Cladosporium* foi a espécie mais sensível a dessecação, com redução de 70% no grão e 80% na casca. *Fusarium* foi reduzido em 40% no grão e 55% na casca e *Penicillium* em 40% no grão e 55% na casca. Esta escala de sensibilidade à dessecação, leveduras, *Cladosporium*, *Fusarium* e *Aspergillus ochraceus* verificada neste estudo coincide com a escala de Aw mínimos para o desenvolvimento de diversos fungos (Samson et al., 1995) (Tabela 7).

**TABELA 7** Aw mínimo para o crescimento das principais espécies de fungos recuperadas

Fungo	Aw mínimo para o crescimento
<i>Aspergillus ochraceus</i>	0,76
<i>Penicillium spp.</i>	0,79
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	0,86
<i>Fusarium spp.</i>	0,86
Leveduras	0,91

(Adaptado de Samson et al., 2000)

A frequência de *Aspergillus ochraceus* foi reduzido, na casca, em 35% e teve um aumento no grão de 30%. O baixo índice de redução de *Aspergillus ochraceus* na casca pode estar relacionado à sua capacidade de adaptação a ambientes mais xerofílicos como também à diminuição da competição por espécies que podem inibir seu crescimento como as leveduras *Pichia anomala*, *P. kluyveri* e *Hanseniaspora uvarum*, que foram hábeis em reduzir o crescimento de *Aspergillus ochraceus* em até 80% (Masoud et al., 2005).

A presença de compostos fungistáticos no grão pode ser um fator relevante na diminuição da colonização do grão. Ramirez-Coronel et al. (2004) verificaram a redução de proantocianidinas, ácido *p*-coumarolquímico e

flavonóides presentes em cascas de café após 3 dias de secagem. Estes compostos têm comprovada ação fungistática e podem ser também encontrados nos grãos. Dessa forma, após um período de secagem, ocorre degradação destes compostos permitindo uma maior colonização por parte dos fungos.

#### **4.2 Produção de OTA**

A contaminação por OTA de cafés no campo já foi demonstrada. Cafés do tipo cereja deixados na planta até o estado de passa tiveram acréscimo na colonização por ocratoxina 0,1 para 0,2 µg/kg. Amostras de café coletadas diretamente de propriedades e posteriormente analisadas quanto à presença de OTA não apresentaram relação entre os tipos ou época de colheita, sendo esporádica e aparentemente aleatórias (Taniwaki et al., 2003). A presença de fungos potencialmente produtores de OTA não significa sua contaminação pela toxina (Frank, 2001). A comprovação dos grãos como substrato para a produção da OTA e as condições ideais para a sua produção são facilmente comprovadas *in vitro*, mas, no campo, existe uma relativa inconsistência dos dados. *Aspergillus ochraceus* mostrou grande habilidade na colonização de grãos de café e produção de toxina, quando condições de umidade de 95% foram mantidas, atingindo níveis de contaminação pela OTA de 8.338 µg/kg de café após 60 dias de incubação (Palácios-Cabrera et al., 2004). Apesar da não comprovação estatística da contaminação por OTA, 89% das amostras contaminadas tinham passado no campo por mais de 30 DAPI.

#### **4.3 Interação colonização por *A. ochraceus* X contaminação por OTA**

Todas as amostras que apresentaram contaminação por OTA também apresentaram os grãos com algum nível de colonização por *Aspergillus ochraceus*, exceto uma. No entanto, das amostras contaminadas somente na casca, somente uma apresentou colonização por *Aspergillus ochraceus* na casca.

Este comportamento é amplamente discutido na literatura e pode ser explicado pela dificuldade de se isolar fungos ocratoxigênicos do ambiente das cascas que é hábitat adequado ao crescimento de espécies menos xerofílicas (Frank, 2001). Não existem estudos sobre a migração da OTA nas diferentes partes do fruto.

## 5 CONCLUSÕES

1. A permanência dos cafés aderidos à planta após o ponto ideal de colheita é um fator de risco para segurança do café, devido ao aumento da colonização dos grãos por *Aspergillus ochraceus*.
2. Não foram detectadas diferenças significativas entre cafés coletados de uma área próxima ao lago e no topo de um morro, com relação à colonização por fungos e a presença de ocratoxina.
3. A secagem em terreiro pode reduzir de forma significativa a colonização pela maioria das espécies de fungos, sendo *Aspergillus ochraceus* pouco sensível a esta secagem.



## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABARCA, M.L. et al. Current importance of ochratoxin A-producing *Aspergillus* spp. **Journal of Food Protection**, v.64, p.903-906, 2001. Review.

ALVES, E.; CASTRO, H.A. Fungos associados ao café (*Coffea arabica* L.) nas fases de pré e pós-colheita em lavouras da região de Lavras. **Summa Phytopathologica**, v.24, p.4-7, 1998.

BATISTA, L.R. et al. Toxigenic fungi associated with processed (green) coffee beans (*Coffea arabica* L.) **International Journal of Food Microbiology**, v. 25, p. 293-300, 2003.

BUCHELI, P.; TANIWAKI, M.H. Research on the origin, and on the impact of post-harvest handling and manufacturing on the presence of ochratoxin A in coffee. **Food Additives and Contaminants**, n.19, p.655-665, 2002. Review.

BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Diário Oficial da União. Instrução Normativa n. 01 de /09/2002, Seção 1, n. 22, p. 12-13, 31/01/2002

BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Diário Oficial da União. Instrução Normativa SDA, n. 09 de 24/03/2002, Seção 1, p. 35-42, 30/03/2000.

FRANK, J.M. On the activity of fungi in coffee in relation to ochratoxin A production. in: 19<sup>th</sup> ASIC Coffee conference, 19, 2001, Trieste, Italy. **Proceedings...** Trieste, Italy, 2001

IARC, **Ochratoxin A.**: a monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. Lyon france: World Health Organization-IARC Working group. 1993. v.56, p. 250-277.

MANTLE, P.G.; CHOW, A.M. Ochratoxin formation in *Aspergillus ochraceus* with particular reference to spoilage of coffee. **International Journal of Food Microbiology**, v.25, p.105-109, 2000.

MASOUD, W.; KALTOFT, H.J. The effects of yeasts involved in the fermentation of *Coffea arabica* in East Africa on growth and ochratoxin A (OTA) production by *Aspergillus ochraceus*. **International Journal of Food**

**Microbiology**. Disponível em: <www.periodicosapes.gov.br>. Acesso em: 5 out. 2005.

PALACIOS-CABRERA, H. et al. The production of ochratoxin A by *Aspergillus ochraceus* in raw coffee at different equilibrium relative humidity and under alternating temperatures. **Food Control**, v.15, p.531-35, 2004.

PFOHI-LESZKOWICZ, A. et al. Balkan endemic nephropathy and associated urinary tract tumours: a review on aetiological cause and the potential role of mycotoxins. **Food Additives and Contaminants**, v.19, p.282-302, 2002.

RAMIREZ-CORONEL, M.A. et al. Characterization and Estimation of Proanthocyanidins and Other Phenolics in Coffee Pulp (*Coffea arabica*) by Thiolyis- High-Performance Liquid Chromatography. **Journal Agricultural Food Chem.**, v.52, p.1344-1349, 2004.

ROSSO, L.; ROBINSON, T.P. A cardinal model to describe the effect of water activity on the growth of moulds, **International Journal of Food Microbiology**, v.63, p.265-273, 2001.

SAMSON, R.A. et al. **Introduction to food and air-borne fungi**. 6.ed. Baarn, The Netherlands: CBS, 2000. 389p.

SILVA, C.F. et al. Microbial diversity during maturation and natural processing of coffee cherries of *Coffea arabica* in Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v.25, p.251-260, 2000.

TANIWAKI M.H. et al. The source of ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to processing methods. **International Journal of Food Microbiology**, v.25, p.173-179, 2003.

UE, EUROPEAN UNION. Commision Regulation N° 123/2005 of January 2005 amending Regulation (EC) n. 466/2001. **Official Journal of the European Union**. Jan. 2005. (As regard ochratoxin A.)

## **CAPÍTULO 4**

### **MONITORAMENTO DE FUNGOS EM DIFERENTES PARTES DO FRUTO DO CAFEIEIRO**

## RESUMO

PEREIRA, Ricardo Tadeu Galvão. Monitoramento de fungos em diferentes partes do fruto do cafeeiro. In: \_\_\_\_\_. **Diversidade e frequência de fungos associados a frutos e grãos de café**. 2006. Cap. 4, p.87-115. Tese (Doutorado em Agronomia-Fitopatologia), Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. \*

Uma diversidade razoável de fungos filamentosos pode ser encontrada em associação natural com os frutos do cafeeiro. A qualidade do café pode não ser afetada por alguns fungos que degradam a mucilagem, mas, outras espécies podem produzir micotoxinas como a ocratoxina A ou alterar o gosto da bebida. Muitos estudos já foram conduzidos a respeito da diversidade e frequência de fungos filamentosos em cafés beneficiados. Porém, quando e como a colonização ocorre ainda não é bem compreendido. Entender como *Aspergillus ochraceus* e outros fungos ocratoxigênicos colonizam o fruto, ajudaria no desenvolvimento de estratégias para prevenir contaminação do café pela OTA. O objetivo deste trabalho foi aprimorar e testar uma metodologia para detectar e monitorar a ocorrência e frequência de fungos filamentosos em diferentes partes do fruto do cafeeiro. Foram coletadas 23 amostras de café cerejas, sem qualquer sintoma de danos em três áreas geográficas: Sul do estado de Minas Gerais; Zona da Mata do estado de Minas Gerais e Montanhas do Espírito Santo. Foram analisadas 50 cerejas de cada amostra. Frutos inteiros foram agitados em água peptonada (0,1%) e a suspensão obtida foi diluída e plaqueada em meio DG18, representando o exocarpo ou a comunidade superficial. As mesmas cerejas foram esterilizadas superficialmente usando álcool etílico e hipoclorito e em seguida o mesocarpo foi separado do endocarpo. Os mesocarpos foram esmagados em água peptonada com um mixer e a suspensão diluída e plaqueada em DG18. Os grãos foram tratados com hidróxido de sódio 0,2M para remover a mucilagem residual e plaqueados em meio DG18. Um total de 43 espécies de 19 gêneros de fungos foi recuperado e identificado. Houve incidência de fungos em todas as partes do fruto e em todas as amostras. Um total de 121,521 unidades formadoras de colônia (UFC) foram registradas na análise do exocarpo e 77.394 UFC no mesocarpo. Dos 1380 grãos analisado, 72% foram colonizados por pelo menos uma espécie de fungo. Os fungos filamentosos mais comuns no exocarpo foram *Cladosporium cladosporioides*, *Fusarium stilboides* e *F. semitectum* e

---

\* Comitê de Orientação: Ludwig H. Pfenning – UFLA (orientador); Hilário Antônio de Castro – UFLA (co-orientador)

leveduras. No mesocarp, os mesmos fungos foram muito freqüentes junto com de *Penicillium brevicompactum* e leveduras. Os fungos dominantes nos grãos foram *Fusarium* spp., *Penicillium* spp. e *Cladosporium cladosporioides*. *Aspergillus ochraceus* estava presente em aproximadamente 7% de grãos analisados, mas, também foi descoberto raramente no exocarpo e mesocarpo. A metodologia usada foi eficiente para recuperar uma alta diversidade de espécies de fungos, inclusive espécies toxigenicas, de todas as partes do fruto. A recuperação de *A. ochraceus* nas sementes de frutos cerejas de café intactas vai contra o senso que contaminação de café pela ocratoxina A é exclusivamente um problema de pós-colheita. São requeridos estudos adicionais para averiguar as vias de infecção do fruto por fungos toxigênicos e avaliar a possibilidade de *A. ochraceus* ser um endófito de semente.

## ABSTRACT

PEREIRA, Ricardo Tadeu Galvão. Monitoring of fungi in different parts of the fruit of the coffee plant. In: \_\_\_\_\_. **Diversity and frequency of fungi associated to fruits and beans of coffee**. 2006. Cap. 4, p.87-115. Thesis (Doctorate in Agronomy-Phytopathology), Federal University of Lavras, Lavras, MG.\*

A reasonable diversity of filamentous fungi can be found in natural association with the coffee fruit. Coffee quality may not be compromised by some fungi that degrade the mucilage, but other species are capable of producing mycotoxins such as ochratoxin A, while others may produce taints in the cup. Many studies have already been carried out on the diversity and frequency of filamentous fungi in green coffee. Nevertheless, when and how fungal colonization of the coffee fruit occurs is still poorly understood. Understanding how *Aspergillus ochraceus* and other ochratoxin producing species accomplish this would help in the development of strategies to prevent contamination of coffee by ochratoxin. The objective of this study was to improve and test a methodology for detecting and monitoring the occurrence and frequency of filamentous fungi in different compartments of the coffee fruit. We collected 23 samples of coffee cherries without any symptom or injuries in three geographical areas: South of Minas Gerais State; Mountains of Minas Gerais State; Mountains of Espírito Santo State. Fifty cherries from each sample were analyzed in the following way. Whole fruits were shaken in peptone water (0,1%) and the suspension diluted and plated on DG18 medium. This represents the exocarp or superficial community. The same cherries were then surface sterilized using ethyl alcohol and hypochlorite following with the mesocarp was separated from the seed tightly enclosed by the endocarp. The mesocarps were then stomached in peptone water in a mixer the suspension diluted and plated on DG18. The grains were treated with sodium hydroxide (2%) to remove residual mucilage and plated on DG18. In total, 43 fungal species from 19 genera were recovered and identified. Fungi were present in all compartments and all samples. A total of 121521 colony forming units (CFU) were recorded from the exocarp analysis with another 77394 CFU recorded from the corresponding mesocarp analysis. In a total of 1380 grains analyzed, 72% were colonized by at least one fungal species. The most common filamentous fungi on the exocarp were *Cladosporium cladosporioides*, *Fusarium stilboides* and *F. semitectum* though yeasts (not identified) were more numerous. In the mesocarp, the same fungi were most frequent along with *Penicillium brevicompactum*. Yeasts were again

very numerous. The dominant fungi in the grains were *Fusarium*, *Penicillium* spp. and *Cladosporium cladosporioides*. *Aspergillus ochraceus* was present in about 7% of grains analyzed but was also rarely detected in the exocarp and mesocarp. The methodology used was efficient in recovering a high diversity of fungal species, including toxigenic species, from all parts of the coffee fruit. The fact that *A. ochraceus* can be detected in the seeds of intact coffee cherries argues against the notion that contamination of coffee by ochratoxin A is exclusively a post harvest problem. Further studies are required to ascertain the source of infection of the fruit by toxigenic fungi and to evaluate the possibility that *A. ochraceus* may be a seed endophyte.

## 1 INTRODUÇÃO

O fruto do cafeeiro apresenta um pericarpo bem desenvolvido com três tipos de tecidos bem definidos, exocarpo, mesocarpo e endocarpo (Salazar et al., 1994). O exocarpo é constituído de uma camada externa de células parenquimatosas que, externamente, são de cor verde, quando o fruto está imaturo e vermelho ou amarelo, dependendo da variedade, quando este amadurece. No mesocarpo, são encontradas várias camadas de células, sendo a sua composição química rica em açúcares e compostos fenólicos. O endocarpo é formado por 5 a 7 camadas de células esclerenquimáticas que recobrem o grãos do cafeeiro (Salazar et al., 1994; Rojas et al., 2003).

O ambiente químico e fisicamente diverso encontrado no fruto torna o mesmo substrato propício ao desenvolvimento de diferentes grupos de fungos. A presença de microrganismos é natural no fruto, sendo condição essencial até no processamento, quando este é realizado por processos fermentativos. O estudo da composição das espécies presentes nas diferentes partes do fruto é essencial, tanto para o conhecimento da ecologia das espécies presente como para a proposição de práticas no campo que garantam a segurança do produto. A comunidade de fungos presentes no exterior do fruto é bem conhecida, sendo formada, principalmente, por leveduras e espécies de fungos filamentosos, como *Fusarium*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Aspergillus* e alguns zigomicetos (Silva et al., 2000; Suárez-Quiroz et al., 2004).

No mesocarpo, o principal grupo de fungos encontrados é o das leveduras, com ocorrência escassa de fungos filamentosos (Rouss et al., 1995). Os fungos associados ao endocarpo e grão são objeto de diversos estudos, destacando-se como os mais conhecidos as espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* e as espécies de ampla distribuição, como *Fusarium* e *Penicillium*. Porém, a



maioria destes estudos avaliou grãos já beneficiados, sem controle da origem das amostras no campo.(Pardo et al., 2004; Batista et al., 2003; Freitas et al., 2000).

O processamento do café nas fazendas visa, principalmente, à perda de água e à retirada das estruturas do pericarpo, o que pode ocorrer com o fruto recém-colhido ou após a secagem. O desenvolvimento de técnicas seguras que permitam a detecção, o isolamento e a identificação de fungos em alimentos, visando facilitar o estudo da ecologia dos fungos, é uma recomendação da *International Commission on Food Mycology* - ICFM (Taniwaki, 1996). Entre as técnicas que podem ser utilizadas no estudo da detecção podemos utilizar metodologias baseadas em técnica moleculares, como PCR ou baseadas em testes bioquímicos, como ergosterol (Fungaro et al., 2004; Schmid et al., 2004; Saxena et al, 2001). Entretanto, essas metodologias ainda não estão consolidadas e possuem um custo, até o momento, relativamente alto. As metodologias de plaqueamento e contagem das unidades formadoras de colônia ainda representam uma boa opção para o monitoramento de fungos. Assim, o objetivo do presente estudo foi aprimorar uma metodologia que permita a detecção de fungos de forma diferenciada, nas diferentes partes do fruto do cafeeiro.

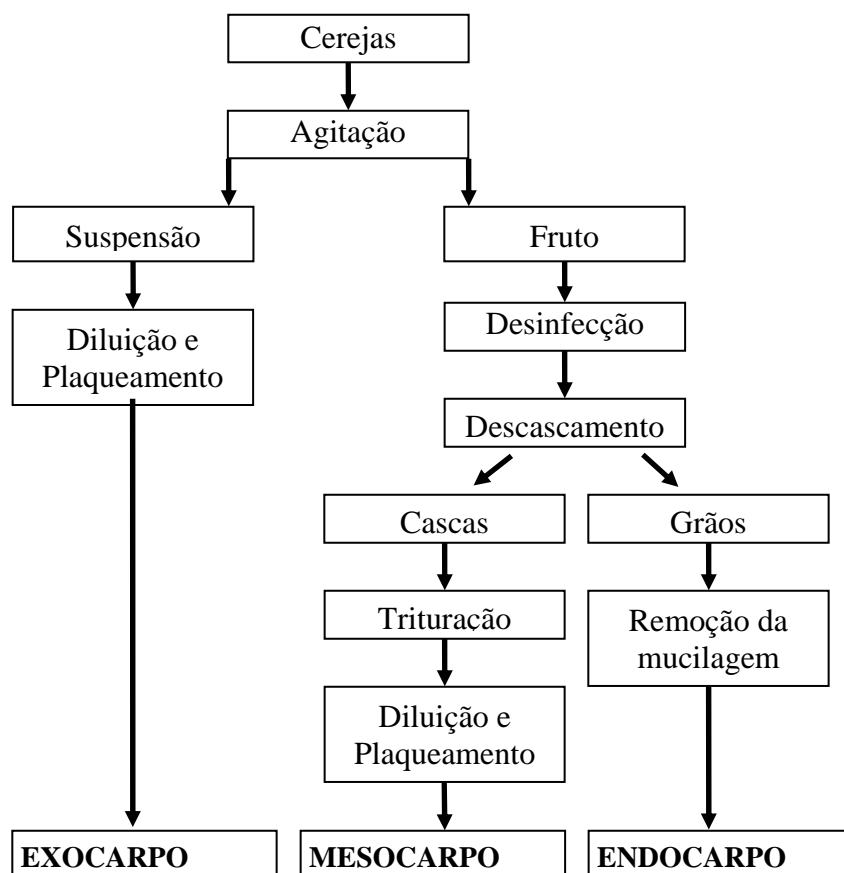
## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Amostragem**

Vinte e três amostras de 2 kg café tipo cereja foram coletadas em fazendas de café nas regiões Sul e Zona da Mata do estado de Minas Gerais e montanhas do Espírito Santo, entre as latitudes de 20°07' a 21°43S e longitudes de 41°11' a 45°31'W e altitudes entre 711e 1176 m. Foram coletados somente frutos do tipo cereja, livres de qualquer sintoma de doença ou injúria e que apresentavam a cor típica do fruto maduro. As amostras foram armazenadas em sacos de papel e processadas até 24 horas após a coleta.

### **2.2 Processamento das amostras**

As amostras foram processadas visando a detecção e o monitoramento de fungos nas diferentes partes do fruto. Para cada parte do fruto, foi empregado um processamento diferente (Figura 1).



**FIGURA 1** Esquema de processamento das amostras de café do tipo cereja para levantamento dos fungos do exocarpo, mesocarpo e endocarpo.

### 2.2.1 Comunidade do exocarpo

Para a recuperação dos fungos associados ao exocarpo, 50 frutos de cada amostras foram agitados em 100 mL de água peptonada 0,1%, em um frasco, por dois minutos. A suspensão contendo esporos e fragmentos de micélio foi, então, diluída, nas concentrações de  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ . Aliquotas de 0,1 mL foram transferidas para placas de Petri de 90mm de diâmetro contendo meio DG18 (176 g de

glicerol, 8,0 g de glicose, 4,0 g de peptona, 0,80 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,4 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 800 mL de água, 15 g de agar, 75 mg de chloramphenicol e 2 mg de dichloran), em três repetições cada. A suspensão foi espalhada na placa com o auxílio de uma alça de Drigalsky. As placas foram incubadas à temperatura ambiente de, aproximadamente, 22°C e o número de UFC formadas foi avaliado após 10 dias. A avaliação foi feita diretamente na placa, separando-se as colônias observadas em grupos, de acordo com a morfologia, considerando-se textura e coloração do micélio, formato dos esporos, etc. Todas as colônias com morfologia e coloração distintas foram isoladas em meio MEA (20 g extrato de malte, 1 g de peptona, 20 g glicose, 20 g ágar, 1000 mL de água), visando à obtenção de culturas puras para futura identificação. O número de unidade formadora de colônia (UFC) registrado foi transformado em UFC por cereja, considerando a concentração da suspensão e a quantidade de cerejas processadas.

### **2.2.2 Comunidade do mesocarpo**

Os mesmos frutos do procedimento anterior foram utilizados para determinar a comunidade de fungos do mesocarpo. As cerejas foram esterilizadas por imersão em  $\text{NaClO}$  3%, durante 10 minutos, com agitação e enxaguadas em água estéril duas vezes. A casca dos frutos foi retirada manualmente, apertando-se os frutos no sentido transversal. As cascas foram colocadas em um becker estéril com 100 ml de água peptonada e, após 3 minutos, a casca foi triturada com um “mixer” até o completo rompimento do mesocarpo. A suspensão obtida foi coada em peneira com abertura de 1 mm. A diluição da suspensão obtida, a leitura e o cálculo do número de UFC por mesocarpo foram feitos conforme o procedimento adotado para o exocarpo.

### **2.2.3 Comunidade do endocarpo**

Para o estudo da comunidade interna, os grãos obtidos no procedimento anterior foram agitados em solução de NaOH 0,2 N, por 10 minutos, com a finalidade de remover a mucilagem residual. Os grãos foram colocados sob papel de filtro em câmara de fluxo laminar por duas horas, para que a água em excesso evaporasse. Sessenta grãos foram transferidos, com a face plana voltada para baixo, para placas de petri com 15 cm de diâmetro contendo meio DG18. O aparecimento de colônias de fungos foi avaliado diretamente na placa, separando grupos de diferentes morfo-tipos, de acordo com a morfologia, textura, coloração, formato dos esporos etc. Para cada grão foram registrados o número e a frequência de morfo-tipos. Os dados foram transformados em percentagem de grãos colonizados por cada espécie de fungo.

### **2.3 Identificação das espécies e diversidade**

Culturas puras foram obtidas de cada morfo-tipo de fungo em meio MEA. Após o crescimento e confirmação da pureza das colônias, as espécies foram identificadas seguindo procedimentos comuns e consultando literatura especializada para cada grupo de fungo. A literatura básica utilizada está relatada no Anexo 1.

### **2.4 Análise de dados**

Foi calculada a média do número de UFC ou percentagem de colonização dentro das comunidades do exocarpo, do mesocarpo e do endocarpo, considerando leveduras, o gênero *Aspergillus* dos grupos *niger*, *ochraceus* e *flavus*, e os gêneros *Penicillium*, *Fusarium* e *Cladosporium*. Outros fungos foram encontrados em menor frequência.

Visando à comparação das diferentes comunidades, foi calculado o índice de contribuição da espécie (IC) na população total. O IC foi calculado

multiplicando-se a porcentagem de grãos colonizados ou o número de UFC de determinada espécie por 100, dividindo-se o valor obtido pelo total de grãos colonizados ou o total de UFC dentro da amostra. A média de IC foi calculada pela média de IC para cada espécie. O IC médio calculado foi submetido ao teste de Scott-Knott de comparação de médias. As espécies foram divididas conforme o seu local de isolamento em espécies exclusivas do exocarpo, mesocarpo e endocarpo.

### 3 RESULTADOS

Pela metodologia empregada, foi possível analisar as comunidades de fungos presentes nas diferentes partes do fruto de café e detectar diferenças qualitativas e quantitativas. Nas 23 amostras avaliadas, foram encontradas 41 espécies de fungos pertencentes a 19 gêneros. Todas as amostras analisadas apresentavam colonização por fungos em todas as partes do fruto. No exocarpo dos frutos, foi recuperado um total de 121.521 UFC. No mesocarpo, foram detectadas 77.394 UFC. Dos 1.380 grãos analisados, 72% apresentaram colonização por pelo menos um fungo.

#### 3.1 Fungos do exocarpo

A comunidade externa do fruto é dominada por propágulos de fungos dos gêneros *Fusarium* e *Cladosporium* além de diferentes tipos de leveduras não identificados. Fungos dos outros grupos foram encontrados com frequência muito inferior (Tabela 1).

**TABELA 1** Colonização das diferentes partes de frutos do cafeeiro pelas principais espécies recuperadas.

Parte	LEV*	ANI	AOC	AFL	PEN	FUS	CCL
Endocarpo	% de grãos colonizados						
	0,0	3,0	6,8	0,2	22,7	25,4	14,1
UFC/cereja							
Mesocarpo	1955,3	3,5	4,4	0,31	313,8	994,7	92,6
Exocarpo	1227,4	8,4	13,0	0,2	571,9	1794,1	1667,9

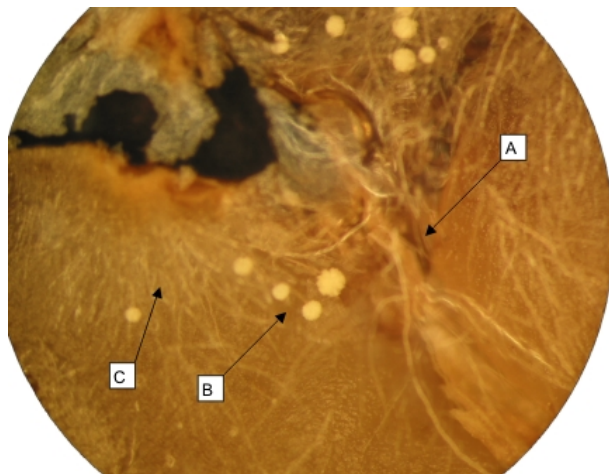
\*Legenda: LEV: leveduras; ANI: *Aspergillus niger*; AOC: *Aspergillus ochraceus*; AFL: *Aspergillus flavus*; PEN: *Penicillium* spp; FUS: *Fusarium* spp.; CCL: *Cladosporium cladosporioides*.

### 3.2 Fungos do mesocarpo

Os fungos recuperados com maior frequência no mesocarpo foram *Fusarium*, *Penicillium* e *Cladosporium*, com  $9,9 \times 10^2$ ,  $3,1 \times 10^3$  e  $9,2 \times 10$  UFC/cereja, respectivamente. *Aspergillus ochraceus* e *Aspergillus niger* foram detectados em quantidades menores no mesocarpo, com 6,9 e 6,1 UFC/cereja, respectivamente (Tabela 1).

### 3.3 Fungos do endocarpo

A presença de *Fusarium* foi registrada em 25% dos grãos, sendo o fungo mais comum. *Penicillium* e *Cladosporium* foram encontrados em 23% e 14% dos grãos, respectivamente; *Aspergillus ochraceus* foi detectado em 7% dos grãos. Não foram detectadas leveduras no grão (Tabela 1). Foi possível detectar o crescimento de *Aspergillus ochraceus* na abertura localizada na face plana do grão, ocorrendo, inclusive, esporulação (Figura 2).



**FIGURA 2** Fotomicrografia do reverso de um grão de café plaqueado em meio DG18 – **A:** abertura inferior do grão; **B:** esporulação de *Aspergillus ochraceus*; **C:** hifas saindo da abertura do grãos. Foto obtida do reverso da placa na qual os grãos foram incubados.



### 3.4 Características da composição das comunidades de fungos das diferentes partes do fruto

Das espécies identificadas, aproximadamente 21% foram encontradas nas três comunidades. Trinta por cento das espécies ocorreram somente no endocarpo e 14% somente no exocarpo. Nenhuma espécie ocorreu exclusivamente no mesocarpo do fruto (Tabela 2).

O índice de contribuição de cada espécie (IC) nas comunidades foi diferente da média de colonização ou UFC. As leveduras apresentam um índice de contribuição elevado nas comunidades do mesocarpo e externa, não sendo detectadas na comunidade interior. Todos os fungos filamentosos apresentaram um IC maior na comunidade interna. No caso do grupo *ochraceus* 11,65 % das espécies identificadas na comunidade interna pertenciam a este grupo (Tabela 3).

**TABELA 2** Distribuição percentual da localização das diferentes espécies recuperadas nas diferentes comunidades do fruto do cafeeiro.

Localização	% em relação ao total de espécies
Somente no endocarpo	30,1
Somente no mesocarpo	0,0
Somente no exocarpo	14,3
Em todas as partes	21,4

**TABELA 3** Índice participação na comunidade das principais espécies recuperadas de diferentes partes do fruto do cafeeiro. Lavras, MG, 2006.

Parte do fruto	LEV	ANI	AOC	AFL	PEN	FUS	CCL
Endocarpo	0,00 a*	6,64 b	11,65 b	0,43 a	29,07 b	31,51b	20,69 b
Mesocarpo	86,55 c	0,14 a	0,30 a	0,01 a	2,95 a	8,49 a	1,56 a
Exocarpo	52,68 b	2,26 a	0,73 a	0,00 a	3,97 a	17,78 a	22,57 b

Legenda: LEV: leveduras; ANI: *Aspergillus niger*; AOC: *Aspergillus ochraceus*; AFL: *Aspergillus flavus*; PEN: *Penicillium* spp; FUS: *Fusarium* spp.; CCL: *Cladosporium cladosporioides*.

\* Números seguidos da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si, pelo teste Scott-Knot , a 95% de confiança.

### 3.5 Diversidade de espécies

Foram encontrados 43 espécies de fungos pertencentes a 19 gêneros (Tabela 4), dos quais o gênero *Aspergillus* foi o que apresentou a maior diversidade. Foram identificadas treze espécies distribuídas em cinco seções. Todas as seções podem ser diferenciadas na placa de leitura devido à sua coloração característica. As espécies da seção *Circumdati* possuem cabeças conidiais de coloração amarela a ocre. As espécies incluídas na seção *Flavi* têm como característica a coloração verde intensa. A coloração marrom-escura até preta é característica da seção *Nigri*. A presença de espécies da seção *Versicolor* é evidenciada pelo micélio colorido e a comum presença de exsudatos. A seção *Aspergillus* é caracterizada na placa pela presença de cleistotécios do teleomorfo *Eurotium* e a cor verde-amarelada ou alaranjada. A diferenciação das espécies dentro de cada seção foi possível utilizando-se metodologia padrão descrita na literatura (Klich 2002; Raper e Fennell 1965).

Dentro do gênero *Penicillium* puderam ser identificadas oito espécies, destacando-se *Penicillium commune*, *P. solitum* e *P. crustosum*, fungos do complexo *aurantiogriseum* e de ampla distribuição em alimentos e *Penicillium raistrickii*, ainda não relatado em café. As espécies do gênero *Penicillium* não

são evidentemente diferenciadas na placa. *Fusarium stilboides*, *F. semitectum* e *F. oxysporum* foram as espécies de *Fusarium* encontradas. Normalmente, *Fusarium stilboides* apresenta uma coloração rósea a salmão enquanto *Fusarium semitectum* apresenta uma coloração arroxeadada intensa. *Fusarium oxysporum* apresentava-se com o micélio algodonoso e claro. *Fusarium stilboides* é o fungo com maior frequência na maioria das amostras. *Cladosporium cladosporioides* foi a única espécie de *cladosporium* encontrada, sendo caracterizada pela cor verde oliva e o reverso invariavelmente preto. Os outros gêneros encontrados representavam, normalmente, um pequeno percentual, porém, foram os responsáveis pelo aumento da diversidade.

### **3.6 Chave de identificação**

Foi possível construir uma chave de identificação das principais espécies presentes nas comunidades. A chave é baseada nas características observadas na leitura direta, como textura da colônia, cor e presença de determinadas estruturas do fungo (Anexos 1 e 2).

**TABELA 4** Espécies associadas a diferentes partes do fruto do cafeeiro. Lavras, MG, 2006.

Espécies	Parte do Frutos		
	Endocarpo	Mesocarpo	Exocarpo
<i>Aureobasidium pullulans</i>		X	X
<i>Alternaria alternata</i>			X
<i>Aspergillus awamori</i>	X	X	X
<i>Aspergillus carbonarius</i>	X		
<i>Aspergillus flavus</i>	X	X	X
<i>Aspergillus japonicus</i>	X		X
<i>Aspergillus melleus</i>	X		
<i>Aspergillus nige</i>	X	X	X
<i>Aspergillus ochraceus</i>	X	X	X
<i>Aspergillus phoenicis</i>	X		
<i>Aspergillus sclerotiorum</i>	X		
<i>Aspergillus sulphureus</i>	X	X	X
<i>Aspergillus versicolor</i>	X		X
<i>Eurotium amstelodami</i>	X		X
<i>Eurotium chevalieri</i>	X		X
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	X	X	X
<i>Clonostachys rosea</i>			X
<i>Colletotrichum</i> sp.			X
<i>Cunningamella elegans</i>	X		
<i>Epicoccum</i> sp.			X
<i>Fusarium oxysporum</i>	X	X	X
<i>Fusarium semitectum</i>	X	X	X
<i>Fusarium stilboides</i>	X	X	X
<i>Fusicoccum</i> sp.			X
Leveduras		X	X
<i>Micélio estéril claro</i>	X		
<i>Micélio estéril escuro</i>	X		
<i>Monochaeta</i> sp.	X		
<i>Nigrospora</i> sp.	X		
<i>Penicillium brevicompactum</i>	X		
<i>Penicillium purpurogenum</i>	X		X
<i>Penicillium citrinum</i>	X		
<i>Penicillium crustosum</i>	X	X	
<i>Penicillium commune</i>	X		
<i>Penicillium purpurogenum</i>	X		
<i>Penicillium solitum</i>	X		X
<i>Penicillium raistrickii</i>	X		X
<i>Penicillium glabrum</i>			X
<i>Phoma jolyana</i> var. <i>jolyana</i>	X		X
<i>Rhizopus stolonifer</i>	X		X
<i>Trichoderma</i> sp.	X		X
<i>Wallemia sebi</i>			X

## 4 DISCUSSÃO

### 4.1 Comunidade do exocarpo

A comunidade externa dos frutos do cafeeiro é constituída por fungos de ampla distribuição na natureza e, aparentemente, existe um padrão em relação à ocorrência destes fungos. Externamente, predominam as espécies de leveduras, seguidas dos gêneros *Fusarium*, *Cladosporium* e *Penicillium*. A diversidade de fungos filamentosos encontrada na suspensão de lavagem de cerejas por Silva et al. (2000) foi semelhante à encontrada neste estudo; *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium* e *Aspergillus* foram os gêneros predominantes. Neste mesmo estudo foi demonstrada a importância da escolha do meio de cultura, quando o objetivo era isolar bactérias, fungos ou leveduras (Silva et al., 2000).

Em frutos cerejas do México foi encontrada uma diversidade mais reduzida, com predominância dos gêneros *Penicillium* e *Mucor*, porém, o objetivo do trabalho era isolar somente fungos ocratoxigênicos (Suárez-Quiroz et al., 2004). Os resultados de colonização dos grãos por frutos, quando se utiliza o plaqueamento direto da cereja, são sensivelmente diferentes dos resultados de lavagem e diluição da solução de propágulos. Utilizando o plaqueamento direto de cerejas de café de duas localidades do Brasil, em papel de filtro, verificou-se uma colonização de 54,2% a 72,8% dos frutos por *Fusarium*, 0,4% a 10,4% com *Penicillium* e 3,6% a 10,8% com *Cladosporium*. O gênero *Aspergillus* não foi detectado nas cerejas (Alves e Castro, 1998).

O plaqueamento direto de cerejas com o objetivo de isolar espécies ocratoxigênicas permitiu a detecção da presença de *Aspergillus ochraceus* em 0,25% das cerejas, trabalhando com meio de cultura DG18 (Taniwaki et al., 2003). Comparado aos dados de literatura, o plaqueamento da suspensão de lavagem da cereja revelou-se mais eficiente quando o objetivo é estudar a

diversidade de fungos. O plaqueamento direto de frutos do tipo cereja pode favorecer o crescimento de espécies mais agressivas, como *Fusarium* e *Cladosporium*, impedindo a detecção de *Aspergillus*. A diluição da suspensão de lavagem em um meio contendo fatores limitantes ao crescimento rápido destas espécies e a “individualização” das unidades formadoras de colônias no plaqueamento permitem a recuperação de uma maior diversidade. Outra característica do método é que, na comunidade externa, são avaliados propágulos do fungo que entraram em contato com o fruto, e não necessariamente micélio ativo do fungo. Por outro lado, o método contém limitações quanto às características quantitativas, pois, uma única cereja com carga microbiana alta pode “distribuir” seus propágulos para todas as outras.

#### **4.2 Comunidade do mesocarpo**

Os estudos da diversidade de fungos filamentosos específicos no mesocarpo dos frutos são escassos. As bactérias e leveduras parecem ser os microrganismos predominantes neste ambiente. Os fungos filamentosos constituíram menos de 5,2% da microbiota total de cascas de café no México, com predominância do gênero *Aspergillus* (Rouss et al., 1995). Em nosso estudo houve também predominância de leveduras, porém, o índice de participação dos fungos na composição da comunidade foi maior que 40%. A diferença entre os resultados pode ser explicada pela não quantificação de bactérias em nosso estudo, o que contribui muito com a contagem geral. A diversidade de fungos no mesocarpo é sensivelmente menor que nas outras duas comunidades estudadas, fato já esperado devido à composição química do substrato, constituído de carboidratos (210 a 320 g/kg), proteínas (75 a 150 g/kg) e gorduras: (20 a 70 g/kg) além da presença de flavanas, proantocianidinas, ácido hidrox-cinamico, ácido cafeolquínico e seus derivados, ácido coumarolquínico, flavonóides e

antocianidinas que são componentes que não favorecem o crescimento de fungos (Ramirez-Coronel et al., 2004; Rojas et al., 2003).

### 4.3 Comunidade do endocarpo

Em estudo da colonização de amostras de grãos de café por espécies toxigênicas, foi verificado que 96% estavam colonizadas por alguma espécie de *Aspergillus* e 42% por alguma espécie de *Penicillium* (Batista et al., 2003). No presente estudo, o gênero encontrado com maior frequência na comunidade interna foi *Fusarium*, colonizando 25% dos grãos. O gênero *Penicillium* também foi abundante, colonizando 23% da comunidade interna. A alta frequência de *Fusarium* registrada pode ser consequência do substrato escolhido para análise, visto que as espécies de *Fusarium*, normalmente, exigem maior disponibilidade de água para o seu crescimento, condição que não é atendida no grão de café beneficiado, que contém, normalmente, entre 11% e 12 % de umidade.

Suárez-Quiroz et al. (2004) verificaram que entre 72% e 80% dos grãos de cafés com pergaminho estavam colonizados por fungos, sendo 6% a 8 % da espécie *Aspergillus ochraceus* e 13% a 15% com espécies do grupo *Niger*. O tipo de substrato analisado pelo autor é muito semelhante ao utilizado no presente estudo para comunidade interna, sendo os resultados muito próximos para a espécie *Aspergillus ochraceus*.

A análise de grãos de café secos evidencia a influência principalmente da umidade na colonização por fungos. Analisando frutos do tipo cereja, Alves e Castro (1998) não detectaram a presença *Aspergillus ochraceus* ou *Aspergillus niger* nas cerejas, sendo que até 72% destas estavam colonizadas por *Fusarium*. Após a secagem e beneficiamento dos grãos da mesma área, a percentagem de colonização de grão por *Fusarium* foi reduzida a 12,4 % e a de *Aspergillus ochraceus* aumentou para 77,2%.

Neste estudo não foi possível detectar leveduras na comunidade interna, possivelmente, porque elas estão presentes no grão, mas, devido à sua forma de crescimento, não é possível recuperá-las plaqueando diretamente o grão. Metodologias eficientes na recuperação de leveduras têm de ser baseadas em lavagem das partículas.

#### **4.4 Diferenças na composição das comunidades**

O sucesso de uma metodologia para a detecção de determinados grupos de fungos, neste caso aqueles que de alguma forma podem influenciar na qualidade do café, está estritamente relacionado ao uso de uma metodologia que iguale as condições para que todos importantes grupos de fungos se manifestem. Vários trabalhos detectam a predominância de espécies de *Fusarium* em grãos de cafés quando se utilizam meios que não apresentam nenhum tipo de restrição ao seu crescimento, como MA2% ou BDA. O meio DG18, utilizado neste estudo, permitiu o equilíbrio na recuperação dos propágulos dos fungos, restringindo o crescimento, mas não impedindo a detecção de espécies como *Fusarium* e *Cladosporium* e, concomitantemente, permitindo a recuperação de espécies de crescimento extremamente lento, como *Wallemia sebi*, relatada pela primeira vez em cafés no Brasil com a aplicação da metodologia (Pfenning e Pereira, 2003).

Outra característica do método é a fácil detecção no meio dos diferentes grupos de fungos, marcada pela forte manifestação de cor e textura característica, o que permite uma fácil padronização entre as leituras.

A facilidade de leitura permite que a metodologia seja utilizada na detecção de espécies potencialmente toxigênicas com certa segurança. Isso pôde ser confirmado neste trabalho onde as espécies do grupo *ochraceus* foram facilmente detectadas, assim como a única espécie do grupo *niger* toxigênica, *Aspergillus carbonarius*. A facilidade de leitura e de detecção de espécies



potencialmente toxigênicas também foi verificada por Batista (2005) utilizando metodologia semelhante. Dentro do grupo *ochraceus* é possível notar diferença de coloração entre as espécies, porém um diagnóstico mais preciso só pode ser feito após o devido isolamento e teste do potencial toxigênico. A diferenciação da espécies toxigênicas dentro do grupo *niger* na placa não é simples, porém qualquer colônia da qual se suspeite ser de *Aspergillus carbonarius* pode ter facilmente sua identidade comprovada pelo simples toque com fita adesiva na colônia e exame ao microscópio, sendo os esporos de *Aspergillus carbonarius* bem maiores ( $>5\mu$ ) e espinosos que os de *Aspergillus niger* ( $<5\mu$ ).

A metodologia pode ser facilmente adaptada ao trabalho com os mais diferentes tipos de café existentes no mundo, permitindo a diferenciação entre comunidades de fungos presentes na casca do café seco e no grão.

O monitoramento dos fungos na fase de cereja, e a detecção de algumas espécies já nesta fase permitem deduzir que algumas espécies já estão associadas ao cafeeiro muito antes do seus frutos serem retirados da planta, sendo a sua manifestação, como já foi constatado em outros estudos, relacionada a fatores ambientais. Assim, a proposta de eliminação de inóculo, promovendo uma verdadeira “caça ao fungo”, levantando-se até a possibilidade do uso de fungicidas, deve passar por uma revisão, enfocando-se, de agora em diante, uma visão de aplicação de práticas que não permitam que os fungos indesejáveis se desenvolvam, como, por exemplo, por meio de uma boa secagem.

Os protocolos descritos, apesar de apresentarem um custo um pouco mais elevado que o tradicional “*blotter test*”, permitem a detecção e a quantificação rápida e confiável de fungos presentes em grãos e frutos de café, principalmente das espécies que oferecem potencialmente risco para a qualidade e a segurança do produto. A adoção de procedimentos padronizados por todos os grupos envolvidos seria de grande valia, pois, permitiria a avaliação e a comparação de dados levantados em locais diferentes.

## 5 CONCLUSÕES

1. A metodologia desenvolvida foi eficiente na detecção de fungos filamentosos nas diferentes partes do fruto.
2. O uso da metodologia garante, com certa segurança, que as espécies efetivamente recuperadas estão localizadas em determinada fração do fruto.
3. Existem diferenças entre as comunidades de fungos encontrados nas diferentes partes do grão, porém, algumas espécies são comuns a todas as partes.
4. Leveduras, *Fusarium* ssp., *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp. e *Cladosporium* sp. são os principais fungos associados aos frutos do cafeeiro.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABARCA, M.L. et al. Current importance of ochratoxin A-producing *Aspergillus* spp. **Journal of Food Protection**, v.64, p.903-906, 2001.
- ALVES, E.; CASTRO, H.A. Fungos associados ao café (*Coffea arabica* L.) nas fases de pré e pós-colheita em lavouras da região de Lavras. **Summa Phytopathologica**, v.24 , p.4-7, 1998.
- BUCHELI, P.; TANIWAKI, M.H. Research on the origin, and on the impact of post-harvest handling and manufacturing on the presence of ochratoxin A in coffee. **Food Additives Contamination**, v.19, p.655-65, 2002.
- CHALFOUN, S.M; BATISTA, L.R. **Fungos associados a frutos e grãos do café: *Aspergillus* e *Penicillium***. Brasília: Embrapa, 2003. 69p.
- ELLIS, M.B. **Dematiaceous Hyphomycetes**. Wallingford, UK: CAB International, 1971. 608p.
- ELLIS, M.B. **More Dematiaceous Hyphomycetes**. Wallingford, UK: CAB International, 1976. 507p.
- FUNGARO, M.H. et al. A molecular method for detection of *Aspergillus carbonarius* in coffee beans. **Current Microbiology**, v.49, p.123-127, 2004.
- IARC.International agency on research cancer.**Ochratoxin A** - a monograph on the evaluation of carcinogenic risk to humans. Lyon: France: IARC/WHO, 1993. v.56, p.489.
- JOOSTEN H.M. et al. Production of ochratoxin A by *Aspergillus carbonarius* on coffee cherries., **International Journal of Food Microbiology**, v.11, p.39-44, 2001.
- KLICH, M.A. **Identification of common *Aspergillus* species**. 5.ed. Utrecht, The Netherlands: CBS, 2002. 116p.
- KRUG, H.P. Cafés duros I. **Revista do Instituto de Café do Estado de São Paulo**, Campinas, v.15, n.159, 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, 1940b.

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

MANTLE, P.G.; CHOW, A.M. Ochratoxin formation in *Aspergillus ochraceus* with particular reference to spoilage of coffee. **International Journal of Food Microbiology**, v.25, p.105-109, 2000.

MARTINS M.L.; MARTINS H.M.; GIMENO A. Incidence of microflora and of ochratoxin A in green coffee beans (*Coffea arabica*). **Food Additives and Contaminants**, v.20, n.12, p.1127-1131, 2003.

NORTHOLT, M.D.; BULLERMAN, L.B. Prevention of Mold Growth and toxin production through Control of Environmental Conditions. **Journal of Food Protection**, v.45, p.519-526, 1982.

PARDO, E. et al. Occurrence of ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in green coffee from different Origins. **Food Science Technology International**, v.10, n.1, p.45-50, 2004.

PFENNING, L.H.; PEREIRA, R.T.G. Ocorrência de *Wallemia sebi* em grãos de café beneficiado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 36., 2003, Uberlândia, MG. **Anais...** Brasília, DF: SBF, 2003.

PFOHL-LESZKOWICZ, A. et al. Balkan endemic nephropathy and associated urinary tract tumours: a review on aetiological cause and the potential role of mycotoxins. **Food Additives and Contaminants**, v.19, p.282-302, 2002.

PITT, J.I. **A laboratory guide to common *Penicillium* species**. 3.ed. Austrália: Food Science Australia, 2000. 197p.

RAPER K.B.; FENNELL, D.I. **The genus *Aspergillus***. Malabar, Florida: R. Krieger, 1965. 686p.

ROUSSOS, S. et al. Biotechnological management of coffee pulp isolation, screening, characterization, selection of caffeine-degrading fungi and natural microflora present in coffee pulp and husk. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.42, p.756-762, 1995.

ROJAS, U.J.B. et al. Biological treatments affect the chemical composition of coffee pulp. **Bioresource Technology**, v.89, p.267-274, 2003.

SALAZAR, G.M.R. et al. Estudio anatomico y ultraestructural del fruto de café *Coffea arabica*. **Cenicafé**, v.45, p.93-105, 1994.

SAMSON, R.A. et al. **Introduction to food and air-borne fungi**. 6.ed. Baarn, The Netherlands: CBS, 2000. 389p.

SAXENA, J.; MUNIMBAZI, C.; BULLERMAN, L.B. Relationship of mould count, ergosterol and ochratoxin A production. **International Journal of Food Microbiology**, v.71, p.29-34, 2001.

SCHMIDT, H. et al. Detection and quantification of *Aspergillus ochraceus* in green coffee by PCR, **Letters Applied Microbiology**, v.38, p.464-469, 2004.

SILVA, C.F. et al. Microbial diversity during maturation and natural processing of coffee cherries of *Coffea arabica* in Brazil. **International Journal Food Microbiology**, v.60, p.251-260, 2000.

SUÁREZ-QUIROZ, M. et al. Study of ochratoxin A-producing strains in coffee processing. **International Journal of Food Science Technology**, v.39, p.501-507, 2004.

TANIWAKI, M.H. Meios de cultura para contagem de fungos em alimentos. **Boletim Sociedade Brasileira Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.30, p.132-141, 1996.

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

**ANEXO 1** Chave para a identificação dos principais tipos de fungos associados a grãos de café

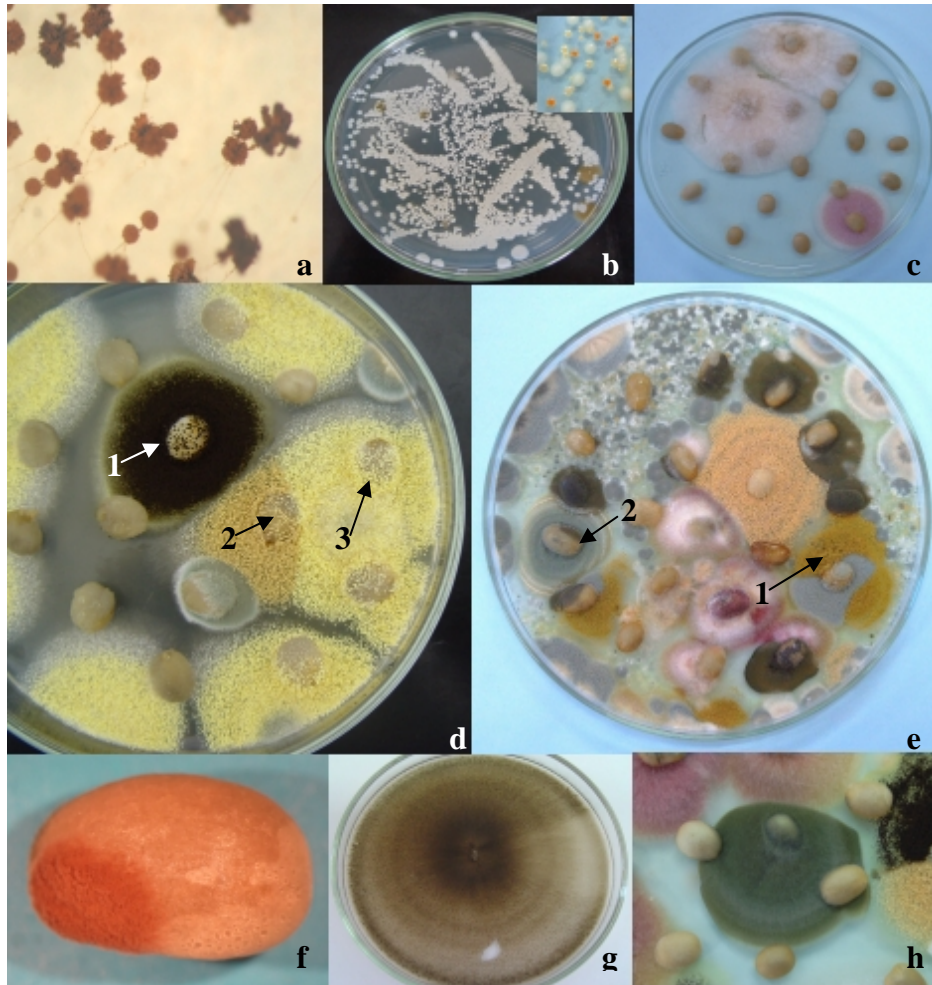
1 Fungos com estipes e vesículas ( <b>Fig*. 1 a</b> )	2
1 Fungos sem estipes e ou vesículas	3
1 Colônias de aspecto cremoso, lisas, brancas, creme ou vermelhas ( <b>Fig. 1 b</b> )	<i>Leveduras</i>
2 <i>Aspergillus</i> spp. – colônias geralmente de cor definida	
Colônias amarelas a ocre ( <b>Fig. 1 d-2 e d-3</b> )	<i>Grupo ochraceus</i>
Colônias marrom-escuras a pretas ( <b>Fig 1 d-1</b> )	<i>Grupo Niger</i>
Colônias esverdeadas ( <b>Fig. 1 e-1</b> )	<i>Grupo Flavus</i>
Colônias amarelo-esverdeadas, cleistotécio normalmente presente	<i>Eurotium</i>
3 Crescimento aveludado cinza, verde ou azulado, reverso nunca preto, estipe presente, conídios secos ( <b>Fig. 1 e-2</b> )	<i>Penicillium</i>
3 Colônia vermelha a púrpura, conídios úmidos ( <b>Fig. 1 c</b> )	<i>Fusarium</i>
3 Outros tipos	4
4 Pequenas colônias marrons, pulverulentas e aveludadas ( <b>Fig. 1 f</b> )	<i>Wallemia sebi</i>
4 Colônias esverdeadas, picnídio usualmente presente ( <b>Fig. 1 g</b> )	<i>Phoma</i>
4 Colônias verde-escuro, reverso sempre preto (Fig. 1 h)	<i>Cladosporium</i>

\* Anexo 2

**Literatura para identificação das espécies**

Grupos	Literatura Básica
<i>Aspergillus</i>	Chalfoun & Batista, 2003; Klich, 2002; Raper & Fennell, 1965; Samson et al., 2000; Domsch & Gams, 1993
<i>Penicillium</i>	Chalfoun & Batista, 2003; Pitt, 2000; Samson et al., 2000; Domsch & Gams, 1993
<i>Fusarium</i>	Samson et al., 2000; Domsch & Gams, 1993
Zigomicetos	Samson et al., 2000
Outros	Ellis, 1976; Ellis, 1971; Samson et al., 2000

## ANEXO 2



Principais espécies associadas a grãos do café: **a-** estipes e cabeças conidiais de *Aspergillus carbonarius*; **b-** colônias de Leveduras; **c-** colônias de *Fusarium* spp.; **d-** **1:** *Aspergillus niger*, **2** *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus sulphureus*, **e** - **1** e **2** *Penicillium* spp; **f-***Wallemia sebi*; **g-** *Phoma jolyana*; **h-** *Cladosporium cladosporioides*.

## **CAPÍTULO 5**

### **ANÁLISE DA POSSIBILIDADE DE DESENVOLVIMENTO E IMPLEMENTAÇÃO DE UM PLANO HACCP PARA O AGRONEGÓCIO CAFÉ, COM ÊNFASE NO CONTROLE DO RISCO CONTAMINAÇÃO POR OCRATOXINA A**



## RESUMO

PEREIRA, Ricardo Tadeu Galvão. Análise da possibilidade de implementação do plano HACCP para o agronegócio café, com ênfase no controle da contaminação por ocratoxina A. In: \_\_\_\_\_. **Diversidade e frequência de fungos associados a frutos e grãos de café**. 2006. Cap. 5, p.116-151. Tese (Doutorado em Agronomia-Fitopatologia), Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. \*

A prevenção dos riscos à saúde do consumidor é um passo essencial na cadeia produtiva de qualquer produto quando se deseja atingir o mercado mundial. Na cadeia produtiva do café, um dos principais perigos à segurança do produto é a presença do metabólito tóxico conhecido como a ocratoxina A (OTA), que é produzido pelas espécies *Aspergillus ochraceus* e *A. carbonarius*. HACCP é um sistema baseado em uma ferramenta de engenharia conhecida como análise de falha, modo e efeito, que busca potenciais falhas em uma operação e os seus efetivos mecanismos de controle. A implementação do plano é feita por meio do criterioso estudo das fases de produção e posterior aplicação dos princípios do HACCP. O objetivo do presente capítulo foi estudar a viabilidade da implementação do sistema *Hazard Analysis and Critical Control Point*, HACCP, ou Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle, APPCC, na cadeia produtiva do café. O produto foi descrito desde a fase de campo até o consumidor e as práticas e condições que levam a obtenção de um produto seguro foram relatadas com base em observações de campo e dados da literatura. Os fluxogramas de produção pela via seca e via úmida de processamento foram construídos e validados. A análise de perigos evidenciou como perigo biológico a presença de fungos potencialmente toxigênicos e a presença da ocratoxina A como principal perigo químico. Frutos aderidos à planta após o ponto ideal de colheita, seco no pé, ou cafés em contato com o solo, varrição, foram simulados como exemplo de pontos críticos de controle. Foi descrito um exemplo de sistema de monitoramento baseado na presença dos produtos considerados como de alto risco, como os cafés de varrição e SNP, além das ações corretivas, quando forem detectadas falhas no processo. Conclui-se que o sistema HACCP é passível de ser implementado na cadeia produtiva do café. No entanto, maiores estudos metodológicos e científicos precisam ser conduzidos, bem como um amplo programa de treinamento dos colaboradores envolvidos na cadeia produtiva.

---

\* Comitê de Orientação: Ludwig H. Pfenning – UFLA (orientador); Hilário Antônio de Castro – UFLA (co-orientador)

## ABSTRACT

PEREIRA, Ricardo Tadeu Galvão. Analysis of the possibility of implementation of an HACCP plan for the agrobusiness coffee, with emphasis to the control of the contamination by ochratoxin A. In: \_\_\_\_\_. **Diversity and frequency of fungi associated to fruits and beans of coffee**. 2006. Cap. 5, p.116-151. Thesis (Doctorate in Agronomy-Phytopathology), Federal University of Lavras, Lavras, MG.\*

Prevention of health risks of consumers is an essential step within the productive chain of whatever product when international markets are looked for. In the coffee production chain, the most important hazard to food safety is the contamination by a mycotoxin known as ochratoxin A (OTA), produced by species like *Aspergillus ochraceus* and *A. carbonarius*. The system HACCP is based on an engineering tools inspired in analysis of probable fails, way of action and effect, looking for possible fails within a chain of operation and its effective mechanisms of control. The implementation of the HACCP plan includes criterious evaluation of every step in the production process and posterior application of principles. The objective of the present study was to investigate the feasibility of implementation of a HACCP plan to the production chain of coffee. The product was described in all moments, beginning in the pre-harvest phase up to the consumer. Practices and proceedings within the production chain that will lead to a safe end-product are described, based on field studies or literature. The process was represented in all steps by flow-diagrams, which are then validated. Hazard analysis evidenced that the most important biological hazard is the presence of potentially ochratoxin producing fungi and the main chemical hazard contamination by ochratoxin A. Tree-drying of cherries or fruits in contact with soil are simulated as an example for probable critical control points. A model system for monitoring presence of products considered as a risk to the safety of the product, like tree-dried or swept coffee, was described, including possible actions for prevention in the case of fails during the production process. We conclude that the implementation of an HACCP plan to the production chain of coffee is possible. Nevertheless, more information on methodology is needed, as well as training of collaborators within the production chain.

\* AdvisingCommittee : Ludwig H. Pfenning – UFLA (adviser); Hilário Antônio de Castro – UFLA (co-adviser)

## 1 INTRODUÇÃO

O projeto “*Enhancement of Coffee Quality through Prevention of Mould Formation*”, iniciado em meados do ano 2000 e conduzido pela FAO, tinha uma meta ousada: desenvolver um plano que garantisse a qualidade do produto café quanto à segurança do produto. Varias ações de pesquisa foram, então, desenvolvidas nos principais países produtores, visando o desenvolvimento do plano HACCP para o café. Reforçando a necessidade de melhoria da qualidade do produto, a implantação de um sistema de produção integrada de café, que garanta a sustentabilidade, prevê a implementação de um programa de boas práticas agrícolas e, se possível, de HACCP. Este capítulo tem como objetivo caracterizar o sistema de produção de café e discutir a possibilidade de implantação do sistema HACCP na cadeia produtiva de café. Para levantamento dos dados para a elaboração do plano HACCP, foi feito um questionário estruturado com questões relativas a todo o sistema de produção, o qual foi respondido pelos responsáveis pela propriedade. As propriedades foram visitadas e um amplo registro fotográfico foi feito de todas as fases de produção. Foram construídos fluxogramas de produção esquematizando o processo de obtenção do produto. A partir destes dados, foi elaborado um roteiro de implementação, enquadrando os princípios de HACCP.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Roteiro para elaboração do plano de HACCP

A partir dos dados de literatura (Moortmore & Wallace, 2001; SEBRAE, 2000a; SEBRAE, 2000b; CODEX, 1997; Corlett, 1998; Moortmore e Wallace, 1996) e dos dados sobre segurança do produto café foi estabelecido um roteiro para elaboração do plano HACCP contendo os seguintes itens:

1. descrição completa do produto;
2. descrição dos fatores e elementos que levam a obtenção de um produto seguro;
3. construção de um fluxograma de produção;
4. validação do fluxograma de produção;
5. aplicação dos princípios (estudo do plano HACCP);
  - 5.1 condução de uma análise de perigo;
  - 5.2 determinação dos pontos críticos de controle – PCCs;
  - 5.3 estabelecimento dos limites críticos;
  - 5.4 estabelecimento do monitoramento dos PCCs;
  - 5.5 estabelecimento de ações corretivas, quando houver indicação que um PCC está fora do controle;
  - 5.6 estabelecer procedimentos de verificação se o sistema HACCP está funcionando corretamente
  - 5.7 estabelecer procedimentos de documentação e registro do sistema HACCP.

O roteiro para a implementação do plano HACCP foi elaborado para minimização dos riscos na produção de cafés pré-processados tanto pela via seca como pela via úmida.

## **2.2 Descrição completa do produto**

A descrição do produto café foi feita utilizando-se observações de campo e dados constantes na literatura. Foi feita a descrição do produto desde a fase pré-colheita até o pré-beneficiamento, utilizando-se dados coletados no campo. Do beneficiamento até a obtenção do produto final, foram utilizadas informações de literatura e informações pessoais de elementos ligados ao setor.

## **2.3 Descrição dos fatores e elementos que levam à obtenção de um produto seguro**

No levantamento das variáveis que levam à obtenção de um produto seguro foram observadas informações de literatura e conduzidos estudos sobre a ecologia dos fungos envolvidos no processo de produção de ocratoxina, como os constantes no Capítulo 3.

## **2.4 Construção de um fluxograma de produção**

Na construção do fluxograma de produção foram visitadas 22 propriedades produtoras de café nas regiões Sul e Zona da Mata do estado de Minas Gerais e Montanhas (Centro-Sul) do estado do Espírito Santo no ano de 2002. Os fluxogramas foram construídos a partir da observação, documentação fotográfica e da aplicação de um questionário estruturado. As informações obtidas foram sistematizadas e foram construídos dois tipos de fluxogramas, sendo um informativo, caracterizando a produção e outro destacando os pontos de risco.

## **2.5 Validação do fluxograma de produção**

No ano de 2003 as propriedades foram novamente visitadas e os fluxogramas foram validados.

## **2.6 Aplicação dos princípios (Estudo do plano HACCP)**

De posse dos dados levantados com o questionário estruturado, a documentação fotográfica e os dados de literatura foi elaborado um plano de implementação do sistema HACCP, de acordo com seus princípios.

## 3 RESULTADOS

### 3.1 Descrição do produto

O café é um fruto produzido por algumas espécies de plantas da família das rubiáceas, sendo a espécie mais importante e objeto deste estudo *Coffea arabica* L. O fruto produzido é uma baga constituída de um pericarpo dividido em exocarpo, mesocarpo, endocarpo e semente, que constitui a parte de interesse comercial. O processo de maturação é marcado pela mudança da coloração da casca do verde para o vermelho ou amarelo e se inicia, aproximadamente, 195 dias após a fecundação. A maturação completa se dá por volta de 210 dias.

Vale ressaltar que o café é um dos casos únicos em que se colhe um fruto e o mesmo é processado de modo a perder água e estruturas indesejáveis, para a obtenção de um produto final, que é uma semente. Após o completo desenvolvimento do fruto, quando os mesmos apresentam a cor amarela ou vermelha, dependendo da variedade, inicia-se o ponto ideal de colheita. Ao fruto no ponto ideal de colheita dá-se o nome de cereja. Neste estágio, o fruto apresenta todas as suas características de qualidade e, se bem processado, dará origem a produtos sem nenhum risco à segurança do alimento.

Após a colheita, o fruto passa por um processo de transporte até a estrutura de pré-processamento e secagem. O processo de retirada de estruturas indesejáveis, no caso a casca, pode ser iniciado quando o exocarpo e parte do mesocarpo são removidos do fruto do tipo cereja pelos processos conhecidos como descascamento de cerejas, despulpagem e demucilagem. Na estrutura de secagem, o fruto perde água até o teor de umidade de 11% a 12%. Após a secagem o fruto segue para a estrutura de beneficiamento, onde o pericarpo inteiro ou parte deste, agora seco, é removido por atrito. Após a remoção do pericarpo o mesmo é separado da semente por estruturas de peneiras e as

sementes, a partir de agora chamadas de grãos, são separadas em diferentes tamanhos. O produto final do beneficiamento que ocorre nas maiorias das propriedades é o café conhecido como “bica corrida”, pois, não foi realizado nenhum processo especial de classificação por tamanho ou forma do grão. Os grãos são, então, ensacados em sacos de juta com capacidade para 50 kg e são armazenados em pilhas.

O café “bica corrida”, a partir do momento que entra na indústria ou cooperativa, é classificado de acordo com a qualidade da bebida, a quantidade de defeitos, tamanho e o formato dos grãos. Os defeitos que geram desclassificação do produto são a presença de grãos pretos, verdes, ardidos, brocados, quebrados, de coloração fora do padrão, entre outros.

Dentro da indústria ou cooperativa, o café pode tomar diferentes destinos, comentados sucintamente a seguir.

### **Rebeneficiamento**

O rebeneficiamento, normalmente, é realizado por máquinas constituídas por células fotoelétricas que separam os grãos defeituosos e também por um conjunto de peneiras que separam o café de acordo com o seu tamanho e formato, procedimento que é conhecido como classificação em peneira. O café livre da maioria dos defeitos e dividido em lotes, de acordo com a sua peneira, normalmente é encaminhado para a exportação armazenado em sacarias de 50 kg ou container.

### **Industrialização**

No caso dos cafés arábica, estes podem seguir direto para a industrialização, onde passa por um processo de torra a 120°C, moagem e embalagem e distribuição aos postos de venda. O produto final deste processo de industrialização é conhecido como “pó de café” e, normalmente, é vendido em



embalagens de 250 e 500g de plástico, aluminizadas, papel ou, menos comumente, latas. Outros processos de industrialização, como a obtenção de cafés solúveis ou outras bebidas à base de café, como capuccino envolvem processos industriais mais complexos.

### **Consumidor final**

No Brasil, a forma predominante de consumo do café é a bebida obtida pela passagem de água fervente pelo pó de café, que é coada em filtros de pano ou papel. A bebida pode ser adoçada e consumida pura ou em misturas normalmente como acompanhamento de bolos, pães e biscoito no desjejum, conhecido como café da manhã, e durante todo o dia.

### **3.2 Descrição dos fatores e elementos que levam à obtenção de um produto seguro**

Um produto seguro é aquele que não traz nenhum risco à saúde do consumidor, quando consumido de forma equilibrada. A obtenção de café seguro, do ponto de vista microbiológico e químico, com características que não permitam ou limitem o crescimento de fungos potencialmente ocratoxigênicos, está ligada, principalmente, aos grupos ecológicos de fungos em associação com os grãos e à disponibilidade de condições que permitam o crescimento de determinado grupo em detrimento de outro. O principal parâmetro a ser considerado é a disponibilidade de água para o desenvolvimento dos fungos potencialmente ocratoxigênicos e a competição entre estes grupos e os demais.

Com base nas evidências de literatura, podem-se considerar como potencialmente seguros os cafés que atinjam uma umidade de 11% a 12% na base úmida e não mais voltem a ganhar umidade após este patamar. Um lote de café colhido no ponto ideal de colheita e secado a até 11 a 12% de umidade em um intervalo de tempo de 5 a 10 dias pode ser considerado um produto seguro.

Por outro lado, um café que seca aderido à planta até 12% de umidade e depois volta a se re-hidratar a umidades maiores que 14%, tem sua segurança comprometida devido ao atendimento de condições ideais para a produção da toxina.

### **3.3 Construção de um fluxograma de produção**

Foram construídos fluxogramas representando as fases de colheita (Figura 2) e a fase de processamento por via seca ou via úmida (Figuras 3 e 4). Os fluxogramas foram construídos destacando-se os tipos de cafés envolvidos no processamento utilizando setas coloridas para representar cada tipo.

#### **3.3.1 Fluxograma colheita**

Devido ao fato da colheita constituir uma etapa importante na obtenção de um café de qualidade, foi construído um fluxograma para representar esta etapa. O processo da colheita pode ser descrito através das seguintes etapas (Figura 1):

**Arruação:** é o processo de retirada de folhas, restos culturais e terra solta debaixo das plantas onde será realizada a colheita. Pode ser realizado mecanicamente, com o uso de arruadores acoplados ao trator ou manualmente com enxada. Todo o material retirado é enleirado nas entrelinhas do café. Normalmente, esta operação é realizada no começo da safra em toda a lavoura.

**Varrição:** é a retirada do café que está em contato com o chão no momento da colheita. Esta etapa é realizada com o auxílio de rodos, vassouras ou enxada. O café retirado é uma mistura de solo e folhas que passa por um processo de abanação. Os cafés se desprendem da planta, entrando em contato com o solo, devido a fatores climáticos, como ocorrência de um veranico forte, má nutrição

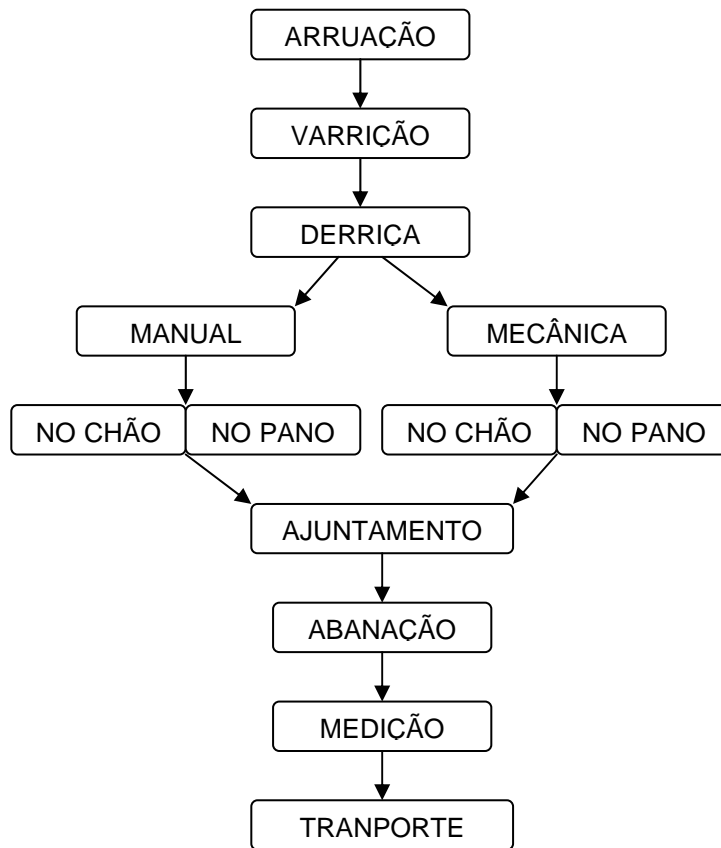
ou fatores bióticos como a ocorrência de Cercosporiose ou Mancha de *Colletotrichum*. Um fator importante nos cafés de varrição é o tempo de permanência dos mesmos em contato com o chão. Este tempo pode variar de algumas horas até meses dependendo da velocidade de colheita da fazenda. As condições encontradas debaixo da projeção da copa do cafeeiro são as mais diversas possíveis, podendo ser altamente favoráveis ao desenvolvimento de fungos que possam deteriorar a qualidade do café. Normalmente, o café de varrição é separado, porém, em algumas propriedades ocorre mistura com café derriçado.

**Derriça:** é o processo de retirada dos frutos da planta. A derriça pode ser feita manualmente onde o trabalhador desliza a mão sobre o ramo no sentido tronco ponta dos ramos, arrancando os frutos e parte da folhagem da planta. Existem máquinas no mercado que vibram os ramos, promovendo a retirada dos frutos e parte das folhas. No processo mecânico, a parte metade superior da planta é derriçada com a derriçadora trabalhando inclinada para cima e a metade inferior com a derriçadora trabalhando inclinada para baixo. Uma terceira possibilidade de colheita é o uso de colhedoras automotrizes ou acopladas ao trator que fazem a derriça, porém, seu uso nas áreas estudadas é restrito devido à topografia. A derriça é feita diretamente sobre o solo ou sobre uma lona de material plástico conhecida como “pano de café”.

**Ajuntamento e abanação:** após a derriça, o café é ajuntado em montes e procede-se a abanação, que é a retirada com uso de peneiras ou máquinas de materiais indesejáveis mais grosseiros como folhas, tocos e pedaços de ramos. Após a abanação, os cafés são armazenados em sacos plásticos.

**Medição:** como o pagamento aos trabalhadores é feito por produtividade, na maioria das propriedades procede-se à medição da quantidade de litros colhidas para posterior pagamento ao trabalhador. A medição é feita em vasilhames com capacidade para 50 a 60 litros.

**Transporte:** o transporte até a estrutura de beneficiamento é feito de forma granelizada em carretas puxadas por trator, caminhões, camionetes ou carroças.



**FIGURA 1** Fluxograma de colheita

### 3.3.2 Fluxograma de produção de cafés pela via seca

O preparo do café pela via seca é caracterizado pelo uso mínimo ou nulo da água no processo. É a via de processamento mais comum, sendo encontrada em todas as regiões produtoras. O café mistura (frutos verdes, cerejas e bóia) pode ser processado seguindo o seguinte roteiro (Figura 2):

**desembarque:** o café pode ser desembarcado diretamente no terreiro ou em moegas. Nos cafés desembarcados diretamente no terreiro, o processo se resume ao espalhamento no terreiro e a secagem até determinado percentual de umidade. Nos cafés desembarcados em moegas ocorre o direcionamento ao lavador separador.

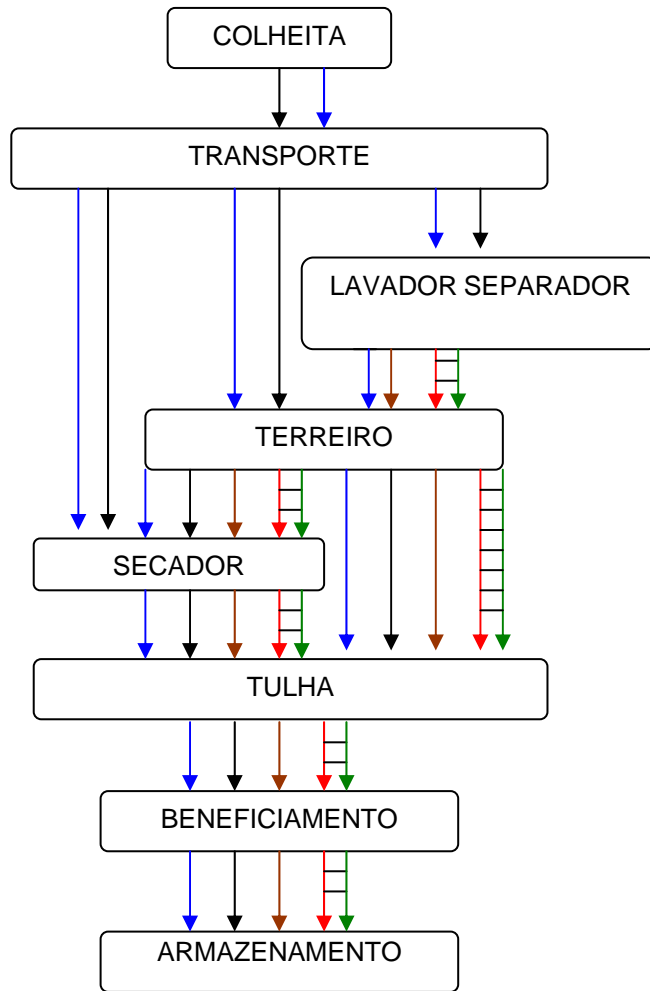
**lavagem e separação:** são feitas por um equipamento que possui bica com fundo falso, por onde circula uma mistura de frutos com água. Os grãos de maior densidade, como os verdes e cerejas, afundam, sendo encaminhados à outra bica. Os frutos tipo bóia não afundam continuando na mesma bica. No fim do equipamento existem duas bicas, de onde sai o café bóia separado da mistura cereja e verde;

**secagem:** após a separação, os frutos são espalhados no terreiro para iniciar o processo de secagem com aproveitamento da luz solar. O processo de secagem pode ser completo no terreiro, até 11% a 12% de umidade ou parcial, sendo completada a secagem em secadores. A secagem também pode ser feita totalmente em secadores, utilizando-se um pré-secador horizontal e outro secador vertical;

**armazenagem em tulhas:** após a secagem, o café é encaminhado a tulhas, onde passa por um período de “descanso”. As tulhas são estruturas de madeira ou de alvenaria revestidas com madeira;

**Beneficiamento:** na fase de beneficiamento, o café é separado da casca, que, neste caso, pode ser o fruto seco completo, no caso dos cafés obtidos pela via seca, ou do pergaminho, no caso dos cafés obtidos pela via úmida. Após a separação da casca, o café é, então, passado por um conjunto de peneiras que faz a separação dos grãos quebrados e das impurezas. Em máquinas de beneficiamento completas, o café é separado de acordo com o tamanho (classificação por peneiras) e o formato (grãos chatos e moca);

**Armazenagem:** após o beneficiamento, o café é armazenado em sacos de juta de 60kg e transportado até os armazéns, onde os sacos são depositados em pilhas.



Legenda  
 ◆ Natural      ◆ Varrição      ◆ Bóia      ◆ Verde      ◆ Cereja

**FIGURA 2** Fluxograma de produção de cafés pela via seca



### 3.3.3 Fluxograma de produção de cafés pela via úmida

O processamento de cafés pela via úmida é caracterizado pelo uso mais intensivo da água. Os cafés obtidos pelo descascamento do fruto cereja normalmente originam bebidas de sabor suave, sendo classificadas como apenas mole, mole ou estritamente mole. O processamento pela via úmida passa pelas seguintes etapas (Figura 3):

**lavagem e separação:** idem via seca;

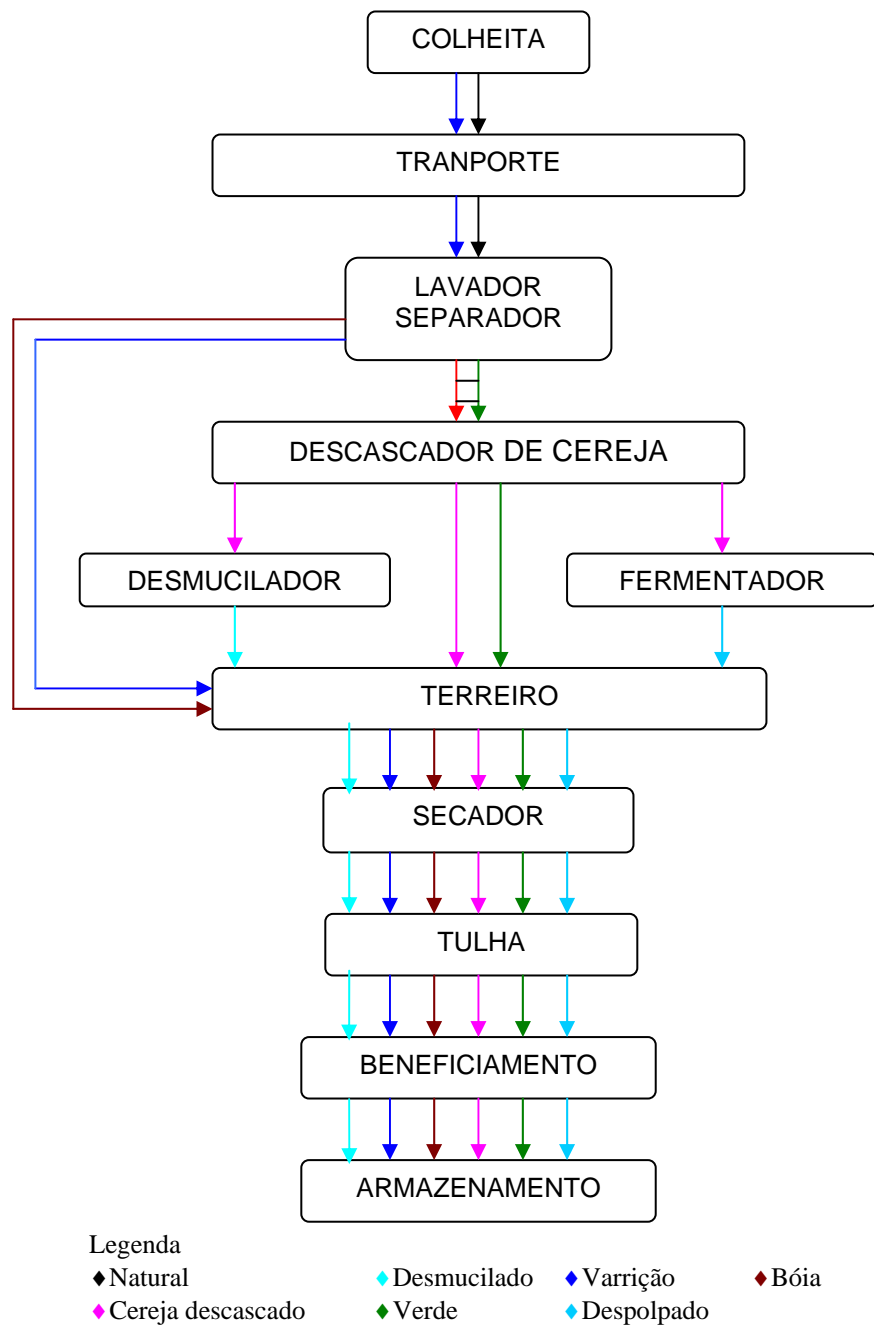
**descascamento:** os frutos verdes e cerejas separados no passo anterior são encaminhados até o descascador de cerejas, onde o café é pressionado em uma peneira, na presença de água, sendo a casca retirada. Os frutos verdes, devido à aderência maior da casca, não são descascados no processo, mas, somente separados. Os produtos finais do descascamento são os grãos cereja descascados e os frutos verdes, tendo como resíduo as cascas. O fruto cereja descascado pode ser seco diretamente no terreiro ou passar pelos processos de desmucilagem ou despulpamento;

**desmucilagem:** os frutos cerejas descascados do processo anterior são encaminhados até um equipamento que, por atrito, na presença de água, retira a mucilagem residual presente no grão. Este grão passa a ser denominado de café demucilado e segue, então, para o processo de secagem;

**despulpamento:** constitui-se de uma outra forma de remoção da mucilagem por fermentação. Os grãos do processo anterior são encaminhados até tanques, onde ficam por um período de, aproximadamente, 18 horas e, por ação de bactérias e leveduras, a mucilagem é removida. Após o processo, os grãos são lavados e seguem para a secagem. Este processo é pouco utilizado, devido à grande

quantidade de água utilizada, ao custo das benfeitorias para a sua execução e, mais recentemente, aos problemas relacionados às águas residuais do processo, um importante poluente ambiental;

**secagem:** o processo de secagem dos cafés da via úmida são semelhantes ao da via seca, variando o tempo de secagem devido à eliminação da casca, que contém grande quantidade de água.



**FIGURA 3** Fluxograma de produção de cafés pela via úmida

### **3.4 Validação do fluxograma de produção**

Após a elaboração dos fluxogramas, os mesmos foram validados. Todas as etapas descritas nos fluxogramas foram confirmadas no campo por meio do acompanhamento do “caminho” do fruto. Na prática, foram acompanhados a colheita, o transporte, o pré-processamento, a secagem e o beneficiamento do grãos, confirmando que o produto realmente passa por todas estas fases, sendo mais ou menos manipulado, dependendo da estrutura de processamento.

### **3.5 Aplicação dos princípios - estudo do plano HACCP**

#### **3.5.1 Condução da análise de perigos**

##### **3.5.1.1 Perigos físicos**

Não foi constatado nenhum perigo físico nas fases do processamento estudadas.

##### **3.5.1.2 Perigos químicos**

###### **Contaminação por ocratoxina A (OTA)**

OTA já foi detectada em vários tipos de café obtidos nos mais diferentes tipos de processamento (Taniwaki et al., 2003; Martins et al., 2003; Bucheli & Taniwaki, 2002). Devido ao seu efeito negativo sobre a segurança do produto, a presença de OTA constitui-se no principal perigo químico presente nas fases do processamento estudadas.

##### **3.5.1.3 Perigos biológicos**

###### **Presença de fungos potencialmente produtores de OTA.**

A presença de fungos potencialmente produtores de OTA foi detectada em todas as fases do processamento, como destacado no capítulo 2 deste trabalho. Apesar da pouca relação entre colonização por *Aspergillus ochraceus* e a contaminação por OTA em grãos de café, a presença do fungo, até onde se

sabe, é fator determinante na contaminação. Além disso, em condições experimentais, foi verificada a correlação positiva entre a colonização por *Aspergillus ochraceus* e a contaminação pela OTA em cevada (Saxena et al., 2001). A presença de fungos potencialmente ocratoxigênicos é o principal perigo microbiológico à segurança do produto.

### **3.5.2 Determinação dos pontos críticos de controle - PCCs**

Foram selecionados para análise, na chave decisória de pontos críticos de controle os tipos de café obtidos nas seguintes etapas do processo:

1. cafés com permanência prolongada em contato com o solo – “Varrição”
2. cafés permanência na planta após o ponto ideal de colheita - “Seco no pé”

#### **Análise**

#### **Ponto crítico 1: Cafés com permanência prolongada em contato com o solo – “Varrição”**

Pergunta 1 - Existe uma medida de controle?

Resposta: SIM

Justificativa: Na fase de varrição, quando os cafés que estão em contato com o solo são recolhidos, é possível processar este tipo de café em separado.

Pergunta 2: Neste passo pode-se eliminar ou reduzir o risco?

Resposta: SIM - A fase é um ponto crítico de controle.

Justificativa: Pode-se reduzir muito o risco de contaminação devido a fortes evidências científicas de que o café de varrição pode conter níveis elevados de OTA.

Após a determinação dos cafés de varrição como potencialmente perigosos à segurança do produto foram construídos fluxogramas indicando em que ponto do processo estes tipos de café poderiam contaminar o produto final. A contaminação ocorre basicamente quando, devido a falhas no processo, ocorre mistura entre este produto com outro considerados seguros. Para facilitar o

entendimento os cafés considerados seguros serão chamados de cafés Potencialmente seguros - PS.

**Cafés de varrição – vias prováveis de contaminação com cafés potencialmente seguros – PS.**

**Derriça**

Nos cafés de varrição, a mistura pode ocorrer na colheita, quando o processo de limpeza da área onde o café vai ser derriçado não é executado de forma adequada, ficando restos de varrição no solo. No caso de derriça no chão, este risco é aumentado consideravelmente devido à inexistência de qualquer barreira entre o solo e o café PS derriçado.

**Ajuntamento e abanação**

Na fase de ajuntamento e abanação, a mistura de café de varrição com o PS pode ocorrer. Porém, nesta fase, as possibilidades de controle do processo são maiores, sendo a mistura ocasionada por ação muitas vezes proposital.

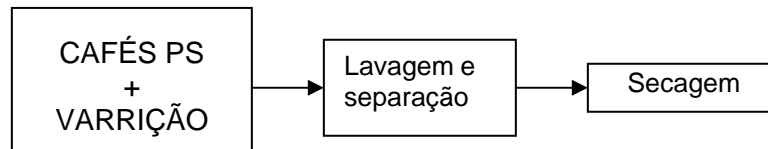
**Transporte**

A mistura de café de varrição e PS pode ocorrer no transporte, mas semelhante ao que pode ocorrer na abanação, este processo pode ser facilmente controlado.

**Lavagem e separação**

O processo de lavagem e separação é um dos principais pontos nos quais a mistura dos cafés de varrição e PS pode ocorrer. Falhas na hora da descarga do produto na moega podem ocasionar perda irreversível da segurança do produto. Após a descarga na moega, a mistura pode ocorrer ainda pela não interrupção do processo de lavagem e separação do café PS e varrição.

A figura 4 aponta falhas no processo que podem levar a contaminação de cafés potencialmente seguros com varrição



**FIGURA 4** Seqüência insegura de transporte, lavagem e separação.

#### **Medidas de minimização de riscos**

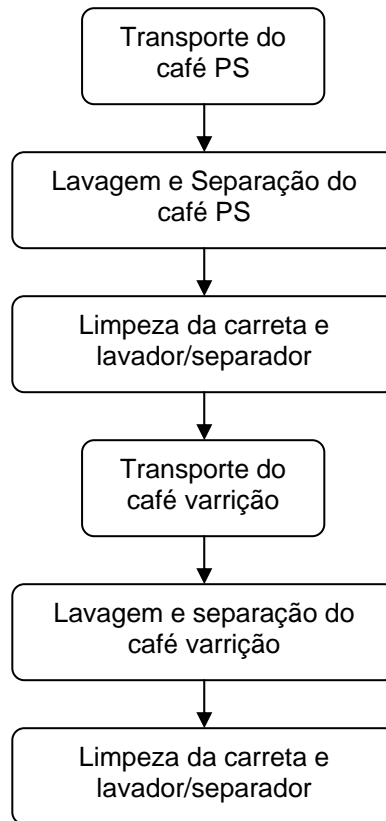
De acordo com o observado no campo, foram propostas medidas que minimizem ou impeçam a contaminação dos cafés PS com os de varrição.

#### **Colheita**

- retirar todo o café de varrição, abanar e ensacar;
- derriçar exclusivamente sobre o pano.

#### **Transporte, lavagem e separação**

A seqüência lógica que impede a contaminação está representada na figura 5.



**FIGURA 5** Sequência segura de transporte, lavagem e separação dos cafés.



## **Ponto crítico 2: Cafés permanência na planta - “seco no pé”**

Pergunta 1: Existe uma medida de controle?

Resposta: SIM

Justificativa: Pode-se evitar a presença de cafés que passaram da fase de cereja na planta, iniciando-se a colheita no ponto ideal ou separando-se este tipo de café no lavador/separador

Pergunta 2: Neste passo, pode-se eliminar ou reduzir o risco?

Resposta: SIM - A fase é um ponto crítico de controle

Justificativa: Como verificado no capítulo 4 deste trabalho, os cafés que passam por um período prolongado de exposição ao ambiente após o seu ponto ideal de colheita, podem aumentar o risco à segurança do produto.

## **Cafés com permanência prolongada na planta após o ponto ideal de colheita – Vias prováveis de contaminação com cafés potencialmente seguros – PS.**

### **Derriça**

A derriça do café fora do ponto ideal de colheita é a principal causa de contaminação dos cafés PS com os cafés com permanência prolongada na planta.

### **Medidas de minimização de riscos**

#### **Colheita**

**Ponto ideal:** coletar os frutos quando estes apresentarem um percentual de cereja de 70%. Para a determinação do percentual de cafés cereja, verde e bóia, devem ser coletados nos talhões a serem colhidos, amostras de café em 10 pontos no talhão sendo cada ponto considerado uma planta. Os frutos devem ser coletados na parte superior dos quatro lados da planta e, na parte inferior, também dos quatro lados. A amostra deve então ser homogeneizada para a retirada de uma subamostra de dois litros de café, na qual os frutos serão

separados em tipo verde, cereja e b6ia. Os frutos podem ser contados ou depositados em camadas em um vasilhame transparente, na qual se possa medir a quantidade de cada fra7ao na amostra.

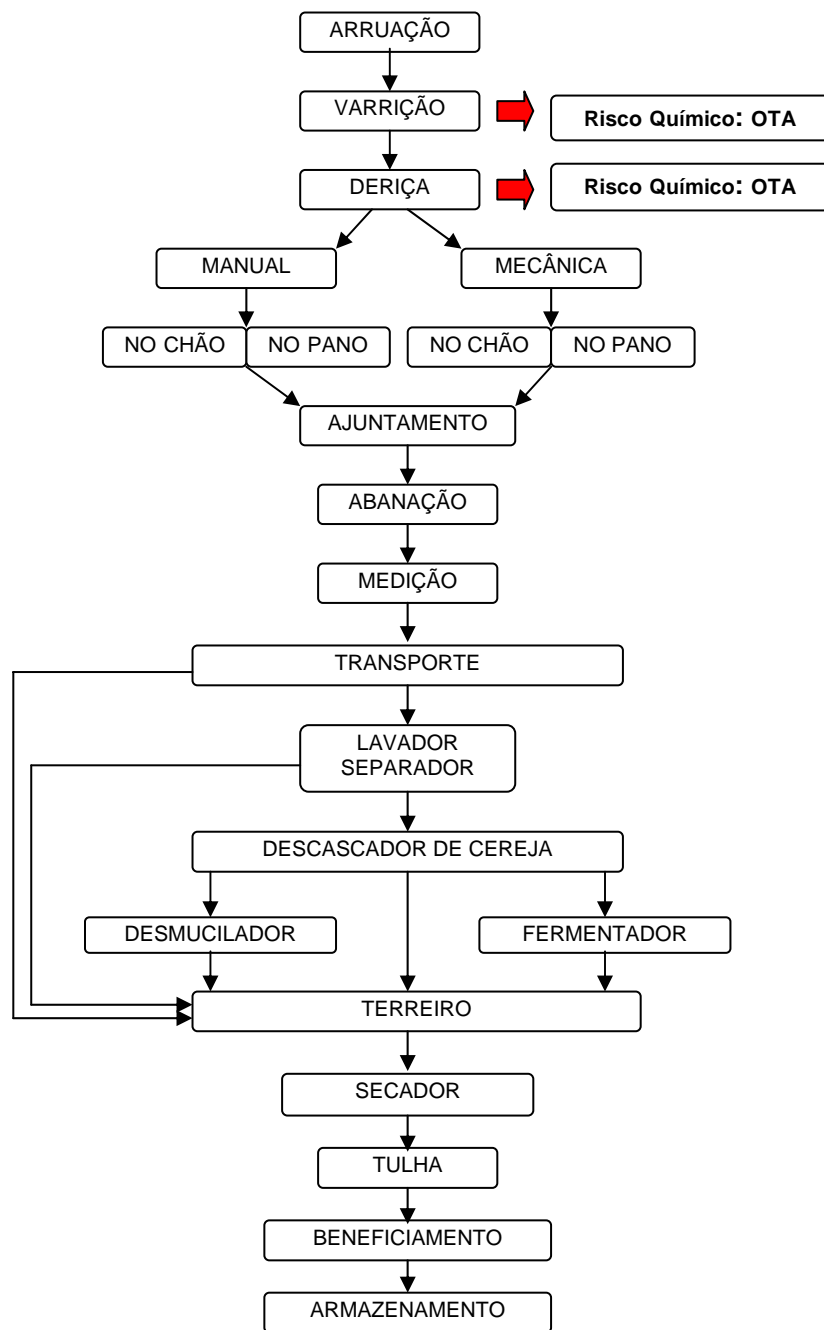
**Eficiência:** o aumento da eficiência da colheita pode ser feito com o aumento da mão de obra ou com o uso de máquinas para reduzir ao máximo o tempo de permanência do fruto aderido à planta ap6s o ponto ideal de colheita.

**Escalonamento:** o número de cultivares de café, com boas características agron6micas, disponíveis atualmente, é grande. Muitas destas cultivares apresentam pontos de maturacao diferentes, o que permite seu uso no escalonamento de colheita por meio da combinaao de variedades precoces e tardias.

#### **Lavagem e separacao**

A fase de lavagem e separacao é essencial na separacao da fra7ao conhecida como b6ia, que nada mais é do que cafés que permaneceram aderidos à planta ap6s o ponto ideal de colheita. Assim, o lavador/separador deverá ser regulado para separar, o máximo possível, a fra7ao b6ia da cereja e verde.

Fluxograma de produ7ao de café com indicaao dos pontos onde possa ocorrer risco a seguran7a do produto. (Figura 6)



**FIGURA 6** Fluxograma de produção de cafés com ênfase nos riscos.

### **3.5.3 Estabelecimento dos limites críticos**

#### **3.5.3.1 Limite crítico do perigo químico OTA**

O principal limite crítico é imposto pela Emenda de Regulação n° 123/2005, de 26 de janeiro de 2005, que trata de ocratoxina A e estabelece o nível máximo de OTA para café torrado e café torrado e moído em 5µg/kg. O valor para café beneficiado (*green coffee*) ainda está em estudo, com prazo de definição para 30 de junho de 2006 (UE, 2005).

#### **3.5.3.2 Limite crítico para o perigo microbiológico de fungos potencialmente ocratoxigênicos**

Devido à complexidade e à pouca praticidade deste tipo de análise, não existem limites críticos definidos.

### **3.5.4 Estabelecimento de um sistema de monitoramento.**

O sistema de monitoramento proposto foi baseado em medidas que possam certificar por meio de registros a segurança do produto. Os cafés serão divididos em lotes, sendo considerado um lote, cafés com características semelhantes em qualidade e idade. Será adotado um padrão de nomenclatura dos lotes, conforme a seguir:

L-11.07.05-VR

em que: Os números correspondem à data de coleta (dd.mm.aa) e as letras ao tipo de café neste caso varrição.

#### **3.5.4.1 Monitoramento do destino dos cafés de varrição:**

O sistema de monitoramento a ser adotado será baseado nos registros diário da quantidade de café de varrição recolhida e a quantidade de café de varrição beneficiada. Tendo como base uma relação básica de 400 litros de café de varrição para cada saco de café de 60kg, será possível de monitorar se está

havendo desvio deste tipo de café em algum ponto do processo. Além disso, serão coletadas amostras para análise de OTA de todo o café de varrição, sendo os mesmos liberados para a comercialização se os níveis de contaminação forem inferiores a 5µg/kg de produto. A análise pode ser dispensada se o café tiver destino não alimentício.

#### **3.5.4.2 Monitoramento do destino dos cafés com permanência prolongada na planta:**

O sistema de monitoramento a ser adotado será baseado nos registros diário da quantidade de café do tipo bóia recolhida e a quantidade de café de tipo bóia beneficiada. Tendo como base uma relação básica de 400 litros de café de bóia para cada saco de café de 60kg será possível monitorar se está havendo desvio deste tipo de café em algum ponto do processo. Além disso serão coletadas amostras, para análise de OTA de todo o café de bóia sendo os mesmos liberados a comercialização se os níveis de contaminação forem inferiores a 5µg/kg de produto. A análise pode ser dispensada se o café tiver destino não alimentício.

Os cafés do tipo bóia representam a fração de café que permaneceu na planta após o ponto ideal de colheita e, portanto, perdeu umidade, sendo separado no lavador/separador.

Como medida complementar de monitoramento, será feita amostragem nos talhões a serem colhidos, de modo a determinar o ponto ideal de colheita, ou seja, 70% de frutos no estágio cereja.

#### **3.5.4.3 Monitoramento da umidade dos grãos**

A umidade dos grãos será monitorada:

- após 5 dias de secagem no terreiro (Variável de acordo com o tipo de terreiro e região);

- antes da entrada e após a retirada do secador;
- antes e após o beneficiamento.

#### **3.5.4.4 Monitoramento da contaminação por OTA dos demais tipos de café.**

Toda vez que se verificar falhas no processo por meio dos monitoramentos anteriormente descritos, serão coletadas amostras para análise de OTA de todos os tipos de café, sendo os mesmos liberados para comercialização se os níveis de contaminação forem inferiores a 5µg/kg de produto (UE, 2005). A análise pode ser dispensada se o café tiver destino não alimentício.

#### **3.5.5 Estabelecimento de ações corretivas, quando for detectado que determinado parâmetro está fora do controle**

Quando for detectada qualquer falha por meio do processo de monitoramento os lotes envolvidos no processo de monitoramento naquele momento serão descartados ou destinados para fins não alimentícios. A equipe de implementação deve realizar revisão do plano HACCP, para evitar que a falha ocorra novamente.

#### **3.5.6 Estabelecer procedimentos para verificar se o sistema HACCP está funcionando**

Será feita auditoria externa para verificar se o plano HACCP está realmente implementado. Como medida de monitoramento adicional, será realizado teste microbiológico para a detecção de fungos potencialmente ocratoxigênicos, anualmente, em todos os tipos de cafés produzidos.

### **3.5.7 Procedimentos de documentação e registro dos dados do sistema**

O monitoramento será realizado com a utilização de planilhas de campo e planilhas de escritório. Nas planilhas de campo serão adotados todos os procedimentos referentes ao monitoramento. Nas planilhas de escritório os dados do monitoramento de campo serão consolidados e preparados para atender às demandas das comissões de auditoria.

## 4 DISCUSSÃO

A implementação do plano HACCP, na fase de campo da cadeia produtiva do café, pode parecer complexa no primeiro momento. Porém, foi observado, em algumas propriedades, que, à medida que ocorre aumento no nível tecnológico, principalmente buscando-se diferenciais de qualidade, muitas medidas estreitamente relacionadas ao plano HACCP começam a ser instintivamente implementadas. O maior entrave à adoção de um plano de controle de qualidade estruturado é, justamente, a falta de conhecimento científico e metodológico para a sua implementação. A produção integrada e sustentável de café, que pode garantir diferencial em qualidade ao produto, prevê a implementação do plano HACCP (van Raij, 2005). A *International Organization for Biological and integrated control of noxious animal and plants* - IOBC é uma das principais organizações que fornecem subsídios para o desenvolvimento de planos de produção integrada. De acordo com suas normas, a plausibilidade e a integralidade dos registros são fundamentais na implementação de um plano adequado. As anotações de campo são ferramentas fundamentais, pois, elas registram dados e acontecimentos que não podem ser visualizados nas auditorias. Outra questão que influencia diretamente na possibilidade de implantação do plano HACCP é a qualificação da mão-de-obra que, muitas vezes, não está preparada para a implementação. A qualificação dos trabalhadores envolvidos no processo também é fundamental, gerando, dentro da propriedade, uma consciência da importância da obtenção de produtos seguros.

Este capítulo não tem a pretensão de ser a base para a implementação do sistema HACCP na produção de café, mas sim de fornecer alguns subsídios para posteriores programas de melhoria da qualidade.



## **5 CONCLUSÕES**

1. A implementação do plano HACCP na cadeia produtiva do café é possível, levando-se em consideração as fases de pré e pós colheita.
2. A qualificação da mão-de-obra e a adequação das estruturas são fundamentais na implementação do plano.
3. A metodologia para implantação do plano HACCP no café ainda não está bem definida.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BUCHELI, P.; TANIWAKI, M.H. Research on the origin, and on the impact of post-harvest handling and manufacturing on the presence of ochratoxin A in coffee. **Food Additives and Contaminants**, v.19, n.7, p.655-665, July 2002.

CODEX. HACCP System and guidelines for its Application. Committee on food hygiene, Annexe to CAC/RCP 1-1969, Rev 3 in Codex Alimentarius Commission Food Hygiene Basic Texts. Rome, FAO, WHO.

CORLETT, D.A. **HACCP user's manual**. Aspen: Gaithersburg. 1998. 134p.

MARTINS, M.L.; MARTINS, H.M.; GIMENO, A. Incidence of microflora and of ochratoxin A in green coffee beans (*Coffea arabica*). **Food Additives and Contaminants**, v.20, n.12, p.1127-1131, dez. 2003.

MORTIMORE, S.; WALLACE, C. **Food industry briefing series: HACCP**. London: Blackwell Science, 2001. 136p.

MORTIMORE, S.; WALLACE, C. **HACCP: enfoque práctico**. Acribia: Saragoza. 1996. 85p.

UE, OFFICIAL JOURNAL OF THE EUROPEAN UNION. Commission Regulation No 123/2005 of January 2005 amending Regulation (EC) No 466/2001 as regard ochratoxin A.

SAXENA, J.; MUNIMBAZI, C.; BULLERMAN, L.B. Relationship of mould count, ergosterol and ochratoxin A production. **International Journal of Food Microbiology**, v.71, p.29-34, 2001.

SEBRAE. Serviço brasileiro de apoio às micro e pequena empresas **Guia para elaboração do plano APPCC: frutas hortaliças e derivados**. Brasília, 2000a. 141p. (Serie Qualidade e Segurança Alimentar).

SEBRAE. Serviço brasileiro de apoio às micro e pequena empresas **Elementos de apoio para o sistema APPCC**. Brasília, 2000b. 361p. (Serie Qualidade e Segurança Alimentar).

TANIWAKI, M.H. et al. The source of ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to processing methods. **International Journal of Food Microbiology**, v.82, n.2, p.173-179, Apr. 2003.

VAN RAIJ, B. Produção integrada de café. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 4., 2005, Londrina. **Palestra...** Londrina, PR, 2005.