



**INCIDÊNCIA DE FUNGOS PRODUTORES DE
OCRATOXINA A EM GRÃOS DE CAFÉ
(*Coffea arabica* L.) PRÉ-PROCESSADOS POR
VIA SECA E ÚMIDA**

LUÍS ROBERTO BATISTA

2005

LUÍS ROBERTO BATISTA

**INCIDÊNCIA DE FUNGOS PRODUTORES DE OCRATOXINA A EM
GRÃOS DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.) PRÉ-PROCESSADOS POR VIA
SECA E ÚMIDA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação "Strictu Sensu" em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de "Doutor".

Orientadora

Dra Sara Maria Chalfoun de Souza

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2005

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

Batista, Luís Roberto

Incidência de fungos produtores de ocratoxina A em grãos de café (*Coffea arabica* L.) pré-processados por via seca e úmida / Luís Roberto Batista.--

Lavras : UFLA, 2005.

218 p. : il.

Orientadora: Sara Maria Chalfoun.

Tese (Doutorado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Café. 2. Aspergillus. 3. Ocratoxina. 4. Processamento. 5. Qualidade. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-633.7394
-663.93

LUÍS ROBERTO BATISTA

**INCIDÊNCIA DE FUNGOS PRODUTORES DE OCRATOXINA A EM
GRÃOS DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.) PRÉ-PROCESSADOS POR VIA
SECA E ÚMIDA**

Tese apresentada à Universidade Federal de
Lavras, como parte das exigências do Programa
de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos,
para a obtenção do título de "Doutor".

APROVADA em 03 de março de 2005

Dr. Maurício Sergio Zacarias

EMBRAPA/CAFÉ

Dr Paulo César Afonso Júnior


EMBRAPA/CAFÉ

Prof. Dr. Carlos José Pimenta

UFLA

Profa Dra Rosane Freitas Schwan

UFLA


Dra Sara Maria Chalfoun de Souza
EPAMIG
(Orientadora)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

Lembrando o Reverendo Martin Luther King,

“Um dia, eu tive um sonho...”

**AOS MEUS PAIS: OVÍDIO E EUNICE
AOS MEUS IRMÃOS (POR ORDEM DE CHEGADA)**

**CRISTINA
ANA LUCIA
SILVANA
EDSON
ROSIANE
NÚBLA
JUNIOR**

**À MINHA FAMÍLIA
AOS MEUS AMIGOS E AMIGOS
A MINHA ESPOSA CRISTINA E A MEUS FILHOS ANDRÉ LUÍS E
EMMANUEL**

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS pela saúde, pela oportunidade, pela força e por ter posicionado em meu caminho as amigadas que contribuíram para a realização deste trabalho.

Agradeço aos meus pais, Ovídio e Eunice, pelo apoio, pela confiança e pelo sacrifício que fizeram e estão fazendo para que eu consiga alcançar mais esta etapa.

A minha esposa Cristina pela imensa ajuda, pelo carinho e pela paciência nos momentos de minha ausência, beijos..

Aos meus filhos André Luís e Emmanuel por tornar os meus dias mais felizes

Aos meus irmãos, Cristina, Ana, Silvana, Edson, Rosiane, Núbia e Júnior, pelo incentivo, apoio familiar e financeiro. Muito obrigado.

À Dra Sara Maria Chalfoun pela incansável orientação, pelos esclarecimentos, pela confiança, pela amizade, pelos incentivos e por ser um exemplo de profissional.

À Profa Eliana Pinheiro de Carvalho pelo apoio, incentivo e confiança, desde a minha chegada em Lavras.

Um “Muito obrigado especial” a Caroline e a Vicentina pela dedicação, apoio no isolamento e identificação dos fungos e pela amizade consolidada durante o período de execução deste trabalho, auxiliando não só em meu crescimento profissional, mas também pessoal.

Aos funcionários, professores e pesquisadores da UFLA e da EPAMIG, que tiveram uma participação direta na realização deste trabalho, entre eles:

Prof Luís Carlos, do Laboratório de Fisiologia Pós-Colheita de Produtos e Vegetais do DCA, por sempre permitir o uso de equipamentos e reagentes do laboratório;

Ao Marcelo Cláudio pela amizade e por sempre estar apoiando na comprar os materiais e aquisição das diárias para as viagens.

Aos funcionários da EPAMIG que fizeram as coletas das amostras nos locais mais distantes: Gilmar, Darlan e Daniel, (apoio essencial);

A todos os proprietários e funcionários das fazendas que permitiram a coletas das amostras e por terem respondido de forma espontânea os questionários.

Aos amigos que acreditaram em mim e que estão sempre me apoiando.

A Mari, à mãe da Mari (Débora), por ter me iniciado na Microbiologia, à Tia Kelly, ao Rafael e a Margarita.

À Universidade Federal de Lavras e aos Departamentos de Ciência dos Alimentos, Biologia e de Fitopatologia permitindo o uso de reagentes e equipamentos;

Ao Prof Dr Ludwig, ao Ricardo, ao Anderson e ao Edinho, do Departamento de Fitopatologia, pelo constante apoio;

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Ciência dos Alimentos pela oportunidade de realizar o curso.

A Eugênia Azevedo Varga e a Eliene Santos do LACQSA-BH por ter apoiado a idéia da realização deste estudo e por ter participado ativamente;

À EPAMIG (Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais) e à LACQSA-BH por ter a cedido infraestrutura e reagentes para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café (CBP&D-Café) por ter financiado o projeto.

Ao CNPq pelo apoio financeiro cedido através da Bolsa de Estudo durante o curso.

Espero poder retribuir a todos aqui citados a felicidade da conclusão do curso de Doutorado, que um dia foi um sonho distante.

Obrigado a todos.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
CAPÍTULO 1 Fungos Toxigênicos e Ocratoxina A em Grãos de Café.	1
1 Introdução.....	2
2 Referencial teórico.....	4
2.1 Produção de café no mundo, no Brasil e em Minas Gerais.....	4
2.2 Fatores Agroclimáticos e geográficos sobre a produção de café...	7
2.2.1 Altitude	7
2.2.2 Zoneamento Agroclimático da Cafeicultura Mineira.....	8
2.3 Pré-Processamento e Preparo do Café.....	12
2.3.1 Pré-Processamento Via Seca.....	13
2.3.2 Pré-Processamento Via Úmida.....	15
3 Fungos Associados a Frutos e Grãos de Café.....	16
4 Fungos Toxigênicos Produtores de ocratoxina A.....	23
4.1 <i>Aspergillus ochraceus</i> e espécies do Gênero <i>Aspergillus</i> /Seção <i>Circumdati</i>	25
4.2 <i>Aspergillus carbonarius</i> e espécies do Gênero <i>Aspergillus</i> /Seção <i>Nigri</i>	31
4.3 Espécies dos Gêneros <i>Penicillium</i> , <i>Neopetromyces</i> e <i>Petromyces</i> ..	36
5 Biossíntese de Ocratoxina A.....	37
6 Toxicologia da Ocratoxina A.....	41
7 O Café como Fonte de Ocratoxina A para a Saúde Humana.....	44
8 Efeito do Processamento do Café sobre a Presença de Ocratoxina A	46
8.1 Beneficiamento.....	48
8.2 Torração.....	49
9. Níveis de ocratoxina A em grãos de café e propostas de limites....	52
10 Referências bibliográficas.....	62
CAPÍTULO 2 Isolamento e Identificação de Fungos Toxigênicos em frutos e Grãos de Café.....	77
Resumo.....	78
Abstract.....	80
1 Introdução.....	82
2 Material e métodos.....	84
2.1 Caracterização e localização das áreas em estudo.....	84
2.2 Isolamento e Identificação de Fungos.....	85
2.2.1 Identificação de Fungos do Gênero <i>Aspergillus</i>	86
2.3 Determinação da Produção de Ocratoxina A por Fungos pelo Método de Plug Ágar.....	87
2.4 Análise de Ocratoxina A em Grãos de Café.....	88

3 Resultados e discussão.....	90
3.1 Espécies do Gênero <i>Aspergillus</i> Identificadas.....	95
3.2 Espécies dos Gêneros <i>Fusarium</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Cladosporium</i> e <i>Eurotium</i> identificadas.....	97
3.3 Avaliação do Potencial Toxigênico da Espécies do Gênero <i>Aspergillus</i>	104
3.4 Incidência de Fungos Toxigênicos – Gênero <i>Aspergillus</i> – Seção <i>Circumdati</i>	107
3.5 Incidência de Fungos Toxigênicos – Gênero <i>Aspergillus</i> – Seção <i>Nigri</i>	115
3.5 Incidência de Fungos Toxigênicos – Gênero <i>Fusarium</i> , <i>Penicillium</i> e <i>Cladosporium</i>	117
4 Conclusões.....	121
5 Referências bibliográficas.....	122
CAPÍTULO 3 Incidência de ocratoxina A em diferentes frações do Café.....	131
Resumo.....	132
Abstract.....	133
1 Introdução.....	134
2 Material e métodos.....	136
Caracterização e localização das áreas em estudo.....	136
2.2 Análise de Ocratoxina A em Grãos de Café.....	137
2.3 Análise Estatística.....	138
3 Resultados e discussão.....	140
3.1 Análise de Correspondência entre os Níveis de Contaminação de Ocratoxina A com as diferentes Frações de Grãos de Café.....	158
3.2 Riscos de Intoxicação ao Consumidor com Relação as Amostras Analisadas.....	165
3.3 Análise de Cluster para as Localidades.....	166
3.4 Cultivares.....	173
3.5 Adubação.....	174
3.6 Controle Fitossanitário.....	176
3.7 Separação Hidráulica.....	179
3.8 Pré-Processamento via seca e via úmida.....	180
3.9 Secagem.....	183
3.8.1 Análise das frações bóia, mistura e varrição versus tipos de terreiro em diferentes níveis de contaminação com ocratoxina A.....	185
3.10 Perfil das amostras contaminadas com ocratoxina A níveis acima de 5,0µg/Kg.....	190
4 Conclusões.....	192
5 Considerações Gerais.....	193
6 Referências Bibliográficas.....	197

ANEXOS.....	204
GLOSSÁRIO.....	216

RESUMO

BATISTA, Luís Roberto **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.

A ocorrência de ocratoxina A foi estudada em grãos de café em diferentes frações e após o processamento via seca e via úmida. Foram analisadas 289 amostras coletadas em 11 municípios do sul de Minas Gerais. As frações coletadas foram bóia (35), fruto cereja (4), cereja+verde (11), cereja descascado (18), cereja despulpado (2), mistura (97), frutos seco na planta (4), varrição (106) e verde (12). Das 289 amostras analisadas, em 128 ou seja, 44,29%, não foi detectada a presença de ocratoxina A, em 89 amostras, 30,80%, foi detectada a presença de ocratoxina A em níveis que variaram de 0,1 a 5,0 µg/Kg de café. Estes resultados demonstram que 75,09% das amostras analisadas estavam dentro dos limites em estudo da Legislação Européia que regulamenta a concentração máxima de ocratoxina A em grãos de café. As demais amostras, 24,91%, apresentaram contaminação acima de 5µg/kg. A principal espécie produtora de ocratoxina A identificada foi o *A. ochraceus*, sendo identificadas também outras espécies do gênero *Aspergillus* Seção *Circumdati* produtoras de ocratoxina A. O presente estudo estabeleceu com base nas 48 propriedades analisadas, que a execução de um Programa de Boas Práticas de Cultivo, expressa por itens capazes de influenciar a produtividade e qualidade do café, tais como adubação e controle fitossanitário, apresentou valores positivos nas propriedades estudadas. As frações de café bóia apresentaram maior risco de contaminação em propriedades localizadas em altitude mais elevada, enquanto as amostras de varrição apresentaram risco de contaminação maior em localidades próximas à Represa de Furnas. As práticas de descascamento e/ou despulpamento mostraram-se eficientes na redução de contaminação com ocratoxina A. As frações bóia e mistura apresentaram níveis mais elevados de contaminação com ocratoxina A quando foram secas em terreiro de terra do que em terreiro de asfalto. Entre as frações analisadas a varrição foi a que apresentou maiores níveis de ocratoxina A. Esta fração deverá ser reduzida através do conjunto de Boas Práticas de Cultivo e Colheita, e no caso de sua ocorrência, ser manejada separadamente das demais parcelas de café e não ser utilizada para fins de alimentação humana e animal.

Comitê orientador: Dr^a Sara Maria Chalfoun – EPAMIG (Orientador)

ABSTRACT

BATISTA, Luís Roberto Fungi Ochratoxin A Producing in Coffee Beans (*Coffea arabic* L.) Dried and Wet Processing Method. 2005. 218 p. Thesis (Doctor degree in Food Science) – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.

Ochratoxin A occurrence was studied in coffee beans, in different fractions and after processing by dry and wet methods. Were analyzed 289 samples from 11 locations of the south of Minas Gerais State. Coffee fractions collected were “overripe dried on tree”(lighter, also called “boia”,) (35), cherry fruit (4), cherry + green (11), cherry husked (18), cherry without pulp (also called imparchment) (2) and mixes of (97), dried fruit, (4) varrição (coffee beans swept from ground) (106) and green (12). In 128 (44,29%) from 289 samples, no ochratoxin A were detected, but in 89 samples, 30,80%, ochratoxin A presence were detected in levels from 0,1 to 5,0 µg/kg of coffee. These show that 75,09% coffee samples, are in European legislation limits, that rules ochratoxina A maximum concentration occurrence in coffee beans. In other samples, 24,91%, presented contamination levels above 5µg/kg. The main ochratoxin, A specie producer identified, was the *Aspergillus ochraceus*, and other *Aspergillus* species was also identified from the same genus Section *Circumdati* ochratoxin A producers. Based on 48 properties this study established that Good Cultivation Practices Program execution expresses items capable to influence yield and coffee quality, such as fertilization, fitossanitary control presenting positive values in the studied properties. Bóia coffee fractions presented larger contamination risk in properties located at higher altitude, while the varrição samples presented larger contamination risk in places near to Furnas Lake. Deshusking and/or despulping practices have shown efficient in contamination reduction. The bóia fractions and its mixtures presented higher ochratoxin A contamination levels when dried in earth yard as compared to yard asphalt. Among ochratoxin A varrição fraction levels, varrição techniques presented greater ochratoxin A level. This fraction should be reduced by Cultivation Practices Program execution, and its occurrence be managed at part from other coffee fractions and not to be utilized for human and animal feeding.

Guidance Committee: Ds Sara Maria Chalfoun - EPAMIG (Major Professor)

CAPÍTULO 1

FUNGOS TOXIGÊNICOS E OCRATOXINA A EM GRÃOS DE CAFÉ

1 INTRODUÇÃO

O café ainda constitui uma grande fonte geradora de receitas para o Brasil, apesar de ter diminuído sua participação nas exportações. Um dos fatores determinantes do declínio brasileiro no mercado foi a falta de padronização e de qualidade do produto nacional (Souza, 1996). Os cuidados nas fases de colheita e preparo do café complementam todas as atividades realizadas anteriormente no ciclo produtivo da cultura. A incidência de microrganismos nas fases pré e pós-colheita tem sido um dos principais fatores envolvidos na qualidade. Dentre os fungos naturalmente associados com os frutos e grãos de café estão as espécies de *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*, que são consideradas as principais responsáveis pela presença de micotoxinas em alimentos. As micotoxinas são metabólitos secundários de fungos filamentosos tóxicos ao homem e animais mesmo em pequenas concentrações.

De acordo com as características culturais, ambientais e químicas do café, a micotoxina de maior interesse é a ocratoxina A. As principais espécies produtoras de aflatoxinas, tais como *Aspergillus flavus* Link e *Aspergillus parasiticus* Speare, são fracos contaminantes dos frutos e grãos de café, estas espécies parecem preferir substratos ricos em lipídios, como amendoim, castanha do Brasil e semente de algodão. As espécies de *Fusarium* produtoras de fumonisina, zearalenona e deóxinivelanol parecem preferir substratos ricos em amido como milho, trigo e cevada. As espécies de *Fusarium* normalmente encontradas em café não são produtoras de tais toxinas.

A ocratoxina A é produzida por *Penicillium verrucosum* Dierckx e *Penicillium nordicum* Dragoni & Cantoni ex Ramírez, *Aspergillus carbonarius* (Bainier) Thom, *Aspergillus niger* Tiegh e *Aspergillus ochraceus* K. Wilh e outras espécies da Seção *Circumdati*, estes três grupos de espécies diferem entre si em seu nicho ecológico, nas commodities afetadas e na frequência de

ocorrência em diferentes regiões geográficas (Creppy, 2002). A síntese de ocratoxina A é afetada principalmente pelo tipo de substrato, pela umidade, pela temperatura e pela espécie do fungo (Rizzo et al., 2002)

Alguns países com a finalidade de proteger a saúde dos consumidores estão adotando limites máximos de micotoxinas por alimentos. Os limites de ocratoxina A em café estão em estudo na União Européia e devem entrar em vigor até junho de 2006. Diante dos vários parâmetros ecológicos envolvidos na biossíntese da ocratoxina A e dos tipos de cafés produzidos através de diferentes processamentos e localidades, este estudo teve como objetivo avaliar a incidência de ocratoxina A em grãos de café (*Coffea arabica* L.) em diferentes estádios de maturação e de processamento, os quais, foram chamadas de frações, em municípios localizados na região Sul do Estado de Minas Gerais. Foram avaliados também a incidência de fungos ocratoxigênicos, o perfil tecnológico das propriedades e uma possível influência do local sobre a contaminação fúngica e de ocratoxina A nos diferentes tipos de amostras analisadas. Sendo assim, no **Capítulo 1**, o referencial teórico da tese descreve uma revisão sobre a produção e o processamento do café, os fungos produtores de ocratoxina A, os limites de micotoxinas para alimentos e a proposta para o café. O **Capítulo 2** apresenta os resultados da contaminação fúngica e as espécies identificadas neste estudo, além dos níveis de contaminação de ocratoxina A nas mesmas amostras, após diagnosticada a presença dos fungos produtores de toxinas e os níveis de infestação. O **Capítulo 3** apresenta os níveis de contaminação nos diferentes tipos de frutos de café de acordo com o estágio de maturação e processamento desde a colheita até a secagem além dos níveis de contaminação de acordo com o local e os aspectos culturais e de secagem das amostras mais contaminadas, traçando, assim, um perfil das amostras que apresentam maior risco de contaminação de acordo com o local e o processamento.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Produção de café no mundo, no Brasil, e em Minas Gerais.

A importância do café na economia mundial data do início do século XIX. Desde então este esteve freqüentemente presente nas pautas das exportações e importações de diversos países.

Os países em desenvolvimento dominam a produção mundial de café. O Brasil é o maior produtor mundial com aproximadamente 33.600 milhões de sacas de 60 Kg de café beneficiado na safra de 2003/04; seguido pela Colômbia, que deve produzir cerca de 11.800 milhões de sacas; o Vietnã, com 10.750 milhões de sacas; a Indonésia, com 6.050 milhões de sacas; a Índia, com 4.660, o México, com 4.650; a Guatemala, com 3.802; e os países africanos Uganda e Etiópia, com 3.200 e 3250, respectivamente (Agrianual, 2004).

As exportações brasileiras devem ficar em aproximadamente 25.600 milhões de sacas; Colômbia e Vietnã produzem 10.480 e 10.166 milhões de sacas, respectivamente, e a Indonésia, 4.680 milhões de sacas de café (Agrianual, 2004).

A produção brasileira, assim como a produção mundial oscila entre anos de alta produção e anos de baixa produção. Na safra de 2002/03 a produção foi de aproximadamente 48.750 milhões de sacas de 60 Kg, sendo 36.960 milhões de sacas de café arábica e 11.780 milhões de sacas de café robusta. As previsões para as próximas safras são de 45.950 mil em 2004/05 e de 36.800 mil em 2005/06, valores que permitem ao Brasil a permanência no primeiro lugar de produção e exportação de café (Agrianual, 2004).

No café o processo de disseminação das inovações tem sido liderado pelo Brasil. São evidentes os ganhos de produtividade decorrentes do uso mais

intensivo de tecnologia, com destaque para a fertirrigação e a mecanização das lavouras (Agrianual, 2002).

A partir de 1960 a cafeicultura brasileira sofreu uma importante mudança, passando de uma atividade econômica pioneira e extrativista para um modelo tecnológico voltado principalmente para a produtividade. Este sistema de produção foi estimulado pelas novas variedades, mais produtivas e resistentes a pragas e doenças, pelo uso da adubação mineral e aberturas de créditos (Silva & Cortez, 1998).

No início do século XX o Brasil era responsável por 75% da produção mundial (Silva & Cortez, 1998). No entanto, este aumento de produção não foi acompanhado pelas pesquisas sobre qualidade do café, sacrificando, assim, a imagem do produto brasileiro. A complexidade do assunto, a falta de equipamentos analíticos e a distância entre os provadores e pesquisadores estão entre os fatores responsáveis pelo não acompanhamento da qualidade (Silva & Cortez, 1998).

Durante o período de 1961 a 1975 o estado do Paraná liderava a produção de café no Brasil, com cerca de 46%. Após a execução do Plano de Renovação e Revigoração de Cafezais, o estado de Minas Gerais assumiu a liderança nacional desde 1980 e atualmente representa cerca 48% da produção brasileira (Floriani, 2002).

Neste período a cafeicultura paulista sofreu um decréscimo significativo. Os baixos preços pagos no café e os estímulos dados à produção de cana-de-açúcar e laranja fizeram com que as áreas cultivadas fossem substituídas e as plantações remanescentes não tiveram os cuidados recomendados. A cafeicultura paranaense, principalmente do norte do estado, caiu progressivamente ao longo do tempo. As novas variedades mais produtivas também pareciam mais sensíveis ao clima e a pragas como os nematóides. Um outro fator foi que a região era constantemente castigada por fortes geadas;

conseqüentemente, ocorreu uma substituição da cultura do café nas pequenas propriedades, em que predominava sobre soja e trigo. Diferentemente dos estados de São Paulo e Paraná, a cafeicultura em Minas Gerais aumentou a sua área plantada em até três vezes entre 1970 e 1990, graças à adaptação das novas variedades mais produtivas e às excelentes características edafo-climáticas regionais principalmente do Sul do Estado (Silva & Cortez, 1998).

A produção de café se estende por quase todo o território nacional. Dos 26 estados e Distrito Federal, apenas seis estados não fazem cultivo do café (Roraima, Amapá, Rio Grande do Norte, Sergipe, Rio Grande do Sul e Santa Catarina). Segundo o IBGE (2002), a região sudeste produziu, em 2002, 2 148 022 toneladas de café beneficiado, o que representa 81,07% do café brasileiro, sendo que, deste montante, o Estado de Minas Gerais produziu 1 301 029 toneladas, cerca de 60% do café da região sudeste (Tabela 1).

TABELA 1 Produção nacional de café em toneladas de grãos beneficiados.

	Produção em Toneladas	Porcentagem (%)
Brasil	2.649.609	100
Região Norte	111.728	4,23
Região Nordeste	174.202	6,57
Bahia	169.310	6,38
Região Sudeste	2.148.022	81,07
Minas Gerais	1.301.029	49,09
Espírito Santo	560.320	21,13
São Paulo	280.314	10,57
Região Sul	139.197	5,26
Paraná	139.197	5,26
Região Centro-Oeste	76.460	2,87

IBGE, 2002.

A região Sul/Sudeste de Minas Gerais produz 44.81% do café de Minas Gerais e 22,00% do café brasileiro (Tabela 1). Minas Gerais possui vários sabores de cafés, capazes de atender ao mais diferentes paladares. As regiões produtoras vão desde o cerrado mineiro até a região de montanha com altitude elevada, onde, de acordo com as características climáticas e a localização geográfica, diferentes tipos de café são produzidos.

O estado exporta em média 90% de sua produção, o que é de fundamental importância e proporciona uma receita anual superior a 8 bilhões de reais, gerando 3 milhões de empregos (Floriani, 2002).

2.2 Fatores Agroclimáticos e geográficos sobre a produção de café.

2.2.1 Altitude

A altitude constitui um importante fator a ser considerado pelo sistema de zoneamento agroclimático para a cafeicultura o qual avalia as regiões aptas, restritas e inaptas, pois a altitude influencia diretamente na temperatura e nas chuvas (Souza, 1996).

As temperaturas médias diminuem com o aumento da altitude na razão de aproximadamente 0,7°C para cada 100 metros (Camargo, 1985).

As chuvas são também influenciadas pela altitude, mas de forma bem menos definida que a temperatura, normalmente as precipitações aumentam com o aumento da altitude (Camargo, 1985).

Devido às condições climáticas que ocorrem em diferentes altitudes, esta se torna importante no processamento do café para se obter um produto de melhor qualidade. Conforme Matiello (1991), as regiões que apresentam altos níveis de umidade relativa do ar nos períodos de pré-colheita, colheita e pós-colheita apresentam bebidas de pior qualidade e com maior incidência de microrganismos.

O acúmulo de ar frio e a localização de terreiros em baixadas, proximidades de ribeirões ou represas demonstrou que os fatores climáticos poderiam favorecer o desenvolvimento de processos fermentativos prolongados e deletérios à qualidade do café ainda na planta ou nos terreiros (Cortez, 1997).

Ainda segundo Cortez (1997), o clima é o agente mais importante na qualidade do café e cabe ao produtor exercer adequadamente as atividades de colheita, processamento e armazenamento para obter um produto com qualidade.

Entretanto, não é só pelo fato de o café (*Coffea arabica* L) estar sendo cultivado em maior altitude que ele vai apresentar uma qualidade superior ao café cultivado a 200m mais baixo, existem vários fatores que afetam a qualidade e todos eles devem ser considerados em conjunto (Souza, 1996).

2.2.2 Zoneamento Agroclimático da Cafeicultura Mineira

O zoneamento climático do cafeeiro é de grande importância na implantação e planejamento das atividades agrícolas porque, ao estabelecer regiões climaticamente homogêneas, apresenta os indicadores do potencial do meio físico e biológico da região em estudo, além dos recursos naturais nela existentes (Souza et al., 2003).

O conhecimento do zoneamento climático permite ao produtor escolher melhor a espécie que se adapta à região, uma vez que este zoneamento é distinto para as variedades de *C. arábica* L e *C. canephora* Pierre. Por ser originário da Etiópia, o café espécie *C. arábica* é adaptado às condições de clima tropical de altitude com umidade e temperaturas amenas. Já a espécie *C. canephora*, oriunda da bacia do Congo (continente Africano), adapta-se bem em regiões equatoriais baixas, quentes e úmidas (Matiello, 1991).

O zoneamento agroclimático da cafeicultura delimita áreas aptas para o cultivo, no qual estão estabelecidas as condições hídrico-termais ideais para o seu desenvolvimento e, conseqüentemente, maior produtividade.

Segundo Costa et al. (1996) para cada cultura normalmente são consideradas três classes de aptidão: Apta – quando as condições térmicas e hídricas da área apresentam-se favoráveis ao bom desenvolvimento e produção de cultura em escala comercial; Restrita – quando a área apresenta restrições hídricas ou térmicas, ou ambas, que podem eventualmente prejudicar as fases de desenvolvimento da cultura, repercutindo negativamente em sua produção; e Inapta – quando as características normais do clima não se apresentam adequadas à exploração comercial da cultura por ocorrerem severas limitações térmicas e hídricas, ou ambas, exigindo, para que sejam corrigidas práticas agrícolas dispendiosas. A Tabela 2 descreve a aptidão climática das duas espécies de café mais cultivadas e comercializadas no mundo.

Os parâmetros adotados no mapeamento da aptidão climática baseiam-se em levantamentos dos elementos encontrados nas áreas de origem da espécie considerada e em local onde a cultura é realizada com sucesso (Camargo, 1985).

TABELA 2 Aptidão climática da espécie *Coffea arabica* e *Coffea canephora*

	<i>Coffea arabica</i>		<i>Coffea canephora</i>	
	Fator Térmico	Fator hídrico	Fator Térmico	Fator hídrico
Apta	Tma ¹ entre 18° e 22°C	Dma ² inferior a 150 mm	Tma acima de 22°C	Dma inferior a 150 mm
Restrita	Tma entre 22° e 23°C	Dma entre 150 e 200 mm	Tma entre 21° e 22°C	Dma entre 150 e 200 mm
Inapta	Tma acima de 23°C	Dma superior a 200 mm	Tma abaixo de 21°C	Dma superior a 200 mm

Matiello, 1991,

1. Tma – Temperatura média anual

2. Dma – Deficiência hídrica anual

No entanto considerando o aprimoramento e a adoção das técnicas de irrigação, o efeito fator hídrico deixou de ser limitante para o cultivo do café. Poderíamos dizer que sob enfoque de qualidade o excesso de chuvas chega a ser mais limitante que a própria deficiência, principalmente quando ocorre durante a frutificação, colheita e pós-colheita.

O déficit hídrico apresentado por algumas regiões em determinadas épocas como a frutificação, tornou-se um fator responsável pela elevada qualidade do café produzido nestas regiões.

A cafeicultura brasileira, composta em sua grande maioria por *Coffea arabica*, esta situada entre os paralelos 17 e 23° de latitude Sul, apresenta um ciclo fenológico no qual as fases de florescimento e maturação ocorrem quase bem definidas, as características do clima irão influenciar a qualidade do café em função do desenvolvimento dos frutos e há ocorrência de processos fermentativos prolongados e incidência de grãos defeituosos (Cortez, 1997).

As modificações ocorridas na cafeicultura a partir da década de 60, como a introdução de novas variedades mais produtivas, o uso de adubos químicos e a renovação da lavoura, levaram o estado de Minas Gerais à liderança nacional na produção de café. A extensão geográfica, a ausência de geadas em certas regiões e a adaptação climática das novas variedades estão entre os fatores que levaram o estado a esta liderança (Cortez, 1997).

A cafeicultura mineira situa-se dentro de uma ampla variabilidade de situações climáticas que, em termos de qualidade, permite a obtenção de bebidas entre os extremos, de bebida mole à bebida rio zona (Cortez, 1997).

No entanto, as técnicas agrônômicas e de processamento do produto, ao lado das novas variedades de café (maturação mais uniforme, ciclos mais curtos ou mais longos), podem ser adaptadas, de acordo com o clima, para a produção de café de qualidade melhorada.

O clima de Minas Gerais determina alguns atributos sensoriais ao café que podem ser salientados ou diminuídos, dependendo do grau de aceitação de um determinado consumidor (Cortez, 1997).

De acordo com o estudo de zoneamento agroclimático da cultura do café realizado por Evangelista et al. (2002), cerca de 37% da área do estado de Minas Gerais é apta para a cafeicultura, enquanto 45% podem ser cultivados com algumas restrições devido à temperatura do ar ou à deficiência hídrica e 18% do território estadual é considerado inapta ao cultivo do café. Os autores verificaram, ainda, que as áreas aptas se concentram no Centro/Sul do estado, levando em consideração os dois fatores de definição do zoneamento climático, o fator térmico e deficiência hídrica.

Em regiões cujas condições ambientais favorecem a ocorrência de deterioração microbiana na lavoura ou durante a secagem, recomenda-se a colheita de frutos no estágio cereja e a realização do despulpamento e/ou secagem mecânica (Carvalho et al., 1997).

As regiões do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba, com elevado déficit hídrico no momento da colheita, favorecem a qualidade do café, uma vez que as fases de desenvolvimento e maturação dos frutos ocorrem integralmente (Cortez, 1997).

As regiões Centro/Sul e Sul/Oeste, com moderadas deficiências hídricas e baixas temperaturas durante a maturação dos frutos, são suficientes para interromper o desenvolvimento de microrganismos e a ocorrência das fermentações indesejáveis, o que pode propiciar um café de boa qualidade. Nos locais próximos a represas ou massas de água, pode ocorrer o acúmulo de neblinas nas primeiras horas do dia, seguido de altas temperaturas até anoitecer, o que pode favorecer a ocorrência de processos fermentativos indesejáveis. Nestes locais o tipo de processamento pode favorecer a qualidade do café (Cortez, 1997).

Em áreas como a Região do Jequitinhonha, situada em espigões de divisores de água e Zona da Mata e possuem baixo déficit hídrico e acúmulo de umidade nos locais de plantio e secagem, a fase de maturação dos frutos é mais prolongada, situação que favorece a ocorrência de microrganismos e, conseqüentemente, o desencadeamento das fermentações indesejáveis. Para melhor a qualidade do café o processamento via úmida é o mais recomendado (Cortez, 1997).

2.3 Pré-Processamento e Preparo do Café

Entende-se como pré-processamento as etapas realizadas na cafeicultura antes da industrialização e processamento, as etapas realizadas na indústria de torração.

Independentemente dos tipos de colheita, pré processamento e preparo utilizados, os frutos devem ser esparramados no terreiro de secagem no mais curto espaço de tempo, jamais ficando amontoados ou nas carretas aguardando a descarga, pois as condições de umidade e temperatura existentes no volume de café constituem fator altamente favorável ao desenvolvimento de microrganismos que podem produzir fermentações indesejáveis e colocar em risco a segurança do produto devido à síntese de micotoxinas.

Os frutos colhidos pelo método de derriça devem passar por um lavador-separador, no qual, por diferença de densidade, são separados os frutos de diferentes estádios de maturação e as impurezas. No lavador-separador de café há uma parte que flutua, conhecida pelo nome de “bóia”, que constitui o café seco na árvore, os frutos pós-maduros e quase secos, chamados de “passa”, e os frutos mal granados, entre outros (Chalfoun & Carvalho, 1998).

A outra parte que submerge compõe-se de frutos maduros (cereja), de meia maturação (verde cana) e frutos verdes. Este é um café mais uniforme ao qual se pode aplicar com possibilidade de êxito, tratamento especial. Frutos

pertencentes à parcela varrição, ou seja, frutos que caíram no chão antes e durante a colheita, jamais devem ser misturados às demais parcelas de café, pois normalmente apresentam qualidade inferior (Chalfoun & Carvalho, 1998).

Cada tipo de café originado da lavagem (bóia, cereja+verde-cana+verde) e varrição deve ser seco separadamente, constituindo lotes diferentes, uma vez que, provavelmente darão origem a um produto final com distintas qualidades.

Dependendo das condições climáticas é recomendado um tipo de pré-processamento, de forma a se obter um produto de boa qualidade e que seja economicamente viável ao produtor.

Depois de colhido o fruto de café (figura 1), este pode ser pré-processado de formas distintas: mantendo o fruto de forma integral (café natural); removendo apenas a casca e a polpa (descascado); removendo a casca, a polpa e a mucilagem, mecanicamente (desmucilado) ou removendo a mucilagem por meio de fermentação controlada (despolpado) (Borém, 2002).

2.3.1 Pré-Processamento via seca

O processo via seca é o mais antigo e corresponde a maneira mais simples e natural de processar os frutos de café recém colhidos (Brando, 1999).

Após a colheita recomenda-se passar os frutos em um lavador que separa os frutos pela densidade devido aos diferentes estádios de maturação ou dos diferentes teores de umidade (verde 60 a 70%, cereja 45 a 55%, passa 30 a 40% e seco ou coco 20 a 30%). Os frutos cereja e verde, mais pesados, são separados dos frutos bóia (passa e seco), que são mais leves. Por apresentarem tempos de secagem diferentes, estas duas frações devem ser secas separadamente (Bártholo & Guimarães, 1997).



FIGURA 1. Fruto de café no estágio cereja em corte longitudinal sendo possível visualizar casca (Exocarpo), polpa (Mesocarpo externo), mucilagem (Mesocarpo interno), pergaminho e grão (Foto: Luís Roberto Batista).

A principal característica deste processamento é que os frutos são secos integralmente. De acordo com Brando (1999), a terminologia correta para os café processados via seca é café natural, pois se trata do processo que sofre menor manipulação mecânica e que menos afeta o meio ambiente, ou seja, não polui a água e não cria resíduos sólidos.

A secagem do café pode ser feita exclusivamente em terreiro, associando-se secagem em terreiro com secador mecânico ou apenas secador. Nos três tipos de secagem obtém-se um produto final de qualidade semelhante, desde que sejam adotadas técnicas adequadas (Chalfoun & Carvalho, 1989).

O café natural, por ser seco com a polpa e a mucilagem, permite a transferência do sabor adocicado ao grão, tipicamente este café tem corpo e

aroma pronunciados, acidez de moderada a baixa e sabor naturalmente doce, típico quase exclusivamente dos Cafés do Brasil (Brando, 1999).

2.3.2 Pré-Processamento via úmida

Segundo Dias & Barros (1993) a opção pelo pré-processamento do café cereja descascado se deve tanto à redução que representa na área ocupada no terreiro quanto à melhoria de qualidade e a redução dos custos de secagem.

A preparação dos cafés despulpados a partir de frutos maduros e com a eliminação rápida da fonte de fermentação resulta, se bem processada, em cafés de boa qualidade independentemente da região de produção (Matiello, 1991).

Dependendo do pré-processamento utilizado, o café pode ser chamado de café despulpado, descascado ou desmucilado.

Café Despulpado: é o café cuja casca, a polpa e a mucilagem são removidas, sendo a mucilagem removida por fermentação controlada;

Café Descascado: é o café cuja casca e a polpa são removidos e a mucilagem é removida apenas parcialmente, permanecendo uma fração desta aderida ao pergaminho.

Café Desmucilado: é o café cuja casca, a polpa e a mucilagem são separados mecanicamente.

O café despulpado ou desmucilado é um café com maior acidez e corpo e aroma menos pronunciados. Já o café descascado, por ser um processo intermediário entre o natural e o despulpado ou desmucilado, apesar de ter características próprias, tende às características do natural, uma vez que parte dos compostos presentes na mucilagem restante é transferida para o grão (Brando, 1999).

A secagem, como no caso de café preparado por via seca, pode ser realizada em terreiro ou secadores e, ainda, combinando-se esses sistemas, através do que os grãos são submetidos a uma pré-secagem em condições de

terreiro, completando-se o processo em secadores mecânicos (Chalfoun & Carvalho, 1998).

Uma secagem rápida, tanto para café processados via seca como processados via úmida, permite um bom padrão de qualidade, pois evita a deterioração causada por microrganismos, sendo a presença dos microrganismos inevitavelmente afetada pela tipo de pré-processamento.

3 Fungos associados aos frutos e grãos de café.

A colonização de parte aérea de plantas por microrganismos inicia-se tão logo as folhas e flores são expostas ao ar. As bactérias normalmente colonizam primeiro, mas são seguidas de perto pelas leveduras e, então, por fungos patogênicos e saprófitas. Os fungos continuam a se desenvolver em toda parte das plantas, acelerando este desenvolvimento com a senescência da planta e em frutos maduros (Lacey, 1989).

A colheita promove uma desordem no ecossistema dos grãos, marcada pelas alterações extremas do ambiente da lavoura para uma condição relativamente estável do armazenamento. Estes eventos são acompanhados por profundas mudanças na população microbiana (Lacey, 1989).

A contaminação ou a invasão dos grãos por todas as classes de fungos é provavelmente, maior em regiões ou estações úmidas e menor em regiões ou estações secas e maior em cereais que nascem expostos ao ar do que naqueles que crescem protegidos por vagem (Christensen & Kaufmann, 1969).

Como nas demais culturas, os frutos e grãos de café estão sujeitos a sofrerem contaminação por microrganismos em diferentes fases de desenvolvimento, de colheita e preparo. Esses microrganismos encontram-se presentes nos ambientes das lavouras, preparo e armazenamento do café. A sua atuação detrimental à qualidade e segurança do produto final dependerá das

condições ambientais e de manejo da cultura e do produto final (Batista et al., 2003).

Os primeiros estudos sobre fungos envolvidos na qualidade do café foram realizados por Krug (1940), indicando claramente que uma ou mais espécies de fungos foram as responsáveis pelo mau gosto do café, particularmente os provenientes de varrição. De acordo com o autor, foram dois os fatores importantes para o desenvolvimento de microrganismos: o calor e a umidade.

A qualidade inferior do café produzido em certas regiões do estado de Minas Gerais é justificada, em parte, pela ocorrência de condições ambientais mais favoráveis à incidência de deteriorações microbianas que ocorrem tanto na fase pré como na pós-colheita (Carvalho et al., 1997).

Segundo Wosiacki (1977), a microbiota presente em cafés do Brasil é constituída de espécies dos gêneros *Colletotrichum*, *Rhizopus*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Aspergillus* e *Fusarium*.

O *A. ochraceus* e espécies de *Penicillium* são os fungos que causam mais danos em grãos de café, afetando a coloração dos grãos e a qualidade da bebida, em alguns casos após o segundo mês de estocagem (López Garay et al., 1987; Bucheli et al., 1998), enquanto o *A. tamarii* Kita não tem provocado nenhuma alteração significativa na qualidade do café, segundo López Garay et al. (1987).

Chalfoun & Carvalho (1989) realizaram um dos primeiros trabalhos avaliando a ocorrência da microbiota associada aos frutos de café de diferentes locais do estado de Minas Gerais, do tipo de colheita e das diferentes etapas da produção. Neste estudo, foi possível observar, nos frutos cereja, uma predominância dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, que apesar de presentes, ainda não haviam infectado os frutos sadios. A contaminação era apenas superficial; entretanto, a intensificação do ataque destes fungos ocorreu na fase de secagem e beneficiamento, mostrando, assim, que o beneficiamento

do café não foi eficaz na eliminação nem na redução da contaminação por estes gêneros de fungos.

Meirelles (1990) observou, além da predominância dos gêneros *Fusarium*, *Penicillium* e *Aspergillus*, a presença elevada de fungos do gênero *Cladosporium* nos frutos e grãos de café. Fazendo uma correlação entre a qualidade da bebida e os fungos, a autora observou que ocorreu uma predominância dos gêneros *Aspergillus* (em especial as espécies *Aspergillus ochraceus* e *Aspergillus niger*) e *Fusarium* em cafés de qualidade inferior e de *Cladosporium* em cafés de melhor qualidade. O gênero *Penicillium* ocorreu com a mesma frequência nos diferentes tipos de bebida.

Alves (1996) relaciona o *A. flavus*, o *A. niger* e *A. ochraceus* como os fungos associados ao café de pior qualidade e reforça os resultados obtidos anteriormente relacionando o gênero *Cladosporium* com bebidas de boa qualidade.

Amostras de café do Cerrado Mineiro foram analisadas por Taniwaki, et al. (2000) quanto à presença de fungos. Este estudo avaliou a incidência de fungos desde a árvore até o armazenamento. As espécies mais encontradas foram *Alternaria alternata* (Fr) Keissler, *Fusarium incarnatum* (Roberge) Saccardo, *Cladosporium oxysporum* Berkeley & Curtis, *Penicillium aurantiogriseum* Dierckx, *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Sacc., *Khuskia oryzae* Hudson, *Phoma sorghina* (Saccardo) Boerema et al., *Mucor racemosus* Fre. e leveduras.

A partir dos anos 80, estudos sobre a influência da microbiota fúngica em café passaram a dar uma maior relevância às espécies potencialmente toxigênicas, visando, assim, avaliar as ameaças concretas que possam comprometer a segurança do produto quanto à contaminação por micotoxinas.

Os principais gêneros de fungos toxigênicos têm se mostrado contaminantes naturais do café, acompanhando-o desde a lavoura até a

estocagem. A prevenção da deterioração e produção de micotoxinas só ocorrerá com sucesso quando tais espécies forem conhecidas (Filtenborg et al., 1996).

Mislivec et al. (1983) analisaram a biota fúngica toxigênica de 944 amostras de grão de café de 31 países, as quais foram avaliadas antes e depois de uma desinfecção com hipoclorito a 5%. Dessas amostras, 99,1%, antes de serem desinfetadas superficialmente, estavam contaminadas com fungos toxigênicos, e 47,9% apresentaram contaminação após a desinfecção. Das 251 amostras brasileiras analisadas, 99,9% apresentaram contaminação antes da desinfecção e 32,0% após a desinfestação. As espécies mais encontradas no café brasileiro antes do tratamento foram: *A. ochraceus* 80,8%, *A. niger* 64,7% *Aspergillus glaucus* (L.: Fr.) Link 29,7% *Penicillium* ssp 9,1% e *A. flavus* 2,3%.

Nakajima et al. (1997) encontraram os membros de Grupo *niger* (atualmente chamados de Seção *Nigri*) como população fúngica predominante em grãos de café, sendo que 6,6 % dos isolados deste grupo foram produtores de ocratoxina A em meio de cultura, alertando, assim, para a possibilidade de membros do Grupo *Aspergillus niger* serem, em parte, responsáveis pela presença de ocratoxina em grãos de café e chamando atenção especial ao *Aspergillus foetidus* Thom & Raper, que faz parte do Grupo *A. niger* e que anteriormente já foi mencionado pelos autores como produtor de ocratoxina A.

Os grãos de café robusta estocados em silos na Tailândia foram analisados quanto à presença de microorganismos e ocratoxina A. Os principais fungos encontrados foram *Aspergillus fumigatus* Fresen., *A. niger*, *Aspergillus restrictus* G. Smith, *Penicillium* sp. e *Wallemia sebi* (Fr.) Von Arx. Não foram encontradas evidências quanto à presença de espécies de fungos que podem ser potencialmente produtores de aflatoxina e ocratoxina A (Bucheli et al., 1998).

A interação entre os microorganismos é um dos fatores que podem favorecer o desenvolvimento de fungos e a produção de micotoxinas, segundo Mantle & Chow (2000), que observaram uma maior produção de ocratoxina A

por *A. ochraceus* em café não esterilizado do que em café esterilizado em autoclave. Tal fato foi atribuído a outros fungos como, por exemplo, o *Fusarium stilboides* Wollenw que poderia estar degradando estruturas mais complexas de carboidratos, a microbiota podendo ser, assim, um fator facilitador para a produção da ocratoxina A em grãos de café.

Freitas (2000), estudando amostras de café beneficiado de 17 propriedades produtoras em 17 municípios do Sul de Minas Gerais, isolou o *A. ochraceus* e *A. niger* da parte externa dos grãos em 100% e 95%, respectivamente, das amostras analisadas. Outras espécies, como *A. tamari* (65,5%), *A. flavus* (58,9%) e *A. glaucus* (57,7%), foram os fungos que apresentaram elevada contaminação das amostras. Os gêneros *Fusarium* e *Penicillium* foram isolados de 40,5 % e 25,6%, respectivamente, nas amostras.

Pasin & Abreu (2000), avaliando cinco diferentes cultivares de café processados via seca e via úmida, descrevem que a contaminação com *A. ochraceus* foi superior ao *A. niger* independentemente da cultivar analisada ou do processamento, sendo detectados também *Fusarium semitectum* Berkeley & Ravenel, *Fusarium equiseti* (Corda) Saccardo, *Penicillium variable* Sopp, *Penicillium funicolusum* Thom, *Penicillium rugulosum* Thom e *Cladosporium*.

Silva et al. (2000), analisando os estádios de maturação dos frutos do café em municípios localizados no Sul de Minas Gerais, observaram a presença de *Penicillium crustosum* Thome *F. stilboides* em todas as fases da secagem; já o *A. niger* foi encontrado a partir do fruto “passa”. Outras espécies de fungos também foram isoladas; entre elas *Penicillium citrinum*, *Penicillium restrictum* J. C. Gilman & E. V. Abbott, *Penicillium implicatum* Biourge e *F. semitectum*. Todas estas espécies já foram citadas na literatura como produtoras de micotoxinas.

Urbano et al. (2001), estudando a ocorrência de ocratoxina A e fungos ocratoxigênicos em frutos de café em diferentes estádios de maturação,

observaram que todas as amostras analisadas apresentaram contaminação com fungos dos gêneros *Penicillium*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Rhizopus* e *Aspergillus*, sendo identificadas, neste estudo, 88,1% (de 42 isolados testados) de espécies de *A. ochraceus* e só 11,5% (de 87 isolados testados) de *A. niger* foram produtores de ocratoxina A.

Nasser (2001) identificou, quantificou e avaliou o potencial toxigênico de espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* em amostras de grãos de café beneficiados separados por peneiras. De acordo com a autora, os tratamentos que não são separados em peneiras “Bica corrida” e aqueles que constituem o resíduo da separação das peneiras, por conterem grãos danificados, são mais suscetíveis à invasão por fungos, inclusive espécies produtoras de micotoxinas como *A. ochraceus*, *Aspergillus sclerotiorum* Huber e *Aspergillus sulphureus* (Fres.) Wehmer.

Com o objetivo de identificar a população fúngica de *Aspergillus* e *Penicillium* associados a grãos de café beneficiados antes e após a desinfecção com hipoclorito de sódio a 1%, Batista et al. (2003) analisaram 45 amostras de 10 municípios da região sul do Estado de Minas Gerais. Das amostras analisadas antes da desinfecção, 95,55% apresentaram contaminação com fungos do gênero *Aspergillus* e 42,22%, com fungos do gênero *Penicillium*. Do gênero *Aspergillus*, houve uma maior ocorrência de fungos pertencentes à Seção *Nigri*, presentes em 88,37% das amostras contaminadas com *Aspergillus*, seguida pelas espécies da Seção *Aspergillus*, em 72,09% das amostras. A Seção *Circumdati* esteve presente em 65,12% das amostras, a Seção *Flavi*, em 44,19%; e a Seção *Versicolores*, em 6,98% das amostras. Análises realizadas após a desinfecção mostraram que 46,66% apresentaram contaminação com fungos do gênero *Aspergillus* e 24,44%, com fungos do gênero *Penicillium*. Também após a desinfecção houve um predomínio das espécies pertencentes à Seção *Nigri*, presentes em 25% das amostras contaminadas com *Aspergillus*, seguida pela

espécies da Seção *Aspergillus*, em 20,93% das amostras. A Seção *Circumdati* esteve presente em 16,27% das amostras e a seção *Flavi*, em 6,98%. Dentro do gênero *Aspergillus*, as espécies principais identificadas foram *Aspergillus auricomus* (Guéguen) Saito, *Aspergillus melleus* Yukawa, *A. ochraceus*, *A. sclerotiorum*, *A. sulphureus*, *A. flavus*, *A. tamarisii*, *A. niger* var *niger*, *A. niger* var *awamori*, *A. foetidus*, *Aspergillus versicolor* (Vuill) Tirab e *Aspergillus sydowii* (Bain. & Sart.) Thom & Chrch, do gênero *Penicillium*. Foram identificados 08 espécies: *Penicillium aurantiogriseum*, *Penicillium brevecompactum* Dierckx, *P. citrinum*, *Penicillium corylophilum* Dierckx, *Penicillium chrysogenum* Thom, *Penicillium expansum* (Oudem) Seifert & Samson, *Penicillium glabrum* (Wehmer) e *Penicillium solitum* Westling. A maioria dos isolados identificados fazia parte da contaminação externa do grão, que pode se desenvolver a partir do momento em que as condições ambientais estejam favoráveis. Todas estas espécies identificadas são possíveis produtoras de uma ou mais micotoxinas. Sendo assim, a prevenção é a melhor forma de evitar a sua contaminação e, conseqüentemente, reduzir o risco de síntese de micotoxinas.

Silva (2004), estudando a sucessão ecológica e a interação microbiana em frutos e grãos de café, detectou espécies de *A. flavus*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *A. tamarisii*, *A. sydowii*, *A. foetidus* e *Aspergillus dimorphicus* B. S. Mehrotra & R. Prasad; do gênero *Penicillium* foram detectadas principalmente *P. brevicompactum*, *Penicillium roqueforti* Thom, *P. citrinum*, *P. solitum*, *Penicillium minioluteum* Dierckx, *P. chrysogenum*, *P. crustosum* e *P. corylophilum*, além de outras espécies pertencentes a outros gêneros, como *Fusarium solani* (Martius) Saccardo, *Fusarium lateritium* Ness : Fries, *Fusarium xylarioides* Steyaert e *C. cladosporioides*,

Prado et al. (2004) avaliaram a presença de ocratoxina A em grãos de café e identificaram as espécies responsáveis pela síntese da toxina. Das 57

amostras analisadas, o gênero *Aspergillus* esteve presente em mais de 90% dos grãos, *A. ochraceus* e espécies da Seção *Nigri* representaram 2,8 a 65,4%, respectivamente, do total dos isolados, sendo que 6% dos 260 isolados da Seção *Nigri* e 16% dos 19 isolados de *Aspergillus ochraceus* foram produtores de ocratoxina A.

Suárez-Quiroz et al. (2004a) avaliaram a microbiota do café nos processamentos via seca, via úmida (remoção da mucilagem por fermentação) e processamento mecânico (remoção mecânica da mucilagem), sendo que as espécies toxigênicas *A. ochraceus* e *A. niger* foram isoladas de todos os processamentos, porém após o beneficiamento não foram identificadas nos grãos. A maior contaminação com fungos foi observada no processamento via seca e a menor, no processamento mecânico. Dentre as espécies identificadas encontram-se *A. ochraceus*, *A. niger*, *A. tamaritii*, *A. fumigatus*, *Aspergillus candidus* Link, *P. glabrum*, *Penicillium italicum* Wehmer, *P. minioluteum*, *C. cladosporioides*, *Eurotium chevalieri* L. Mangin, *Botrytis* sp e *Mucor* sp.

A presença de fungos produtores de ocratoxina A em café é praticamente inevitável, porém dentro do sistema de cultivo e de pré-processamento deve-se adotar práticas agrícolas que visem minimizar a contaminação e o desenvolvimento destes fungos.

4 Fungos Toxigênicos Produtores de Ocratoxina A

O potencial toxigênico de um fungo é definido como sendo a habilidade de uma linhagem em produzir metabólitos tóxicos (Piñeiro, 1996). As micotoxinas são caracterizadas como metabólitos secundários tóxicos e são produzidas entre o final da fase exponencial e o início da fase estacionária de crescimento dos fungos, portanto não estão relacionadas com o papel biológico dos microrganismos (Bars & Bars., 2000; Bullerman et al., 1984).

Dentre os fatores ligados à presença de micotoxinas em alimentos, há duas importantes categorias: os fatores intrínsecos, que são dependentes das linhagens ou espécies de fungos e os fatores extrínsecos, que dependem das condições ambientais (Bars & Bars, 2000).

Dentro de uma espécie considerada potencialmente toxigênica, a porcentagem de isolados produtores pode ser muito distinta de acordo com a micotoxina investigada. A produção de um metabólito secundário depende não somente do genótipo do isolado, mas também de uma série de fatores ambientais e nutricionais que irão exercer uma influência sobre o desenvolvimento e o metabolismo do fungo (Abarca et al., 2000). Alguns genes envolvidos na biossíntese de ocratoxina A em *A. ochraceus* são diferentemente regulados em diferentes condições fisiológicas (O'Callaghan et al., 2003).

Os genes envolvidos na produção de metabólitos secundários como micotoxinas nos fungos estão normalmente agrupados (clusters) em um cromossomo (Sidhu, 2002). Estes clusters de genes em fungos indicam uma tendência evolutiva entre genes que regulam a função de um gene. Agrupados eles atuam como uma unidade, conferindo uma vantagem seletiva para o organismo. Funcionalmente, o mecanismo de evolução de clusters de genes envolvidos na produção de micotoxinas para os fungos parece ser semelhante à evolução de um super-gene. Ainda segundo Sidhu (2002) no caso dos fungos produtores de micotoxinas, agrupamento de genes têm um valor de adaptação para o organismo, permitindo a colonização de nichos ecológicos em condições ambientais adversas, como grãos secos ou palha, em que o desenvolvimento dos microrganismos é mais limitado. Tal adaptação é favorecida por espécies em que os genes estão de forma agrupada.

As condições que permitem a produção de micotoxinas por uma linhagem potencialmente toxigênica são mais limitadas do que as que permitem o crescimento dos fungos. Dentro de uma mesma espécie considerada

toxigênica, muitas linhagens não possuem esta propriedade. Já nas espécies potencialmente toxigênicas, a produção das toxinas pode variar em até 1000 vezes (Bars & Bars, 2000).

Os níveis de micotoxina produzida pelos fungos são influenciados pela disponibilidade de nutrientes no substrato (Pitt et al., 2000a). Diferentes espécies tem sido responsáveis pela presença de ocratoxina A em diferentes produtos. Por exemplo: a ocratoxina A em figo é atribuída ao *Aspergillus alliaceus* Thom & Church (Bayman et al., 2002); em uva e vinho, ao *Aspergillus carbonarius* (Bainier) Thom e *A. niger*; e em cereais na Europa, o fungo responsável é o *Penicillium verrucosum* Dierckx. Já o responsável pela presença de ocratoxina A em queijo e produtos derivados de carne é *Penicillium nordicum* Dragoni & Cantoni ex. C. Ramírez.

A ocratoxina A presente em amostras de café, tem sido atribuída à presença principalmente de espécies do gênero *Aspergillus* pertencentes à Seção *Circumdati* e à Seção *Nigri* (Urbano et al., 2001; Batista et al., 2003, Prado et al., 2004).

4.1 *Aspergillus ochraceus* e espécies do Gênero *Aspergillus*/Seção *Circumdati*

Aspergillus Seção *Circumdati* inclui espécies taxonomicamente relacionadas com *A. ochraceus* (Figura 2). Resumindo as características, pode-se dizer que tais espécies possuem conidióforos de tamanho variado, não possuem um estreitamento próximo da vesícula, as paredes são lisas a marcadamente rugososas e a pigmentação pode ser amarelada, laranja, amarronzada e também incolor. A cabeça conidial é usualmente amarelada a ocre. As vesículas são globosas raramente alongadas, bisseriadas, com métulas longas de tamanho muito próximo e forma de cunha, ocasionalmente septadas. Os conídios de paredes finas, são lisos a finamente rugosos, globosos a elipsoidais, nunca excedendo 4-5µm de diâmetro. Os escleródios são comuns, de coloração creme,

amarelo, ruivo, vináceo ou preto com a maturidade de forma variada. Estas espécies não apresentam Células Hülle (Christensen, 1982; Raper & Fennell 1965)

O solo é o habitat mais comum destas espécies, as quais também podem ser isoladas de vegetação em decomposição e grãos armazenados (Kozakiewicz, 1989). Klich (2002) observou que as espécies da Seção *Circumdati* são mais frequentes no deserto, campos cultivados e florestas, principalmente em latitudes que variam de 26 a 45°.

As espécies de *Aspergillus* Seção *Circumdati* são comumente importantes para biotransformação de esteróides em alcalóides, enquanto os escleródios de várias espécies contêm compostos inseticidas, por outro lado, são também importantes como fonte de ocratoxina (Varga et al., 2004; Varga et al., 2003).

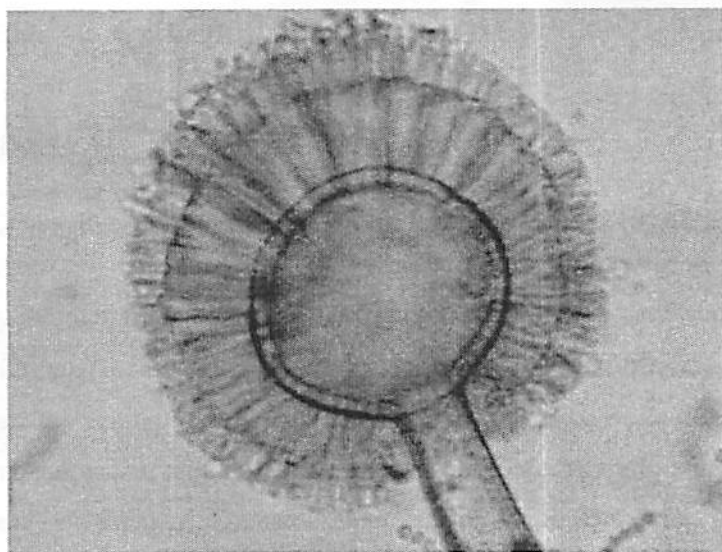


FIGURA 2 Cabeça conidial bisseriada de *Aspergillus ochraceus* (Chalfoun & Batista, 2003)

Frisvad & Samson (2000) citam que uma outra característica das espécies da Seção *Circumdati* é a produção micotoxinas como ácido penicílico, xantomegnina e viomeleina.

Samson (1994b) descreve estas dezesseis espécies da Seção *Circumdati*: *A. auricomus*, *Aspergillus bridgeri* M. Chr., *Aspergillus campestris* M. Chr., *A. dimorphicus*, *Aspergillus elegans* Gasperini, *Aspergillus insulicola* Montemayor & Santiago, *Aspergillus lanosus* Kamal & Bhargava, *A. melleus*, *Aspergillus ochraceoroseus* Bártoli & Maggi, *A. ochraceus*, *Aspergillus ostianus* Wehmer, *Aspergillus petrakii* Vörös, *Aspergillus robustus* M. Chr. & Raper, *A. sclerotiorum*, *Aspergillus sepultus* Tuthill & M. Chr. e *A. sulphureus* além de duas espécies teleomórficas, *Petromyces albertensis* J. P. Tewari e *Petromyces alliaceus* Malloch & Cain.

Análises filogenéticas realizadas por Varga et al. (2000b) indicam que o *A. campestris*, *A. lanosus* e *A. dimorphicus* com *A. sepultus* pertencem ao gênero *Aspergillus* Seção *Candidi*, *Flavi* e *Cremiti*, respectivamente.

A proposta de alteração de nomes do *A. ochraceus* para *A. alutaceus* e do *A. sulphureus* para *A. fresenii* foi muito questionada pelos taxonomistas e as alterações não foram concretizadas, permanecendo os nomes *A. ochraceus* e *A. sulphureus* (Samson, 1994b).

Peterson (2000), fazendo um estudo sobre a relação filogenética de espécies de *Aspergillus* sugere que *A. melleus*, *A. ostianus* e *A. petrakii* sejam sinônimos de *A. ochraceus*.

Pitt et al. (2000b) reformularam uma lista de espécies do gênero *Aspergillus* Seção *Circumdati* que tem sido aceita pela ICPA (International Commission on *Penicillium* and *Aspergillus*) desde a sua publicação em 2000, estando relacionadas *A. auricomus*, *A. bridgeri*, *A. campestris*, *A. dimorphicus*, *A. elegans*, *A. insulicola*, *A. lanosus*, *A. melleus*, *A. ochraceoroseus*, *A. ochraceus*, *A. ostianus*, *A. petrakii*, *A. sclerotiorum*, *A. sepultus* e *A. sulphureus*

Estudos realizados por Varga et al. (2004, 2000b) utilizando metodologias genéticas não demonstraram nenhuma correlação taxonômica entre os isolados produtores de ocratoxina A da Seção *Circumdati*, porém os isolados de *A. ochraceus* foram divididos em dois grupos com algumas diferenças genéticas na região ITS (Internal Transcribed Spacer – Espaços Internos Transcritos) do rDNA (DNA ribossomal), sendo que um grupo sintetizava a ocratoxina A e outro não. Esta diferença não foi determinada pela região geográfica do isolado, mas provavelmente a habilidade de produzir a ocratoxina A é uma capacidade evolutiva da espécie.

O tamanho e a forma dos escleródios, mas principalmente a cor, são características macroscópicas importantes na identificação das espécies do gênero *Aspergillus* Seção *Circumdati* (Rapper & Fennell, 1965). Com o crescimento a 37°C em meio CYA (Czapek Yeast Extract Ágar) é possível realizar uma separação da maioria das espécies desta Seção (Christensen, 1982). O teste da produção de ocratoxina A permite a separação de *A. mellus* e *A. lanosus*, que não são produtores desta toxina (Frisvad & Samson, 2000). Já a cor das colônias em meio CYA a 25°C e as características dos conídios, conidióforos e seriação (bisseriados) tendem a ser bem próximas para a maioria das espécies.

A contaminação com a espécie mais frequentemente encontrada, o *A. ochraceus*, detectado em solos tanto de desertos como cultivados, como também em produtos agrícolas após a colheita, possivelmente ocorre antes da colheita ou durante a secagem (Klich, 2002; Varga et al., 2004; Wilson, 2002).

O *A. ochraceus* é capaz de se desenvolver em uma grande faixa de temperatura, de 8 a 30°C, sendo que a temperatura ótima de crescimento varia de 25 a 30°C e a atividade de água mínima para o seu desenvolvimento é de 0,76, já para a produção de ocratoxina A a atividade de mínima é de 0,85, com a faixa ótima variando de 0,95-0,99 (Bars & Bars, 2000; ICMSF, 1996; Suárez-Quiroz

et al., 2004b). Extrapolando estes dados para os frutos e grãos de café, a produção de ocratoxina A ocorre quando o produto apresenta um valor de umidade acima de 20% na base seca (Bars & Bars, 2000), a uma atividade de água de 0,80 os grãos de café estão protegidos do desenvolvimento de *A. ochraceus* e da síntese de ocratoxina A (Suárez-Quiroz et al., 2004b).

A ocratoxina A foi originalmente isolada do *A. ochraceus* em 1965, através de um experimento conduzido em laboratório (van der Merwe et al., 1965), mas nos anos seguintes, outras 6 espécies pertencentes à Seção *Circumdati* (*A. alliaceus*, *A. melleus*, *A. ostianus*, *A. petrakii*, *A. sclerotiorum* e *A. sulphureus*) foram relatadas por Hesseltine et al. (1972) e Ciegler (1972).

Wilson et al. (2002), avaliando uma lista parcial de espécies produtoras de ocratoxina A, observaram que a maioria das espécies faz parte da seção *Circumdati* entre elas *A. alliaceus*, *A. melleus*, *A. ochraceus*, *A. ostianus*, *A. petrakii*, e *A. sulphureus*.

A Tabela 3 descreve algumas espécies do gênero *Aspergillus* Seção *Circumdati* identificadas como produtoras de micotoxinas, demonstrando também que tais espécies são freqüentemente isoladas de frutos e grãos de café. A porcentagem de isolados produtores de ocratoxina A é muito variada, dependendo muito do número de isolados testados. De acordo com Bars & Bars (2000), a porcentagem de *Aspergillus ochraceus* produtores de ocratoxina A freqüentemente tem variado de 25 a 75%.

TABELA 3 Espécies do gênero *Aspergillus* Seção *Circumdati* citadas como produtoras de ocratoxina A.

Espécie	Numero de fungos testados/ produtores de ocratoxina A	Origem/produto	Referência
<i>A. alliaceus</i>	1/1	Micoteca	Abarca et al. (1997)
	1/1	Solo da Austrália	Varga et al. (1996)
	6/6	Figo	Bayman et al. (2002)
<i>A. auricomus</i>	1/1	Grãos de café	Batista et al. (2003)
	3/1	Amendoim	Varga et al. (1996)
<i>A. elegans</i>	2/2	Grãos de café	Batista et al. (2003)
<i>A. ostianus</i>	1/1	Grãos de café	Batista et al. (2003)
<i>A. ochraceus</i>	41/27	Grãos de café	Batista et al. (2003)
	42/37	Frutos e grãos de café	Urbano et al. (2001)
	15/2	Micoteca	Abarca et al. (1997)
	19/3	Frutos/grãos de café	Prado et al. (2004)
	18/14	Grãos de café	Nasser (2001)
	12/9	Frutos de café	Silva (2004)
	20/1	Ração	Accensi et al. (2004)
<i>A. sulphureus</i>	23/22	Grãos de café	Batista et al. (2003)
	2/1	Solo da Índia	Varga et al. (1996)
	34/12	Grãos de café	Nasser (2001)
<i>A. sclerotiorum</i>	3/2	Grãos de café	Batista et al. (2003)
	3/1	Solo Tailândia	Varga et al. (1996)
	3/3	Grãos de café	Nasser (2001)
<i>A. petrakii</i>	1/1	Grãos de café	Batista et al. (2003)

Com a finalidade de aprimorar a identificação de fungos ocratoxigênicos em grãos de café, Schmidt et al. (2004) realizaram um estudo visando detectar e quantificar o DNA de *A. ochraceus* produtores de ocratoxina A em grãos de

café. Segundo os autores, a detecção bem como a quantificação do DNA do fungo por PCR (- Reação em Cadeia da Polimerase) em grãos de café foi possível, mas as correlações com os dados de concentração de ocratoxina A foram baixos. Entretanto, uma correlação positiva entre a presença do fungo e a presença de ocratoxina A foi estabelecida. Contudo, esta pesquisa oferece uma ferramenta para uma rápida detecção de *A. ochraceus* sem a necessidade do tempo de cultivo e identificação.

Mesmo com o avanço tecnológico na determinação de fungos produtores de ocratoxina A em café, a contaminação com ocratoxina A mostra-se bem heterogênea dentro de uma amostra e bastante pontual.

4.2 *Aspergillus carbonarius* e espécies do Gênero *Aspergillus*/Seção *Nigri*

As espécies pertencentes ao gênero *Aspergillus* Seção *Nigri* têm como uma das principais características a produção de conídios pretos, marrom e marrom escuro; daí refere-se atualmente a este grupo de fungos como **Black *Aspergillus***. Morfologicamente algumas espécies possuem características marcantes em suas estruturas, as quais são facilmente diferenciadas. O *A. carbonarius* (Figura 2) destaca-se devido aos seus conídios pretos, grandes, distintamente rugosos (Klich, 2002) e longos conidióforos. Já *Aspergillus japonicus* Saito é o único que possui cabeça conidial unisseriada. Nas espécies intermediárias destacam-se os *Aspergillus niger aggregate*, estas espécies são reconhecidas por apresentarem cabeça conidial bisseriada e conídios relativamente pequenos. Os escleródios estão presentes em poucos isolados (Kozakiewicz, 1989)

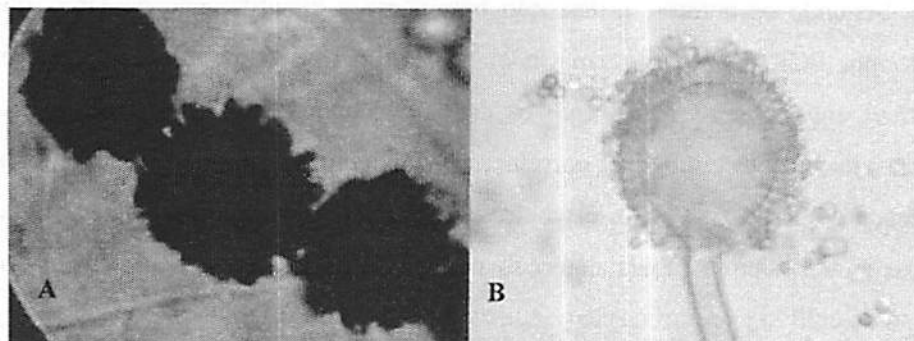


FIGURA 2 Em A conídios distintamente rugosos de *Aspergillus carbonarius* e em B Cabeça conidial unisseriada de *A. japonicus* (Chalfoun e Batista 2003)

Os Black *Aspergillus* (*Aspergillus* Seção *Nigri*) têm sido isolados em toda parte do mundo, sendo o *A. niger* a espécie mais comum. As espécies desta seção são consideradas m patógenos oportunistas, causam deterioração em alimentos e na natureza são encontradas no solo, áreas cultivadas, em composto e sobre compostos orgânicos em decomposição (Abarca et al., 2004; Schuster et al., 2002; Varga et al., 1993). Algumas são utilizadas na indústria de fermentação para produção de enzimas hidrolíticas e ácidos orgânicos. Desde que o *A. niger* foi reconhecido como GRAS (Genetically Regarded as Safe), este tem sido manipulado geneticamente na industria de biotecnologia (Varga et al., 1993). Cabe ressaltar que os isolados de *A. niger* utilizados na industria são criteriosamente selecionados e testados não apresentando risco a saúde dos consumidores e manipuladores.

Segundo Seifert & Lévesque (2004), a taxonomia das espécies da Seção *Nigri* tem sido muito problemática. Algumas espécies podem ser facilmente distinguidas com base na presença ou ausência de métulas e pela forma e rugosidade dos conídios. Abarca et al. (2004) também consideram que a taxonomia da Seção *Nigri* não é clara, porque é primeiramente baseada sobre critérios morfológicos e, em alguns casos, a diferença entre as espécies é muito

sutil. Por outro lado os autores reconhecem que há um esforço científico para tal posição taxonômica.

Abarca et al. (2004) propõem a mais nova chave de identificação dos Black *Aspergillus*, a partir de critérios morfológicos, para a identificação das espécies mais comuns. Nesta chave de identificação estão as espécies de *A. japonicus*, *Aspergillus aculeatus* Iizuka, *A. carbonarius* e *A. niger* aggregate. As espécies consideradas raras como *Aspergillus helicothrix* Al-Musallam, *Aspergillus ellipticus* Raper & Fennell e *Aspergillus heteromorphus* Batista & H. Maia, não foram incluídas.

Samsom (1994a) considera seis espécies pertencentes à seção *Nigri*, *A. carbonarius*, *A. ellipticus*, *A. heteromorphus*, *A. japonicus* e *A. niger*. Para Varga et al. (2000a), são oito as espécies baseadas em análises de polimorfismo do DNA, *A. heteromorphus*, *A. ellipticus*, *A. carbonarius*, *A. japonicus*, *A. aculeatus*, *A. niger*, *Aspergillus tubingensis* (Schober) Mosseray e *Aspergillus brasiliensis*. As espécies de *Aspergillus awamori* Nakazawa, *A. foetidus*, *Aspergillus phoenicis* (Corda) Thom e *Aspergillus ficuum* (Reichardt) Hennings foram consideradas como sinônimos.

Para fins taxonômicos, Pitt et al. (2000b) divulgaram a lista de espécies da seção *Nigri* aceita pela International Commission on *Penicillium* and *Aspergillus* - ICPA, estando incluídas *A. awamori*, *A. carbonarius*, *A. ellipticus*, *A. foetidus*, *A. helicothrix*, *A. heteromorphus*, *A. japonicus*, *A. niger*, *Aspergillus pallidus* Kamyschko., *A. phoenicis* e *A. pulverulentus* (McAlpine) Wehmer.

A possível capacidade de *A. niger* em produzir ocratoxina A apresenta um risco para a saúde humana e animal, visto que esta espécie é amplamente utilizada na indústria de alimentos e possui estatus de GRAS (Generally Recognized as Safe) pela FDA (Food and Drug Administration). Segundo Abarca et al. (2004), ao longo do tempo em que o *A. niger* tem sido utilizado na

produção de enzimas, ácidos orgânicos e na indústria de alimentos, aparentemente nenhum efeito adverso para a saúde humana foi constatado.

O *A. niger* se desenvolve em temperaturas que variam de 6 a 47°C e com uma temperatura ótima entre 35 e 37°C, a atividade de água mínima para o seu crescimento é de 0,88, que é relativamente maior se comparado com outras espécies de *Aspergillus* (Schuster et al., 2002). O *A. carbonarius* se desenvolve em temperaturas que variam de 10 a 40°C e com uma temperatura ótima entre 30 e 35°C, a atividade de água ótima para o seu desenvolvimento varia de 0,93 a 0,987. Para a produção de ocratoxina A, as ótimas condições são temperatura entre 15 e 20°C e atividade de água entre 0,95 e 0,98 (Mitchell et al., 2004). Altos níveis de atividade de água favorecem a produção de ocratoxina A para o *A. carbonarius* (Bellí et al., 2004), sendo considerado o principal responsável pela presença de ocratoxina A em vinho, uva passa e, provavelmente, café (Cabañes et al., 2002; Pitt et al., 2000; Pitt, 2000a).

Estudos têm mostrado que, ocasionalmente, isolados de *A. niger* podem ser produtores de ocratoxina A (Abarca et al., 1994); entretanto, a espécie muito próxima morfológicamente o *A. carbonarius* é mais comum e uma fonte mais importante de ocratoxina A (Heenan et al., 1998).

Hennan et al. (1998) demonstraram que os isolados de *A. carbonarius* são freqüentemente produtores e são capazes de sintetizar altas concentrações de ocratoxina A, entretanto o *A. carbonarius* é bem menos comum que o *A. niger*. Já o *A. niger* é mais freqüentemente isolado, porém raramente é encontrado um isolado produtor de ocratoxina. Abarca et al. (2004) também consideram o *A. carbonarius* como sendo o maior produtor de ocratoxina A da seção *Nigri*, mas acham difícil conhecer a extensão de sua ocorrência em alimentos, pois os *Black Aspergillus* são normalmente identificados como *A. niger*. Schuster et al. (2002) citam o *A. citricus* como uma importante fonte de ocratoxina A.

A Tabela 4 descreve algumas espécies do gênero *Aspergillus* Seção *Nigri* identificadas como produtoras de micotoxinas.

Accenci et al. (2001) analisaram 92 isolados classificados como *A. niger aggregate* visando também a produção de ocratoxina A, todos os isolados foram agrupados em duas espécies propostas, *A. niger* e *A. tubingensis*, de acordo com o padrão de sua região de ITS-5.8S rDNA realizada por RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms). A distribuição dos isolados foi muito similar 52,2% foram classificados como T, correspondendo ao *A. tubingensis*, e 48,2% foram classificados como N, correspondendo ao *A. niger*. Dos seis isolados produtores de ocratoxina A, todos foram classificados com N e nenhum como T. Os isolados de *A. niger aggregate* estariam mais próximos ao *A. niger* do que outras espécies.

Os isolados de *A. niger aggregate*, além de servirem de suporte para futuros estudos sobre a biossíntese de ocratoxina, são espécies fracas produtoras de ocratoxina A (Téren et al., 1996).

A lista de espécie de *Aspergillus* produtores de ocratoxina A gera controvérsia, mas atualmente é aceito que *A. niger* é raramente produtor de ocratoxina e que *A. carbonarius* é um importante produtor de ocratoxina A em café e uva em algumas partes do mundo (Seifert & Lévesque, 2004).

TABELA 4. Espécies do gênero *Aspergillus* Seção *Nigri* produtoras de ocratoxina A.

Espécie	Número fungos testados/ produtores de ocratoxina A	Origem/Produto	Referência
<i>A. carbonarius</i>	18/18	Uvas	Cabañes et al. (2002)
	6/6	Frutos e grãos de café	Joosten et al. (2001)
	33/30	Meio de Cultura	Heenan et al. (1998)
	12/5	Meio de Cultura	Téren et al. (1996)
	87/10	Frutos e grãos de café	Urbano et al. (2001)
	19/2	Cereais, soja e ervilhas	Abarca et al. (1994)
<i>A. niger</i>	115/2	Meio de Cultura	Heenan et al. (1998)
<i>A. foetidus</i>		Grãos de café	Nakajima et al. (1997)
<i>A. japonicus</i>	45/9	Meio de Cultura	Téren et al. (1996)
<i>A. niger</i> agregados	304/21	Frutos/grãos de café	Prado et al. (2004)
	100/3	Meio de Cultura	Téren et al. (1996)

4.3 Espécies dos gêneros *Penicillium*, *Neopetromyces* e *Petromyces*

Dentro do gênero *Penicillium*, as únicas espécies consideradas produtoras de ocratoxina A são o *P. verrucosum*, comum em cereais e produtos agrícolas de climas temperados, e o *P. nordicum*, mais comum em produtos derivados de carne e queijos (Samson et al., 2000).

Frisvad & Sansom (2000) propõem um novo gênero, *Neopetromyces*, para as espécies da Seção *Circumdati*, sendo o *Neopetromyces muricatus* (Udagawa, Uchiyama & Kamiya) Frisvad & Samson morfologicamente similar ao *A. melleus*. Uma das características que diferenciam as duas espécies é que o *A. melleus* não produz ocratoxina A, diferentemente de *N. muricatus*. *Petromyces alliaceus* Malloch & Cain e *Petromyces albertensis* J. P. Tewari

foram considerados como sinônimos e denominados de *P. alliaceus* sendo classificados como teleomorfos da Seção *Flavi* e também produtores de ocratoxina A.

Todos os trabalhos conduzidos até no momento confirmam que as principais espécies de fungos responsáveis pela presença de ocratoxina A em grãos de café são *A. ochraceus*, espécies morfológicamente próximas, *A. carbonarius*, e raramente *A. niger*.

Várias outras espécies têm sido citadas como produtoras de ocratoxina A, *A. albertensis*, *A. wentti* (Varga et al., 1996), *A. fumigatus* e *A. versicolor* (Abarca et al., 1997), porém a sua identificação é questionada e a estabilidade do potencial toxigênico de algumas destas espécies é drasticamente reduzido quando estas culturas são armazenadas em laboratório (Abarca et al., 2000).

5 Biossíntese de Ocratoxina A

A ocratoxina A (figura 3) é um metabólito secundário constituído de uma isocumarina com um átomo de cloro ligada ao L-fenilalanina (O'Callaghan et al., 2003).

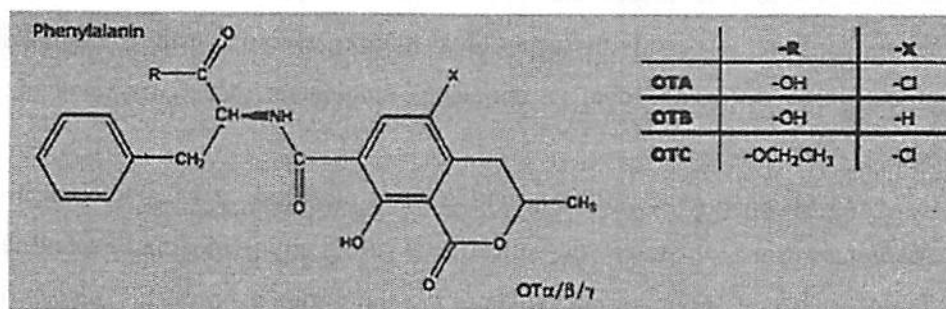


FIGURA 3 Estrutura das ocratoxinas (Mühlencoert, 2003)

O ciclo biossintético da ocratoxina A ainda não foi estabelecido, embora o grupo isocumarina seja uma estrutura formada via acetato e malonato e o ciclo da síntese de policetídeos com o L-fenilalanina seja derivado do ciclo do ácido shiquimico (Moss, 1996).

A caracterização molecular dos genes envolvidos na biossíntese de micotoxinas é de vital importância para o entendimento das organizações, regulação e expressão destes genes. Este conhecimento pode levar ao desenvolvimento de estratégias de controle biológico de fungos micotoxigênicos e o desenvolvimento de plantas com sementes resistentes à contaminação (Sweeney & Dobson, 1999).

A identificação de fungos ocratoxigênicos encontrados em produtos agrícolas, rações e alimentos em geral é de vital importância para eliminar a presença de ocratoxina A na cadeia alimentar. Neste sentido, os diagnósticos moleculares são os mais recomendados. Tais métodos podem ser melhor estabelecidos quando baseados em características genéticas específicas de fungos produtores de ocratoxina A, isto é, genes e enzimas envolvidos na biossíntese de ocratoxina A (Mühlencoert et al., 2004).

Para elucidar os genes e enzimas envolvidos na biossíntese de ocratoxina A é necessário primeiramente determinar os fatores ambientais que regulam a produção de micotoxinas. A produção de metabólitos secundários não é essencial para o desenvolvimento dos microrganismos, mas é regulada algumas vezes de acordo com as condições ambientais (Mühlencoert et al., 2004).

O'Callaghan et al. (2003), estudando a clonagem e a caracterização molecular de genes da síntese de policetídeos (PKS) envolvidos na biossíntese de ocratoxina A, observaram que os genes *pks* não foram expressados quando o *A. ochraceus* cresceu sobre meio restrito para a produção de ocratoxina A; assim, a expressão destes genes *pks* envolvidos na síntese de ocratoxina A de

Aspergillus ochraceus são diferentemente regulados em diferentes condições fisiológicas. A expressão destes genes aparece fortemente durante os 4 a 5 dias de desenvolvimento dos fungos em meios favoráveis, sendo reduzida com o tempo.

Um esquema da biossíntese de ocratoxina A (Figura 4) foi sugerido por Huff & Hamilton (1979). De acordo com a hipótese dos autores, a biossíntese da ocratoxina A possui três etapas: a primeira é a síntese da ocratoxina α via meleína envolvendo uma síntese de policetídeos, seguida por uma cloração por uma cloroperoxidase e a ativação do grupo carboxil; na segunda etapa, o precursor é a fenilalanina, sintetizada via ciclo ácido shiquímico, seguido pela ativação do grupo etil éster, a terceira etapa é a ligação destes precursores gerando a ocratoxina C, um etil éster da ocratoxina A. A desesterificação por uma esterase é o último passo deste postulado.

Harris & Mantle (2001) propõem um ciclo diferente. Como não se encontrou nenhuma evidência da ocratoxina C e da meleína como intermediário da ocratoxina A, os autores sugerem que um ciclo não específico leva à formação de ocratoxina β (ocratoxina α sem o átomo de cloro) via ocratoxina α para formar a ocratoxina A. Segundo os autores, parece haver uma dominância pelo ciclo biossintético envolvendo as ocratoxinas $\beta \rightarrow \alpha \rightarrow A$, como também uma ramificação das ocratoxinas $\beta \rightarrow B$. Uma outra alternativa pode ser $\beta \rightarrow B \rightarrow A$, mas a ocratoxina α não é diretamente envolvida.

A substituição do átomo de cloro transformando a ocratoxina B em ocratoxina A promove, com isso, não só a proteção da toxina contra as carboxilpeptidase em animais monogástricos, mas também parece dar uma importante expressão na toxicidade em animais (Mantle, 2002).

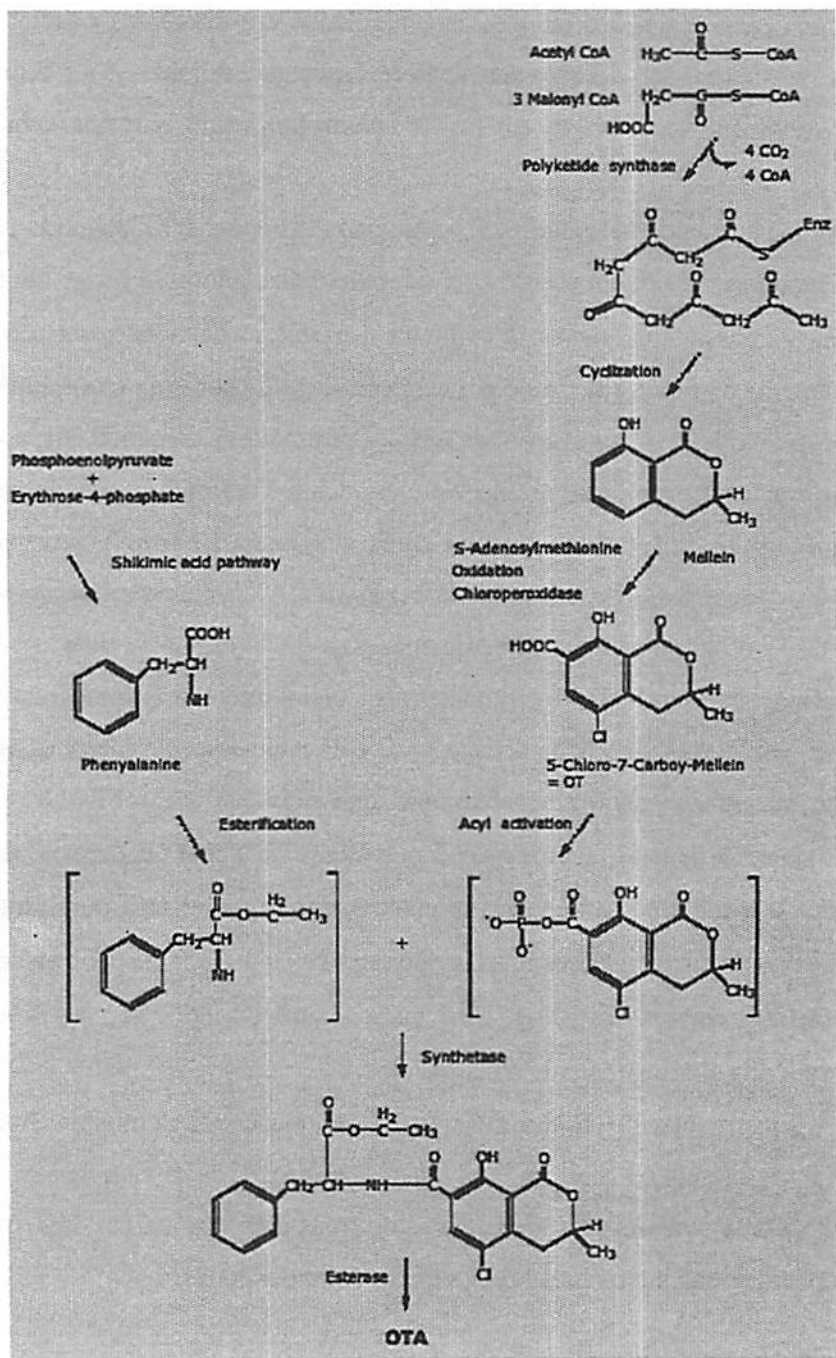


FIGURA 4 Esquema da biossíntese do ocratoxina A (Hull e Hamilton, 1979)

6 Toxicologia da ocratoxina A

As ocratoxinas foram as primeiras micotoxinas caracterizadas após as aflatoxinas e estão recebendo uma atenção em todo o mundo por seu caráter nefrotóxico (Abarca et al., 2000). A ocratoxina A é um metabólito altamente tóxico, produzido principalmente por espécies de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* oportunistas naturais e agentes de biodeterioração de commodities agrícolas ricas em carboidratos produzidos em toda parte do mundo, em latitudes que variam de temperaturas frias a tropicais (Mantle, 2002)

Das micotoxinas produzidas por *Aspergillus*, só a ocratoxina A é potencialmente tão importante quanto as aflatoxinas (Bennett & Klich, 2003).

A ocratoxina é uma nefrotoxina para todas as espécies de animais estudadas; é o composto mais tóxico para os rins humanos, pois tem a maior meia vida para eliminação quando se comparam os humanos com outras espécies animais (Bennett & Klich, 2003).

De acordo com a International Agency for Research on Câncer - IARC (1993), a ocratoxina A faz parte da categoria de compostos 2B, ou seja, compostos possivelmente cancerígenos para humanos e com suficiente evidências para animais, reconhecendo-se que a ocratoxina A causa toxicidade renal, nefropatia e imunossupressão em vários animais.

Devido as semelhanças morfológicas e funcionais entre as lesões da nefropatia suína provocada pela ocratoxina A e as das nefropatia endêmicas em humanos, tem-se sugerido que esta micotoxina pode ser o agente causal. Esta nefropatia mortal afeta as populações rurais da Croácia, Bósnia-Herzegovina, Iugoslávia, Bulgária e Romênia, onde se calcula que aproximadamente 20 000 pessoas sofrem desta enfermidade conhecida como Nefropatia Endêmica dos Balkans (Balkan Endemic Nephropaty – BEN) (Peraica et al., 1999).

A BEN, uma doença renal crônica de etiologia desconhecida, é encontrada em limitadas regiões geográficas da Croácia, Bulgária, Bósnia-

Herzegovina, Eslovênia, Servia e Iugoslávia. A incidência de tumores na pélvica renal e na uretra é de 90 a 100 vezes maior do que em regiões não endêmicas (Abouzied et al., 2002; Peraica et al., 1999). Não existe uma fase aguda, os primeiros sinais e sintomas não são específicos e consistem em cansaço, cefaléia, perda de peso e palidez, em fases avançadas da enfermidade ocorre uma redução de peso e no tamanho dos rins, que se mostram fibrosos, com vários sinais de inflamação (Peraica et al., 1999).

Em 1982, a ocratoxina A foi pela primeira vez detectada no sangue de habitantes fora da região dos Balkans. Desde então, vários estudos foram realizados em países fora das regiões endêmicas. Rizzo et al. (2002), revisando vários estudos, demonstraram que a concentração média de ocratoxina A no sangue de indivíduos estudados na Croácia foi de 0,39 ng/ml e de 0,53 µg/kg de peso corpóreo por dia, que é inferior à média observada em outros países europeus, com média de 0,9 µg/kg de peso corpóreo por dia. Estes resultados sugerem que há necessidade de reduzir a contaminação em cereais e produtos à base de cereais e, conseqüentemente, reduzir a exposição de humanos e animais à ocratoxina A não só em áreas onde ocorre a BEN, mas também em outros países europeus onde a doença é ausente.

Alguns estudos têm encontrado uma correlação geográfica entre a concentração de ocratoxina A em alimentos e rações e a manifestação da BEN, outros não. De acordo com Abouzied et al. (2002), os resultados obtidos em seu estudo indicam que a ocratoxina A pode não ser a única causa da BEN, podendo estar ocorrendo um sinergismo com outras substâncias tóxicas e/ou uma predisposição genética daquela população.

As micotoxinas, com suas diversidades de estruturas químicas, são capazes de reagir com vários tipos de receptores moleculares, incluindo DNA (Ácido desoxirribonucléico), RNA (Ácido ribonucléico), proteínas funcionais, cofatores enzimáticos e constituintes de membranas. A importância de um

receptor molecular de uma micotoxina é determinada pela: a – afinidade pela forma ativa da micotoxina, b – o seu papel em um processo bioquímico vital, c – a persistência da lesão formada e d – a severidade das conseqüências da lesão.

Com base nestas considerações, as lesões que ocorrem no DNA e RNA são de particular importância porque não só destroem a integridade estrutural destas moléculas informativas, mas interrompem sua biossíntese e de proteínas e outros constituintes celulares essenciais para a vitalidade celular.

De acordo com Hsieh (1987) as reações entre as micotoxinas e seus receptores moleculares podem ser não covalente-reversíveis, ligações do tipo fracas pontes de hidrogênio, ligações iônicas ou não polares entre as duas moléculas. Estas interações são reversíveis pela dissociação do complexo receptor-micotoxina como processo metabólico de remoção da toxina por um sítio receptor ou por ligações covalentes irreversíveis. As reações mais importantes são os ataques eletrofilicos não específicos sobre os centros nucleofilicos do receptor molecular, normalmente eteroátomos de nitrogênio, oxigênio e enxofre em proteínas e ácidos nucléicos. Estas ligações resultam numa mudança conformacional do receptor, provocando injurias químicas e alterações em suas funções. Mesmo assim, este tipo de complexo receptor-micotoxina pode ser desativado por vários processos celulares, incluindo a decomposição espontânea de ligações covalentes.

Os mecanismos moleculares dos efeitos tóxicos da ocratoxina A ainda são desconhecidos. Os efeitos tóxicos causados pela ocratoxina A incluem aberrações cromossômicas, efeito inibidor sobre a biossíntese de proteínas e coagulação e inibição da produção de ATP mitocondrial.

Experimentalmente tem se mostrado que a ocratoxina A é teratogênica, causando defeitos craniofaciais em roedores e aves e mal de Ficher em ratos, além de ser o mais potente carcinogênico renal. A toxina é também imunossupressiva, pelo seu efeito inibidor sobre a síntese de proteínas contendo

fenilalanina e por um inibidor enzimático, particularmente com respeito a carboxilpeptidase e algumas enzimas dos rins, notavelmente fosfoenolpiruvato carboxilquinase. Pelo efeito sobre a peroxidação lipídica, a ocratoxina A pode romper o retículo endoplasmático. A permanência da ocratoxina A em animais varia consideravelmente; a sua meia-vida é de 3 dias para ratos, 3 semanas em macacos e 7 semanas em humanos voluntários. Sem dúvida, a longa permanência da ocratoxina A no homem é um aspecto preocupante, embora a maioria desta permanência esteja ligada com proteínas, acarretando conseqüências menos graves do que se estivesse livre no sangue (Mantle, 2002)

Segundo Höhler (1998), muitos dos diferentes efeitos tóxicos da ocratoxina A podem ser parcialmente controlados pela adição na dieta de compostos antioxidantes, particularmente a vitamina E e, possivelmente, outros carotenóides e flavonóides. De particular importância pode ser a habilidade destes compostos em neutralizar os efeitos imunotóxicos das micotoxinas e seus efeitos cancerígenos. A descoberta de que a vitamina E reduz a toxicidade, a peroxidação lipídica e a geração de radicais livres *in vitro*, bem como a neutralização *in vivo*, são hipóteses adicionais sobre o papel que os radicais livres têm sobre a etiologia da ocratoxicose.

7 O café como fonte de ocratoxina A para saúde humana

A perspectiva de que o café pode ser uma importante fonte de ocratoxina A levou vários pesquisadores à busca de informações sobre a redução de ocratoxina A durante a torração e a presença desta na bebida do café. O efeito da torração ainda é muito questionado, porém a transferência da maior parte ocratoxina A presente no café torrado e moído e café instantâneo para a bebida tem sido bem documentada (Tsubuchi et al., 1987; Stegen et al., 1997).

A ingestão de ocratoxina A em âmbito internacional tem sido avaliada com base na média dos produtos consumidos com os níveis médios de

contaminação. Em países europeus, de acordo com os dados recomendados pela FAO/ WHO, a média total de ingestão de ocratoxina A foi estimada em 45 µg/kg de peso corpóreo por semana, assumindo o peso corpóreo de 60 Kg. Os cereais e vinhos contribuem com 25 e 10 µg/kg de peso corpóreo por semana, respectivamente, para a ingestão média, enquanto o suco de uva e o café contribuem, cada um, com 2-3 µg/kg de peso corpóreo por semana. Outros alimentos como frutas secas, cerveja, chá, leite e carne de aves, contribuem com 1,0 µg/kg de peso corpóreo por semana (WHO, 2001)

Jorgensen (1998), ao avaliar produtos que possivelmente contribuem com a ingestão de ocratoxina A na população da Dinamarca, avaliou os níveis de ocratoxina A em carne de porco e de aves, café, cerveja e grãos. Com base em seus resultados, o autor concluiu que os cereais (1,9 µg/kg por peso corpóreo por dia) e produtos derivados de cereais podem ser considerados os mais importantes contribuintes para a ingestão de ocratoxina A para os dinamarqueses; entretanto, o elevado consumo de cerveja (0,5 µg/kg por peso corpóreo por dia) e de café instantâneo e torrado (0,4 e 1,0 µg/kg por peso corpóreo por dia respectivamente) pode fazer com que estes produtos tenham uma contribuição maior. Além disso, a quantidade relativa de contribuição desses cereais pode variar de ano para ano dependendo das condições climáticas e de colheita.

Studer-Rohr et al. (1995), com base em seus estudos avaliando a presença de ocratoxina A em grãos de café, o mínimo ou nenhum efeito da torração sobre a concentração da toxina e a transferência da maior parte da toxina presente nos grãos para a bebida, concluíram que o consumo de café pode contribuir significativamente com a ingestão de ocratoxina para humanos.

Os cereais são conhecidos pelos epidemiologistas e toxicologistas por serem os principais responsáveis pelos problemas de saúde associados com ocratoxina A na Europa (Albert & Gauchi, 2002).

Os estudos realizados no Brasil mostram que a ocratoxina A, embora detectável, foi apresentada em menor níveis no café brasileiro; assim, a contaminação com esta toxina não parece ser um problema de saúde pública (Rodríguez-Amaya & Sabino, 2002).

Segundo WHO (2001), é possível observar claramente que o café não é a maior fonte de ocratoxina A em uma dieta normal.

A presença de ocratoxina A em café é indesejável porque esta pode ser usada como uma barreira não tarifária (Suarez-Quiroz et al., 1999). Os países que não são produtores de produtos susceptíveis à contaminação com micotoxinas têm limites de tolerância menores do que para os seus produtos. Na Dinamarca, onde a Nefropatia Suína causada pelo consumo de ração contaminada com ocratoxina A é endêmica, o limite de ocratoxina A para rins de suínos é de 25µg/Kg; já para grãos como o café, que é um produto importado, o limite é de 5,0µg/Kg. Há também um tendência em se exigir mais dos produtos que são importados e proteger os que são produzidos em alguns países, principalmente na Europa. Além disso, com a tendência de se eliminarem as barreiras tarifárias, podemos esperar uma intensificação das barreiras não tarifárias, entre elas as fitossanitárias e as de segurança alimentar.

8 Efeito do Pré-Processamento do café sobre a presença de ocratoxina A

O período em que ocorre a invasão do café por fungos toxigênicos não tem sido adequadamente estudado. Isto é de grande importância para o desenvolvimento de estratégia com o intuito de reduzir os níveis de contaminação (Taniwaki et al., 2003; Bucheli et al., 2000).

O desenvolvimento de fungos pode ocorrer sobre uma grande variedade de produtos agrícolas. Para o café, o risco do desenvolvimento dos fungos é maior durante uma secagem inadequada dos frutos e na reabsorção de umidade dos grãos armazenados.

Bucheli & Taniwaki (2002) mostraram que o crescimento dos fungos e a produção de ocratoxina A ocorrem somente durante a secagem do café e que a secagem rápida é efetiva para que a ocratoxina A não seja produzida. Uma boa secagem ao sol ou sua combinação com secagem mecânica fornecem um controle adequado.

A formação de ocratoxina A durante a secagem foi estudada por Bucheli et al. (2000) na Tailândia, os quais demonstraram que a produção de ocratoxina A em café naquele país ocorre normalmente em café seco ao sol, que os frutos passas foram mais susceptíveis do que os frutos verdes e que os defeitos, especialmente a inclusão de casca, foram as maiores fontes de contaminação.

Os produtos de melhor qualidade, com secagem e beneficiamento apropriados, e a redução dos defeitos podem reduzir substancialmente a concentração de ocratoxina A em grãos de café. A redução na concentração de ocratoxina A durante a seleção de grãos e torração do café tem sido bem estudada, com resultados variados (WHO, 2001; Nasser, 2001).

Heilmann (1999), testando vários tipos de processamento tentando avaliar qual efetivamente reduz a concentração de ocratoxina em grãos de café, observou que na classificação por coloração, a contaminação com ocratoxina A foi superior nos grãos rejeitados, mas em geral os valores encontrados em grãos classificados como padrão indicam que este tipo de processamento não leva a uma razoável separação de grãos sadios e grãos contaminados. Os resultados também foram inconsistentes para polimento e tratamento a vapor. Os melhores resultados foram obtidos com o processo de torração e utilizando solventes orgânicos na produção de café descafeinado.

8.1 Beneficiamento

Desde que a casca do café é uma significativa fonte de ocratoxina A, a seleção e o beneficiamento dos frutos de café são métodos efetivos de redução de ocratoxina A (Viani, 2002).

Em frutos de café robusta, Bucheli et al. (2000) demonstraram que frutos verdes e maduros continham apenas traços de ocratoxina A nos grãos (média de $0,3\mu\text{g}/\text{Kg}$) e a casca apresentou uma contaminação média de $0,4\mu\text{g}/\text{Kg}$, os frutos passas foram os que apresentaram-se mais contaminados na maioria das propriedades estudadas, sendo, que nos grãos, a contaminação variou de não detectado a $31,8\mu\text{g}/\text{Kg}$, com uma média de $3,3\mu\text{g}/\text{Kg}$, e nas cascas destas amostras, a contaminação variou de 0,3 a $38,6\mu\text{g}/\text{Kg}$, com uma média de $7,3\mu\text{g}/\text{Kg}$. Nos frutos secos a contaminação muito variada, principalmente na casca, com uma variação de 5,9 a $1206\mu\text{g}/\text{Kg}$ uma média de $389\mu\text{g}/\text{Kg}$, a variação foi de 1,4 a $51,6\mu\text{g}/\text{Kg}$, com uma média de $16,5\mu\text{g}/\text{Kg}$. Este foi o primeiro experimento demonstrando que a ocratoxina A concentra-se na casca do café, parte que é removida durante o beneficiamento.

Pittet et al. (1996) observaram que café torrado adulterado com casca apresentou níveis mais elevados de contaminação com ocratoxina A, cerca de seis vezes mais do que as amostras de café solúvel puro. Isto ocorre porque a casca do café é um substrato mais favorável ao desenvolvimento de fungos e produção de ocratoxina A do que o próprio grão de café, demonstrando que alimentos adulterados não geram apenas perdas econômicas, mas também influenciam a segurança do produto.

Nasser (2001) demonstrou que a relação entre a ocorrência de ocratoxina A e diferentes tamanhos de grãos separados por peneiras indica que a seleção de grãos também reduz o risco da contaminação por ocratoxina A, apesar dos baixos níveis de contaminação encontrados. Das 12 amostras analisadas, 7 apresentaram níveis de contaminação que variaram de 0,120 a $0,591\mu\text{g}/\text{Kg}$; das

amostras contaminadas três eram resíduos das peneiras e uma era amostra em que não foi realizada o procedimento de separação denominado de Bica Corrida.

8.2 Torração

Até as últimas décadas do século XX, acreditava-se que a ocratoxina A era destruída após a torração. A ocorrência de ocratoxina A em café torrado foi relatado pela primeira vez por Tsubouchi e colaboradores, em 1988; desde então iniciaram-se vários estudos sobre o café torrado e moído (Tabela 5).

Os menores níveis de redução foram observados por Studer-Rohr et al. (1995) e Tsubouchi et al. (1987) os quais estudaram grãos de café que foram naturalmente deteriorados ou sobre onde uma cultura de *Aspergillus ochraceus* havia crescido em condições de laboratório, favorecendo, assim, a produção de altas concentrações de ocratoxina A (90-1300 µg/Kg). Tais elevadas concentrações não são representativas das condições encontradas em grãos de café comercializados, ou seja, a degradação de elevadas concentrações pelas reações químicas naturais durante a torração é mais provável em pouca quantidade de ocratoxina A, o que normalmente é encontrado em grãos de café (WHO, 2001).

Tsubouchi et al. (1987) afirmam que a torração não causa nenhuma redução na concentração inicial de ocratoxina presente nos grãos de café, além de a inoculação do fungo ser um método mais acurado para avaliar a permanência da ocratoxina durante a torração, uma vez que a micotoxina pode estar ligada aos componentes dos grãos de café, sendo este o motivo de sua forte resistência térmica. Neste estudo, os pesquisadores demonstraram, também, que toda a ocratoxina presente no café torrado e moído é transferida para a bebida do café, sendo a toxina solúvel em água quente.

TABELA 5. Efeito da torração do café sobre a concentração de ocratoxina A

Tipo de Amostra	Conc de Ocratoxina A em ppb nos grãos	Conc de Ocratoxina A em ppb após a torração	% de redução de Ocratoxina A após a torra	Referências
Natural	4.0	03	90	Mico et al. (1989)
Natural	8.6	0.2	96	Mico et al. (1989)
Natural	4.9	1.5	69	Van der Stegen et al. (2001)
Natural	7.3	1.4	81	Blanc et al. (1998)
Artificial	780	890	0	Studer-Rohr et al. (1995)
Inoculação	1300	1200	11	Studer-Rohr et al. (1995)
Inoculação	140	121	22	Studer-Rohr et al. (1995)
	92	92	0	Studer-Rohr et al. (1995)
Natural	3,8 - 23	0,0	90-100	Cantáfora et al. (1983)
Inoculação	0,17 - 130	0,17 - 114	0-12	Tsubouchi et al. (1987)
Natural	1.99	0.18	90,95	Romani et al. (2003)
Natural	29,30	0.95	96,75	Romani et al. (2003)
Natural	2.82	0.95	94,33	Romani et al. (2003)
Natural	9,64	0.47	95,12	Romani et al. (2003)

Natural – amostras naturalmente contaminadas com ocratoxina A

Artificial – amostras artificialmente contaminadas com a ocratoxina A

Inoculação – amostras onde foram inoculados fungos produtores de ocratoxina A

Resultado semelhante foi observado por Studer-Rohr et al. (1994) segundo os quais nas amostras que foram inoculadas com *A. ochraceus* não ocorreu uma redução significativa de ocratoxina A após a torração e que de 25 a 50% da toxina presente no grão são detectados na bebida após a torração.

Diferentemente, Micco et al. (1989) observaram uma redução de 90 a 100% da concentração de ocratoxina A durante a torração em amostras

naturalmente contaminadas. Além disso, a toxina presente em amostras de café torrado não foi transferida para a bebida.

Para Studer-Rohr et al. (1995), uma falha na amostragem e as diferentes origens de grãos de café são os fatores responsáveis para justificar a diferença de teores de ocratoxina A entre os grãos de café e o café torrado e moído. Seguindo esta linha de raciocínio, e levando em consideração os baixos valores de ocratoxina A encontrados em café torrado e moído, os níveis de ocratoxina A encontrados em grãos de café seriam falhas de amostragem e não representam uma real contaminação do produto.

Nas amostras analisadas por Stengen et al. (2001), foi observada uma redução de 69% da ocratoxina A presente inicialmente. Para os autores, a diferença deste valor para outros estudos (Tabela 5) pode ser devido ao tipo de máquina utilizada para a homogeneização do café, em que pode ter sido possível a remoção de alguns resíduos antes da torra. Os autores apresentam, ainda, três diferentes explicações para a redução da ocratoxina A, sendo as três válidas: a primeira seria a remoção física, devido a eliminação de resíduos (fumaça); a segunda, uma possível isomerização da ocratoxina no carbono 3, formando um outro produto; e a terceira a degradação térmica da ocratoxina A, com possível envolvimento da umidade. Todas as três explicações podem ter um papel parcial na redução da ocratoxina A durante a torração do café.

Romani et al. (2003) analisaram quatro amostras naturalmente contaminadas em três tipos de torração (clara, média e escura). De acordo com os resultados obtidos, houve uma redução média de ocratoxina A de 90%, mostrando que a torração reduz a concentração de ocratoxina A, com o maior percentual de redução nas amostras com maior nível de contaminação. Os autores concluem também que a maior parte desta redução é devido a destruição térmica, com relação ao tipo de processo, no café expresso foi observada uma redução acima de 90%.

Devido á relativa alta freqüência de contaminação de ocratoxina A em grãos de café e à dificuldade no controle sanitário desta commodities, o processo de torração como um passo para a obtenção da bebida parecer ser um caminho eficiente para reduzir os níveis de ocratoxina A e minimizar o risco de ingestão através do consumo de café (Romani et al., 2003).

Os dados sobre o papel da torração nos níveis de ocratoxina A em grãos de café naturalmente permite que pode ser adotado um limite de 80 a 90% de redução, uma vez que este é o método mais preciso, pois demonstra com mais segurança o que está ocorrendo naturalmente. Além disso, as metodologias mais sensíveis de análises de ocratoxina A em grãos de café torrado também confirmam estes níveis de redução.

9. Níveis de ocratoxina A em grãos de café e propostas de limites

Como nos demais produtos agrícolas, os frutos de café estão sujeitos a serem contaminados com fungos produtores de ocratoxina A em todas as fases de produção, estudos microbiológicos têm mostrado que as espécies ocratoxigênicas estão normalmente presentes em frutos e grãos de café. De acordo com o processamento, com o modo de condução da lavoura e de processamento, as amostras irão apresentar maior ou menor risco da presença de ocratoxina A. Os tipos de amostras analisadas podem ser responsáveis pelos níveis variados de ocratoxina A em café. Isto pode ser observado no primeiro estudo sobre ocratoxina A em grãos de café realizado por Levi et al. (1974). Os níveis de contaminação variaram de traços a 360µg/Kg, sendo que os níveis mais elevados ocorreram em amostras visualmente deterioradas, demonstrando, assim, que os tipos de amostras podem apresentar níveis variáveis de ocratoxina A. Das 68 amostras comerciais analisadas, 2 apresentaram traços de contaminação e uma amostra estava contaminada com 80µg/Kg de ocratoxina A. Devido ao limite de detecção do método ser de 20 µg/Kg, 4,41% das amostras

estavam contaminadas. Devido à baixa taxa de contaminação, os autores concluíram que o café não parecia ser um bom substrato para a produção de ocratoxina A, comparado com outros produtos como arroz e trigo.

Cantáfora et al. (1983), utilizando cromatografia líquida de alta eficiência, um método mais sensível e preciso, analisaram 40 amostras de grãos de café; destas, 22,5% estavam contaminadas com níveis que variaram de 0,5 a 23 µg/Kg, entre as quais apenas 2 (5%), do continente africano, apresentaram contaminação acima de 5,0 µg/Kg. Os resultados obtidos neste estudo somam-se aos do trabalho realizado por Levi et al. (1974), pois ambos têm a opinião de que o risco de ocratoxina A em café é muito baixo.

Tsubouchi et al. (1984) avaliaram 22 amostras de grãos de café; destas, 4 apresentaram contaminação com ocratoxina A em níveis que variaram de 9,9 a 46 µg/Kg. Neste estudo foi possível observar também que o café em comparação com o arroz, não é um bom substrato para a produção de ocratoxina A, porém o grão de café pode ser susceptível à infestação e produção de ocratoxina A por alguns isolados de *Aspergillus ochraceus* insensíveis à presença de cafeína.

Micco et al. (1989) avaliaram 29 amostras de grãos de café, destas amostras, 58% apresentaram contaminação que variaram de 0,2 a 15 µg/Kg. Das 14 amostras brasileiras analisadas, 10 estavam contaminadas com níveis que variaram de 0,2 a 5,5 µg/Kg; das 14 amostras analisadas, apenas uma estava contaminada com limites acima de 5,0 µg/Kg.

Studer-Rohr et al. (1994) analisaram 25 amostras de grãos de café, destas 52% apresentaram níveis de contaminação que variaram de 1,2 a 56 µg/Kg, sendo que a amostra que apresentou um nível de contaminação de 56 µg/Kg estava aparentemente deteriorada. Resultado semelhante foi observado por Levi et al. (1974) segundo os quais as amostras deterioradas apresentaram os maiores índices de contaminação.

Em 1995, Studer-Rohr e colaboradores analisaram mais 25 amostras de grãos de café; novamente 13 amostras estavam contaminadas com níveis que variaram de 0,9 a 50 μ g/Kg. Das 5 amostras brasileiras analisadas, 3 estavam contaminadas com 2,02; 4,0 e 7,4 μ g/Kg. Como podemos observar, uma amostra brasileira estava com contaminação acima de 5 μ g/Kg. Do Total das 13 amostras analisadas, 7 estão contaminadas com valores acima de 5 μ g/Kg.

Nakajima et al. (1997) analisaram 47 amostras de grãos de café importadas pelo Japão, destas amostras, 14 (30%) apresentaram contaminação com níveis que variaram de 0,1 a 17,4 μ g/Kg. Nas 10 amostras brasileiras analisadas, em nenhuma foi detectada a presença de ocratoxina A. As amostras contaminadas foram importadas do Imem, Tanzânia e Indonésia. Apenas 2 amostras apresentaram contaminação acima de 5 μ g/Kg.

Das 19 amostras de grãos de café originadas da América do sul, enviadas para o Food and Drug Administration – FDA e analisadas por Trucksess et al. (1999), 9 apresentaram contaminação que variaram de 0,1 a 4,6 μ g/Kg. Nenhuma amostra apresentou contaminação com ocratoxina A acima de 5,0 μ g/Kg.

Pasin & Abreu (2000) avaliaram a incidência de ocratoxina em grãos de café de cinco diferentes cultivares (Acaiaí, Catuai, Icatú, Mundo Novo, Rubi) processadas via seca e via úmida. Apenas uma amostra da cultivar Rubi processado por via úmida (despolpado) apresentou contaminação de 1,86 μ g/Kg, um valor bem abaixo de 5 μ g/Kg.

Romani et al. (2000), analisando diferentes tipos e origens de café observaram que a maioria (76/84) das amostras oriundas de países africanos estavam contaminadas com ocratoxina A com níveis que variaram de 0,5 a 48 μ g/Kg, com uma média de 4 μ g/Kg, em particular as amostras do Zaire e do Congo, as quais apresentaram os níveis mais elevados. Entre as amostras do continente Americano, 19 (31,66%) das 60 amostras estavam contaminadas com

uma média de 3µg/Kg. Das 32 amostras brasileiras, 9 estavam contaminadas, sendo que 2 apresentaram contaminação acima de 5µg/Kg. Entre as amostras Asiáticas 7 (38,88%) das 18 amostras estavam contaminadas, nenhuma acima de 5µg/Kg, as quais apresentaram uma contaminação média de 1,06µg/Kg. Do Total das amostras analisadas por Romani et al. (2000), em 65% não foi detectada a presença de ocratoxina A; níveis mais elevados (7-8µg/Kg) foram excepcionais, apenas encontrados em 2 amostras. Os autores observaram que o café produzido no continente americano tinha significativamente menor contaminação; já o continente africano apresentou uma maior frequência e níveis mais elevados. Para os autores é possível que as condições climáticas e o pré-processamento tenham influenciado estes resultados.

Das 21 amostras de grãos de café analisadas por Robledo et al. (2001) coletadas no estado de Nayarit, no México, 67% estavam contaminadas com ocratoxina A, com uma média dos valores positivos de 30,1µg/Kg, sendo que os níveis de contaminação variaram de 16,6 a 62,5µg/Kg. Segundo os autores as condições climáticas da região em que o café foi produzido favoreceram o desenvolvimento de fungos e a produção de ocratoxina A tanto na lavoura como no local de armazenamento, onde ficou por longo período. Esta seria a explicação para esclarecer a elevada média de contaminação encontrada nos cafés do México e a média mais baixa encontrada em cafés da Colômbia e do Brasil.

Leoni et al. (2001) analisaram 132 amostras de grãos de café coletadas em Minas Gerais (35 amostras), Paraná (65), São Paulo (13), Espírito Santo (17) e Bahia (2). Destas amostras 27, estavam contaminadas com níveis de variaram de 0,7 a 47,8µg/Kg, com uma contaminação média de 7,1µg/Kg. Segundo os autores, nem o número Total de defeitos, nem um defeito específico, com o preto, verde ou ardido, mostraram uma relação com a contaminação por ocratoxina A.

Batista et al. (2003) avaliaram 40 amostras de grãos de café armazenados, provenientes de 11 municípios do sul do estado de Minas Gerais, 5 amostras apresentaram contaminação que variaram de 0,64 a 4,14 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ com uma contaminação média dos valores positivos de 2,45 $\mu\text{g}/\text{Kg}$. Neste estudo foi possível observar que a contaminação com ocratoxina A foi mais freqüente em amostras de qualidade inferior rio e riado.

Taniwaki et al. (2003) avaliaram a influência do tipo de processamento sobre a formação de ocratoxina A nos estados de São Paulo e Minas Gerais. Em 135 amostras analisadas, os autores observaram que apenas 7% delas apresentaram contaminação com ocratoxina A acima de 5 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, sendo que em todos os casos havia o envolvimento das condições ambientais locais e práticas inadequadas de colheita, secagem e armazenamento. Sendo assim Boas Práticas Agrícolas seriam a solução do problema da ocratoxina A em grãos de café.

Iamanaka & Taniwaki (2003) avaliaram a presença de ocratoxina em grãos de café e verificaram que em 38(42,2%) amostras não foi detectada a presença de ocratoxina A e 86,6% das amostras apresentaram contaminação abaixo de 5 $\mu\text{g}/\text{Kg}$. As 52 amostras contaminadas apresentaram níveis que variaram de 0,2 a 165 $\mu\text{g}/\text{Kg}$.

Moraes & Luchese (2004) avaliaram a presença de ocratoxina A em amostras de café processadas por via seca e via úmida, além do estágio de maturação dos frutos. Das 54 amostras analisadas, 22 (40,74% das amostras) estavam contaminadas com níveis que variaram de 0,3 a 160 $\mu\text{g}/\text{Kg}$; a contaminação de ocratoxina A nos diferentes estágios de maturação dos fruto não foi significativa. De acordo com as autoras, o café de varrição foi o mais contaminado, sendo que 3 das 10 amostras coletadas no noroeste do estado do Rio de Janeiro apresentaram níveis de contaminação que variaram de 10.1 a 563,3 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, as autoras do estudo sugerem que o café de varrição e o café seco

no chão representam uma importante fonte de inóculo de fungos produtores de ocratoxina A e que estes produtos não devem ser comercializados.

Prado et al. (2004) analisaram 41 amostras de café arábica e 16 amostras de café robusta de diferentes países. Das 41 amostras de café arábica, 22 (53,7%) apresentaram níveis de contaminação abaixo de 5µg/Kg. A contaminação variou de 1,3 a 31,5µg/Kg com uma média de 6,9µg/Kg. Das 16 amostras de café robusta, 50% apresentaram níveis de contaminação abaixo de 5µg/Kg, sendo que os níveis de contaminação variaram de 1,7 a 23,3µg/Kg com uma média de 6,1µg/Kg. Neste estudo as amostras originadas da África apresentaram níveis mais elevados e frequentes de contaminação, o inverso do que ocorreu com as amostras da América que apresentaram níveis mais baixos que os da África e da Ásia.

Com relação à distribuição dos níveis de ocratoxina A em grãos de café e os efeitos contraditórios a respeito da torração, vários países têm elaborado legislações que permitem a concentração máxima de ocratoxina A em grãos de café e derivados. Estes limites têm por finalidade assegurar a integridade da saúde da população destes países, não expondo, assim, os consumidores aos efeitos tóxicos causados pela ocratoxina A.

Da literatura consultada pode-se observar um fato comum, segundo o qual, independentemente da origem, parte das amostras apresentou baixos níveis de ocratoxina A uma parcela menor apresentou níveis variáveis e algumas apresentaram elevados níveis de ocratoxina A. Observa-se que tais informações teriam maior valor se associadas a informações sobre as etapas do processo em que as contaminações, o desenvolvimento fúngico e a ocratoxigenese possam ter ocorrido, o que não se verifica na maioria das pesquisas. Fica evidente, no entanto, a predominância de amostras cujos resultados registram ausência ou baixos níveis de contaminação por ocratoxina A, confirmando ser o café um substrato menos favorável para a biossíntese de ocratoxina.

Em vista dos riscos que a contaminação dos alimentos por micotoxinas implicam à saúde humana e de animais e dos problemas econômicos que ela acarreta, vários países, especialmente aqueles afetados por estes problemas, têm se visto obrigados a empreender atividades de prevenção e de controle em um determinado número de produtos agrícolas (Sabino, 1999).

Em países da Europa Central, a ocratoxina A é, provavelmente, a micotoxina carcinogênica mais onipresente, que pode ser detectada em níveis maiores que 0,1 ppb (parte por bilhão) em mais de 90% das amostras de sangue de humanos e suínos (Petzinger & Weidenbach, 2002). Esta toxina tem sido encontrada em muitos produtos, incluindo cereais, uvas, vinho, cerveja, café, carne, milho, arroz e outros (WHO, 2001).

Alguns países, visando proteger a saúde dos consumidores, estão formulando legislações propondo limites máximos de ocratoxina A em produtos agrícolas. A União Européia está propondo um limite de 5 µg/Kg para ocratoxina A para grãos de café. Este limite tão baixo é visto por alguns países produtores de café como barreiras comerciais impostas por aqueles países.

Com a possibilidade de propor limites máximos de micotoxinas para cereais e derivados, vários estudos começaram a ser realizados sobre a ação preventiva para reduzir a contaminação em todos os estágios de produção e comercialização dos alimentos.

A legislação para alimentos serve para assegurar a saúde dos consumidores e os interesses econômicos de produtores e compradores de alimentos. Vários fatores, de natureza científica ou não, podem influenciar no estabelecimento da regulamentação e limites das micotoxinas, os quais incluem: a disponibilidade de dados toxicológicos; a disponibilidade de dados sobre a presença de micotoxinas em vários produtos básicos; o conhecimento da distribuição das concentrações de micotoxinas nos lotes; a disponibilidade de métodos analíticos; a legislação em outros países com os quais existem contatos

comerciais e a necessidade de um abastecimento de alimentos (van Egmond, 2002).

Contudo alguns limites reguladores estão sendo adotados e usados como barreiras comerciais e não estão baseados em medidas de riscos. A concentração de micotoxinas em alimentos passa a ser controlada e não será aceito o produto com níveis superiores aos limites propostos, injustamente fixados como barreiras econômicas e que podem tornar escasso algum alimento e gerar prejuízos econômicos, particularmente a países em desenvolvimento (Trucksess, 1999)

Podem ocorrer, também, implicações no comércio internacional sobre o limite máximo de micotoxinas nos produtos, os quais podem ser mais de interesse político do que de saúde pública. De acordo com Sabino (1999), os países que não são produtores de produtos susceptíveis à contaminação com micotoxinas têm limites de tolerância menores do que os produtores, principalmente quando alimentos importados são considerados como luxo. Este fato torna mais simples, para as autoridades, decretar uma medida administrativa do que resolver o problema da presença de um contaminante natural inevitável, ficando a critério dos países exportadores e importadores estabelecer os limites de tolerância.

Estudos sobre a frequência e os níveis de ocorrência de ocratoxina A em alimentos e plasma de sangue humano indicam que os produtos alimentícios são frequentemente contaminados (EC - European Commission, 2002)

Segundo a EC (2002) a ocratoxina A é uma micotoxina com propriedades carcinogênica, nefrotóxica, teratogênica, imunotóxica e, possivelmente, neurotóxica, podendo a sua concentração ter uma longa meia vida em seres humano.

A Comunidade Européia tem trabalhado vários anos sobre a harmonização da padronização da concentração de micotoxina em alimentos, a

regulamentação da EC prevê um limite máximo de 5µg/Kg de ocratoxina A para grãos e cereais crus e de 3µg/Kg para derivados de produtos de cereais e 10µg/Kg em frutas secas de videiras como uva passa (Berg, 2003).

De acordo com o JECFA – Joint WHO/FAO Committee on Food Additives, os níveis de ingestão toleráveis tem sido estimados em 100ng (Kg peso corpóreo) por semana e 1,5 – 5,7 ng (Kg peso corpóreo) por dia pela União Européia (Walker, 2002)

Devido ao conhecimento da exposição humana e aos vários dados toxicológicos de estudos em animais, a União Européia tem recomendado que os vários níveis de ocratoxina A sejam inferiores a 5ng (Kg por peso corpóreo) por dia (Bennett & Klich, 2003)

Zero de ocratoxina A é o desejável, quantidade em traços é aceitável, mas a quantidade acima de traços é a questão no corrente estado de conhecimento (Mantle, 2002)

No Brasil não existe ainda uma legislação estabelecendo um limite máximo de ocratoxina A em grãos e produtos de café.

Na Comunidade Européia tem-se estudado o estabelecimento um limite de 5µg/Kg para grãos de café e para café torrado e moído e de 10µg/Kg para café solúvel, estes limites têm previsão para entrar em vigor em 30 de junho de 2006, sendo que até o final de 2004 finaliza o estudo sobre a toxicidade da ocratoxina A (Verstraete, 2004). Dentre os países que possuem legislação de ocratoxina A para grão e produtos de café estão a Grécia e Itália, que devem aderir aos limites estabelecidos pela União Européia.

Enquanto a introdução de limites máximos para cereais pode ser justificável, uma vez que as commodities são as maiores fontes de exposição, a proteção da saúde humana é melhor assegurada por medidas preventivas para minimizar a contaminação com fungos produtores de ocratoxina A e as condições que favoreçam a produção da toxina. O programa realizado pela FAO

(Food Agriculture Organization – Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura) visa a identificação e o controle das causas de contaminação do café. Tais estudos são apropriados para beneficiar ambos os ponto de vista, da saúde humana e econômico, através da redução de produtos deteriorados ou rejeitados (Walker, 2002)

10 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ABARCA, M. L.; ACCENSI, F.; CANO, J.; CABAÑES, F. J. Taxonomy and significance of black aspergilli. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 86, n. 1, p. 33-49, Aug. 2004.

ABARCA, M. L.; BRAGULAT, M. R.; CASTELLÁ, G.; ACCENSI, F.; CABAÑES, F. J. Hongos productores de micotoxinas emergentes. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 17, p. S63-S68, 2000.

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

ABARCA, M. L.; BRAGULAT, M. R. CASTELLÁ, G.; CABAÑES, F. J. Ochratoxin Production by strain of *Aspergillus niger* var *niger*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60. n. 7, p. 2650-2652, July 1994.

ABOUZIED, M. M.; HORVATH, A. D.; PODLESNY, P. M.; REGINA, N. P.; METODIEV, V. D.; KAMENOVA-TOZEVA, R. M.; NIAGOLOVA, N. D.; STEIN, A. D.; PETROPOULOS, E. A.; GANEV, V. S. Ochratoxina A concentration in food and feed for a region with Nalkan Endemic Nephropathy. **Food Additives and Contaminants**, Oxford, v. 19, n. 8, p. 755-764, Aug. 2002.

ACCENSI, F.; ABARCA, M. L.; CANO, J.; FIGUERA, L.; CABAÑES, F. J. Distribution of ochratoxin A producing strain in the *A. niger* aggregate. **Antonie va Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 79, n. 3/4, p. 365-370, 2001.

ACCENSI, F.; ABARCA, M. L.; CABAÑES, F. J. Occurrence of *Aspergillus* species in mixed feeds and component raw materials and their ability to produce ochratoxin A. **Food Microbiology**, London, v. 21, n. 5, p. 623-627, Oct. 2004.

AGRIANUAL - Anuário da Agricultura Brasileira. São Paulo: FNP Consultoria e Comércio, 2002.

AGRIANUAL - Anuário da Agricultura Brasileira. São Paulo: FNP Consultoria e Comércio, 2004.

ALBERT, I.; GAUCHI, P. P. Sensitivity analysis for high quantiles of ochratoxin A exposure distribution. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 75, n. 1/2, p. 143-155, May 2002.

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

BARS, J. L.; BARS, P. L. Mycotoxigenic in Grains Application to Mycotoxic Prevention in Coffee. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL SOBRE BIOTECNOLOGIA NA AGROINDÚSTRIA CAFEEIRA, 3., 2000, Londrina. **Anais...** Londrina: IAPAR/IRD, 2000. p. 513.

BÁRTHOLO, G. F.; GUIMARÃES, P. T. G. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 18, n. 187, p. 33-42, 1997

BATISTA, L. R.; CHALFOUN, S. M.; PRADO, G.; SCHWAN, R. F.; WHEALS, A. E. Toxigenic fungi associated with processed (green) coffee beans. (*Coffea arabica* L.). **International Journal fo Food Microbiology**, Amsterdam, v. 85, n. 3, p. 293-300, Aug. 2003.

BAYMAN, P.; BAKER, J. L.; DOSTER, M. A.; MICHAILIDES, T. J.; MAHONEY, N. E. Ochratoxin production by the *aspergillus ochraceus* group and *A. alliaceus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 5, p. 2326-2329, May 2002.

BELLÍ, N. RAMOS, A. J.; SANCHIS, V.; MARÍN, S. Incubation time and water activity effects os ochratoxin A production by *Aspergillus* section *Nigri* isolated from grapes. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 28, n. 1, p. 72-77, 2004.

BENNETT, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins, **Clinical Microbiology Review**, Washington, v. 16, n. 3, p. 497-516, July 2003.

BERG, T. How to establish international limits for mycotoxins in food and feed?. **Food Control**, Oxford, v. 14, n. 4, p. 219-224, June 2003.

BLANC, M.; PITTET, A.; MUÑOZ-BOX, R.; VIANI, R. Behavior of Ochratoxin A during Green Coffee Roasting and soluble Coffee Manufacture. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 46, n. 3, p. 673-675, Mar. 1998.

BORÉM, F. B.; RIBEIRO, R. C. M. S.; CORRÊA, P. C.; PEREIRA, R. G. F. A. Propriedades térmicas de cinco variedades de café cereja descascado. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, Campina Grande, v. 6, n. 3, p. 475-480, set./dez. 2002.

BRANDO, C. H. J. Cereja descascado, desmucilado, fermentado, despulpado ou lavado?. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISA CAFEEIRA 25., 1999, Franca. Resumo... Rio de Janeiro: MIC/IBC, 1999. p. 342-346.

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

BUCHELI, P.; MEYER, I.; PITTET, A.; VUATAZ, G.; VIANI, R. Industrial storage of green robusta under tropical conditions and its impact on raw material quality and ochratoxin A content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, v. 46, n. 11, p. 4507-4511, Nov. 1998.

BUCHELI, P.; MEYER, I.; PITTET, A.; VUATAZ, G.; VIANI, R. Development of ochratoxin A during robusta (*Coffea canephora*) coffee cherry drying. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, v. 48, n. 4, p. 1358-1362, Apr. 2000.

BULLERMAN, L. B.; SCHROEDER, L. L.; PARK, K. Y. Formation and Control of Mycotoxins in Food. *Journal of Food Protection*, Des Moines, v. 47, n. 8, p. 637-646, Aug. 1984.

CABAÑES, F. J.; ACCENSI, F.; BRAGULAT, M. R.; ABARCA, M. L.; CASTELLÁ, G.; MINGUEZ, S.; PONS, A. What is source of ochratoxin A in wine?. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v. 79, n. 3, p. 213-215, Dec. 2002.

CAMARGO, A. P. O clima e a cafeicultura no Brasil. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, v. 11, n. 126, p. 13-25, jun. 1985.

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

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

CHALFOUN, S. M.; BATISTA, L. R. Fungos associados a frutos e grãos de café – *Aspergillus & Penicillium*. EMBRAPA, 2003. 69 p.

CHALFOUN, S. M.; CARVALHO, V. D. Cafeicultura empresarial: produtividade e qualidade – colheita e preparo do café. Lavras: UFLA/FAEPE, 1998. 55 p.

CHALFOUN, S. M.; CARVALHO, V. D. Microflora associada a frutos e grãos de café de diferentes locais, tipos de colheita e diferentes etapas de preparo. Ano 1: 1987. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISA CAFEIEIRA 15., 1989, Maringá. Resumo... Rio de Janeiro: MIC/IBC, 1989. p. 17-21.

CHRISTENSEN, M. The *Aspergillus ochraceus* Group: Two new species from western soils and a synoptic key, *Mycologia*, Bronx, v. 74, n. 2, p. 210-225, 1982.

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

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

CORTEZ, J. G. Aptidão climática para a qualidade da bebida nas principais regiões cafeeiras de Minas Gerais. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 18, n. 187, p. 27-31, 1997

COSTA, J. M. N.; ANTUNES, F. Z.; SANTANA, D. P. Zoneamento agroclimático e planejamento agrícola. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 12, n. 138, p. 14-17, jun. 1996.

CREPPY, E. E. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicology Letters*, Clare, v. 127, n. 1/3, p. 19-28, Feb. 2002.

DIAS, M. C. L. L.; BARROS, A. S. R. Avaliação de métodos para remoção da mucilagem de semente de café (*Coffea arabica* L.). *Revista Brasileira de Sementes*, Brasília, v. 15, n. 2, p. 191-195, 1993.

EC (European Commission) Commission Regulation (EC)n. 472/2002 de 12 de março de 2002 **Official Journal of the European Communities**, 16/03/2002.

EVANGELISTA, A. W. P.; CARVALHO, L. G.; SEDIYAMA, G. C. Zoneamento climático associado ao potencial produtivo da cultura do café no Estado de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 6, n. 3, p. 445-452, set./dez. 2002.

FILTENBORG, O.; FRISVAD, J. C.; THRANE, U. Moulds in food spoilage. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 33, n. 1, p. 85-102, Nov. 1996.

FLORIANI, C. G. Café - a certificação é o caminho. **Agro Técnico, Caderno Técnico - IMA**, Belo Horizonte, n. 4, p. 36, 2002.

FREITAS, R. F. Fungos Associados a Grãos de café (*Coffea arabica* L.) beneficiado em Diversos Municípios da Região Sul de Minas Gerais. 2000. 72 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. *Neopetromyces* gen. nov. and an overview of teleomorphs of *Aspergillus* subgenus *Circumdati*. In: SEIFERT, K. A.; GAMS, W.; CROUS, P. W.; SAMUELS, G. J. (Ed.). **Studies in Mycology - Molecular, morphology and classification: towards monophyletic genera in the Ascomycetes**. Ed CBS, 2000. v. 45, p. 201-207.

HARRIS, J. P.; MANTLE, P. G. Biosynthesis of ochratoxins by *Aspergillus ochraceus*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 58, n. 5, p. 709-716, Nov. 2001.
HEENAN, C. N.; SHAW, K. J.; PITT, J. I. Ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* isolates and detection using coconut cream Ágar. **Journal of Food Mycology**, Oxford, v. 1, p. 67-72, 1998

HEILMANN, W.; REHFELDT, A. G.; ROTZOLL, F. Behaviour and reduction of ochratoxin A in green coffee beans in response to various processing methods. **European Food Research Technology**, New York, v. 209, n. 3/4, p. 297-300, 1999.

HESELTINE, C. W.; VANDERGRAFT, E. E.; FENNELL, D. I.; SMITH, M. L.; SHOTWELL, O. L. *Aspergilli* as ochratoxin Producers. **Mycologia**, Bronx, v. 64, n. 3, p. 539-550, 1972.

HÖHLER, D. Ochratoxin A in food and feed: occurrence, legislation and mode of action. *Zeitschrift für Ernährungswissenschaft*, Darmstadt, v. 37, n. 1, p. 2-12, Mar. 1998.

HSIEH, D. P. H. Mode of action of mycotoxin. In: KROGJ, P. (Ed.). *Mycotoxins in food*. Ed. Academic Press, 1987. p. 149-176.

HUFF, W. E.; HAMILTON, P. B. Mycotoxins – their biosynthesis in fungi: Ochratoxins – metabolites of combined pathways. *Journal of Food Protection*, Des Moines, v. 42, n. 10, p. 815-820, Oct. 1979.

IAMANAKA, B. T.; TANIWAKI, M. H. Ocorrência de ocratoxina A em café cru, café torrado e moído e café solúvel brasileiro. In: SIMPÓSIO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS – SIMPOCAL, 2., 2003. *Anais...* 2003.

IARC, Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Humans. Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic and Mycotoxins. v. 56, p. 489-521. 1993.

IBGE, PAM - Produção Agrícola Municipal 2002 Valor da produção dos principais produtos das lavouras permanentes, segundo as mesorregiões, microrregiões e os municípios de Minas Gerais. 2002.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS - ICMSF. Toxigenic fungi: *Aspergillus*. In: *Microorganisms in foods: characteristics of food pathogens*. London: Blakie Academic and Professional, 1996. p. 341-381.

JOOSTEN, H. M. L. J.; GOETZ, J.; PITTET, A.; SCHELLENBERG, M.; BUCHELL, P. Production of ochratoxin A by *Aspergillus carbonarius* on coffee cherries *International Journal of Food Microbiology*, v. 65, p. 39-44, 2001.

KLICH, M. A. Biogeography of *Aspergillus* species in soil and litter. *Mycologia*, Bronx, v. 94, n. 1, p. 21-27, Jan./Feb. 2002.

KOZAKIEWICZ, Z. *Aspergillus* species on stored products. CABI, 1989. 188p (Mycological Papers, 161).

KRUG, H. P. Cafés Duros, III. Relação entre porcentagem de microrganismos e qualidade do café. *Revista do Instituto de Café*, São Paulo, v. 26, n. 169, p. 1827-1831, mar. 1940.

LACEY, J. Pre-and post-harvest ecology of fungi causing spoilage of foods and other stored products. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, n. 18, p. 11S-25S, 1989. Supplement.

LEVI, C. P.; TRENK, H. L.; MOHR, H. K. Study of the occurrence of ochratoxin A in green coffee beans. **Journal of the Association Official Analytical Chemists**, Washington, v. 57, n. 4, p. 866-870, Apr. 1974.

LEONI, L. A. B.; FURLANI, R. P. Z.; VALENTE-SOARES, L. M.; OLIVEIRA, P. L. C. Ochratoxin A in brazilian green coffee. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 21, n. 1, p. 105-107, jan./abr. 2001.

LÓPEZ GARAY, C.; BATUTISTA ROMERO, E.; MORENO GONZÁLEZ, E. Microflora of the stored coffee and its influence on quality. **ASIC**, 12^a Colloque, Montreux, 1987. p. 758-770.

MANTLE, P. G. Risk assessment and the importance of ochratoxins. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Oxford, v. 50, n. 3/4, p. 143-146, 2002.

MANTLE, P. G.; CHOW, A. M. Ochratoxin formation in *Aspergillus ochraceus* with particular reference to spoilage of coffee **International Journal fo Food Microbiology**, Amsterdam, v. 56, n. 1, p. 105-109, May 2000.

MATIELLO, J. B. **O Café: do cultivo ao consumo**. Ed. Globo, 1991. 320 p.

MEIRELES, 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. 71 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

MICCO, M.; GROSSI, M.; MIRAGLIA, M.; BRERA, C. A study of the contamination by ochratoxin A of green e roasted coffee beans. **Food Additives and Contaminants**, Hants, v. 6, n. 3, p. 333-339, July/Sept. 1989.

MITCHELL, D.; PARRA, R.; ALDRED, D.; MAGAN, N. Water and temperature relations of growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* strains grapes in Europe and Israel. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 97, n. 2, p. 439-445, 2004.

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

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**, Washington, v. 51, n. 19, p. 5824-5828, Sept. 2004.

MOSS, M. O. Mode of formation of ochratoxin A. **Food Additive and Contaminants**, Oxford, v. 13, p. 5-9, 1996. Supplement.

MÜHLENCOERT E. Ochratoxin A Production by *Aspergillus ochraceus*
Doctoral Thesis Technischen Universität München Fakultät
Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt
Freising 2003 disponível on line <http://tumb1.biblio.tu-muenchen.de/publ/diss/ww/2004/muehlencoert.pdf> em 17/12/2004

MÜHLENCOERT, E.; MAYER, I.; ZAPF, M. W.; VOGEL, R. F.; NIESSEN, L. Production of ochratoxin A by *Aspergillus ochraceus*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 110, n. 5/6, p. 651-659, June 2004.

NAKAJIMA, M.; TSUBOUCHI, H.; MIYABE, M.; UENO, Y. Survey of Aflatoxin B 1 and Ochratoxin A in commercial green coffee beans by high-performance liquid chromatography linked with immunoaffinity chromatography. **Food and Agricultural Immunology**, Oxon, v. 9, n. 2, p. 77-83, June 1997.

NASSER, P. P. **Influência da separação de grãos de café (*Coffea arabica* L.) por tamanho na qualidade e ocorrência de ocratoxina A.** 2001. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG

O'CALLAGHAN, J.; CADDICK, M. X.; DOBSON, D. W. A polyketide synthase gene required for ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus ochraceus*. **Microbiology**, Reading, v. 149, n. 12, p. 3485-3491, Dec. 2003.

PASIN, L. A. A. P.; ABREU, M. S. Fungos associados a grãos crus e ocorrência de ocratoxina A em diferentes cultivares de café. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 1., 2002, Anais... 2002. p. 1028-1031.

PERAICA, M.; RADIC, B.; LUCIC, A.; PAVLOVIC. Efectos tóxicos de las micotoxinas en el ser humano. **Boletín de la Organización Mundial de la Salud**, Rome, n. 2, p. 80-92, 2000.

PETERSON, S. W. Phylogenetic relationships in *Aspergillus* based on rDNA sequence analysis. In: **SAMSON, R. A.; PITT, J. I. (Ed.).** **Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus*.** Amsterdam, Netherlands: Harwood Academic Publishers, 2000. p. 323-355.

PETZINGER, E., WEIDENBACH, A. Mycotoxins in the food chain: the role of ochratoxins. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v.76, p.245-250, Sept. 2002.

PIÑEIRO, M. S. Diferenciación entre hongos toxicogénicos y atoxicogénicos. In: **SOCIEDADE LATINO AMERICANA DE MICOTOXICOLOGIA MICOTOXINAS - PERSPECTIVAS LATINOAMERICANAS**, 1996, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: UFRRJ, 1996. p. 28-31

PITT, J. I. Toxigenic fungi: which are important. **Medical Mycology**, Oxford, v. 38, p. 17-22, 2000. Supplement 1.

PITT, J. I.; BASÍLICO, J. C.; ABARCA, M. L.; LÓPEZ, C. Mycotoxins and toxigenic fungi. **Medical mycology**, Oxford, v. 38, p. 41-46, 2000a. Supplement 1.

PITT, J. I.; SAMSON, R. A.; FRISVAD, J. C. List of accepted species and their synonyms in the family Trichocomaceae In: **SAMSON, R. A.; PITT, J. I. (Ed.).** **Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus*.** Amsterdam, Netherlands: Harwood Academic Publishers, 2000b. p. 9-49.

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

PRADO, E.; MARÍN, S.; RAMOS, A. J.; SANCHIS, V. Occurrence of ochratoxigenic fungi and ochratoxina A in green coffee from different origins. **Food Science and Technology International**, London, v. 10, n. 1, p. 45-49, Feb. 2004

RAPER, K. B.; FENNELL, D. I. **The Genus *Aspergillus***. Baltimore: Williams and Wilkins, 1965.

RIZZO, A.; ESKOLA, M.; ATROSHI, F. Ochratoxin A in cereals, foodstuffs and human plasma. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 108, n. 7, p. 631-637, Sept. 2002.

ROBLEDO, A. L.; MARÍN, S.; RAMOS, A. J. Contaminación natural con micotoxinas en maíz forrajero y granos de café verde en el Estado de Nayarit (México). **Revista Iberoamericana de Micología**, Barcelona, v. 18, p. 141-144, 2001.

RODRÍGUEZ-AMAYA, D. B.; SABINO, M. Mycotoxin research in Brazil: the last decade in review. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 33, p. 1-11, Jan./Mar. 2002.

ROMANI, S.; SACCHETTI, G.; LÓPEZ, C. C.; PINNAVAIA, G. C.; ROSA, M. D. Screening on the occurrence of ochratoxin A in green coffee beans of different origins and types. **Journal Agriculture Food Chemistry**, Washington, v. 48, n. 8, p. 3616-3619, Aug. 2000.

ROMANI, S.; PINNAVAIA, G. C.; ROSA, M. D. Influence of roasting levels on ochratoxin A content in coffee. **Journal Agriculture Food Chemistry**, Washington, v. 51, n. 17, p. 5168-5171, Aug. 2003.

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

SAMSON, R. A. Current Systematics of the Genus *Aspergillus*. In: POWELL, K. A.; RENWICK, A.; PEBERDY, J. F. (Ed.). **The genus *Aspergillus* – from taxonomy and fenetics to industrial application**. Plenum Press, 1994a. p. 261-266. (FEMS Symposium, n. 69).

SANSOM, R. A. Taxonomy - Current Concepts of *Aspergillus* Systematics, In: SMITH, J. E. (Ed.). **Biotechnology handbook 7 – *Aspergillus***. New York: Plenum Publishing Corporation, 1994b. p. 1-18.

SAMSON, R. A.; HOEKSTRA, E. S.; FRISVAD.; J. C.; FILTENBORG, O. **Introduction to food-borne fungi**. 4. ed. Centraalbureau Voor Schimmelcultures Baarn Delft, 2000.

SCHMIDT, H.; BANNIER, M.; VOGEL, R. F.; NIESSEN, L. Detection and quantification of *Aspergillus ochraceus* in green coffee by PCR. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 38, n. 6, p. 464-469, 2004.

SCHUSTER, E.; DUNN-COLEMAN, N.; FRISVAD, J. C.; van DIJCK, P. W. M. On the safety of *Aspergillus niger* – a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 59, n. 4/5, p. 426-435, Aug. 2002.

SEIFERT, K. A.; LÉVESQUE, C. A. Phylogeny and molecular diagnosis of mycotoxigenic fungi. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 110, n. 5/6, p. 449-471, June 2004.

SIDHU, G. S. Mycotoxin genetics and gene clusters. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 108, n. 7, p. 705-711, Sept. 2002.

SILVA, C. F. **Sucessão microbiana e caracterização enzimática da microbiocratoxina A associada aos frutos e grãos de café (*Coffea arabica* L.) do município de Lavras-MG.** 2004. 156 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SILVA, C. F.; SCHWAN, R. F.; DIAS, E. S.; WHEALS, A. E. Microbial diversity during maturation and natural processing of coffee cherries of *Coffea arabica* L in Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, 60, n. 2/3, p. 251-260, Sept. 2000

SILVA, L. F.; CORTEZ, J. G. A qualidade do Café no Brasil: Histórico e Perspectivas. **Caderno de Ciência & Tecnologia**, Brasília, v. 15, n. 1, p. 65-91, jan./abr. 1998.

SOUZA et al. In: SBSR, 11., 2003, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: INPE, 2003. p. 239-246.

SOUZA, S. M. C. **O café (*Coffea arabica* L.) na região sul de Minas Gerais – Relação da qualidade com fatores ambientais, estruturais e tecnológicos.** 1996. 171 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

STEGEN, G. V. D.; JÖRISSSEN, U.; PITTET, A.; SACCON, M.; STEINER, W.; VINCENZI, M.; WINKLER, M.; ZAPP, J.; SCHLATTER, C. H. R. Screening of European coffee final products for occurrence of ochratoxin A

(OCRATOXINA A). **Food Additives and Contaminants**, Hants, v. 14, n. 3, p. 211-216, Apr. 1997.

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

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

SUÁREZ-QUIROZ, M. L.; GONZÁLEZ-RIOS, O.; BAREL, M.; GUYOT, B.; SCHORR-GALINDO, S.; GUIRAUD, J. P. Study of ochratoxin A-producing strains in coffee processing. **International Journal of Food and Technology**, Oxford, v. 39, n. 5, p. 501-507, May 2004a.

SUÁREZ-QUIROZ, M. L.; GONZÁLEZ-RIOS, O.; BAREL, M.; GUYOT, B.; SCHORR-GALINDO, S.; GUIRAUD, J. P. Effect of chemical and environmental factors on *Aspergillus ochraceus* growth and toxigenesis in green coffee. **Food Microbiology**, London, v. 21, n. 6, p. 629-634, Dec. 2004b.

SWEENEY, M.; J.; DOBSON, A. D. W. Molecular biology of mycotoxin biosynthesis. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 175, n. 2, p. 149-163, June 1999.

TANIWAKI, M. H.; BANHE, A. A.; IAMANAKA, B. T. Incidência de Fungos em café. In: SEMINARIO INTERNACIONAL SOBRE BIOTECNOLOGIA NA AGROINDÚSTRIA CAFEEIRA, 3., 2000, Londrina. **Programas e resumos...** Londrina: IAPAR/IRD, 2000. p. 85.

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 of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 82, n. 2, p. 173-179, Apr. 2003.

TÉREN, J.; VARGA, J.; HAMARI, Z.; RINYU, E.; KEVEL, F. Immunochemical detection of ochratoxin A in black *Aspergillus* strains. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 134, n. 3, p. 171-176, 1996.

TRUCKSESS, M. W.; GILER, J.; YOUNG, K.; WHITE, K. D.; PAGE, S. W. Determination and survey of ochratoxin A in wheat, barley and coffee-1997.

Journal of the Association of Official Analytical Chemists, Washington, v. 82, n. 1, p. 85-89, Jan. 1999.

TRUCKSESS, M. W. Committee on Natural Toxins - Mycotoxins. Journal of the Association of Official Analytical Chemists, Washington, v. 82, n. 2, p. 488-495, Feb. 1999.

TSUBOUCHI, H.; YAMAMOTO, K.; HISADA, K.; SAKABE, Y. A Survey occurrence of mycotoxins and toxigenic fungi in imported green coffee beans. Proceedings of the Japanese Association of Mycotoxicology, Tokyo, n. 19, p. 16-21, 1984.

TSUBOUCHI, H.; YAMAMOTO, K.; HISADA, K.; SAKABE, Y.; UDAGAWA, S. Effect of roasting on ochratoxin A level in green coffee beans inoculated with *Aspergillus ochraceus*. Mycopathologia, Dordrecht, v. 97, n. 2, p. 111-115, Feb. 1987.

URBANO, G. R.; TANIWAKI, M. H.; LEITÃO, M. F. E.; VICENTINI, M. C. Occurrence of ochratoxin A-producing fungi in raw brazilian coffee. Journal of Food Protection, Des Moines, v. 64, n. 8, p. 1226-1230, Aug. 2001.

van der MERWE, K. J.; STEYN, P. S.; FOURIE, L.; SCOTT, D. B.; THERON, J. J. Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. Nature, London, v. 205, n. 4976, p. 1112-1113, 1965.

Van EGMOND, H. P. Worldwide regulations for mycotoxins. In: DEVRIES, J. W.; TRUCKSESS, M. W.; JACKSON, L. S. (Ed.). *Advanced in experimental medicine and biology*. 2000. v. 504, p. 257-269.

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

VARGA, J.; KEVEL, E.; HAMARI, Z.; TÓTH, B.; TÉREN, J.; CROFT, J. H.; KOZAKIEWICZ, Z.; Genotypic and Phenotypic variability among black *Aspergilli*. In: SAMSON, R. A.; PITT, J. I. (Ed.). *Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus. Amsterdam, Netherlands: Ed Harwood Academic Publishers, 2000a. p. 397-411.**

VARGA, J.; KEVEL, E.; TÓTH, B.; KOZAKIEWICZ, Z.; HOEKSTRA, R. F. Molecular analysis of variability within the toxigenic *Aspergillus ochraceus*

species. **Canadian Journal Microbiology**, Montreal, v. 46, n. 7, p. 593-599, July 2000b.

VARGA, J.; RIGÓ, K.; TÓTH, TÉREN, J.; KOZAKIEWICZ, Z.; Evolutionary Relationships among *Aspergillus* species producing economically important mycotoxins. **Food Technology and Biotechnology**, Zagreb, v. 41, n. 1, p. 29-36, Jan./Mar. 2003.

VARGA, J. JUHÁSZ, A.; KEVEL, F.; KOZAKIEWICZ, Z. Molecular diversity of agriculturally important *Aspergillus* species. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 110, n. 5/6, p. 627-640, June 2004.

VARGA, J.; KEVEL, F.; FEKETE, C.; COENEN, A.; KOZAKIEWICZ, Z.; CROFT, J. H. Restriction fragment length polymorphisms in the mitochondrial DNAs of the *Aspergillus niger* aggregate. **Mycological Research**, New York, v. 97, n. 10, p. 1207-1212, Oct. 1993.

VERSTRATE, F. Regulating OCHRATOXINA A in coffee in the European Union. In: WORKSHOP - OCHRATOXINA A EM CAFÉ, 2004, Belo Horizonte. **Palestra...** Belo Horizonte, 2004.

VIANI, R. Effect of processing on ochratoxin A (OCHRATOXINA A) content of coffee. In: DEVRIES, J. W.; TRUCKSESS, M. W.; JACKSON, L. S. (Ed.). **Advanced in experimental medicine and biology**. 2002. v. 504, p. 189-193.

WALKER, R. Risk assessment of ochratoxin: current views of the European Scientific Committee of Food, the JECFA and the Codex Committee on Food Additives and Contaminants. In: DEVRIES, J. W.; TRUCKSESS, M. W.; JACKSON, L. S. (Ed.). **Advanced in experimental medicine and biology**. 2002. v. 504, p. 189-249-255.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **Safety evaluation of certain mycotoxin in food**. Rome, 2001. p. 281-416. WHO Food Additives Serie 47 and FAO Food and Nutrition Paper 74. Prepared by the Fifty-fifth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives.

WILSON, D. M.; MUBATANHEMA, W.; JURJEVIC, Z. Biology and ecology of mycotoxigenic *Aspergillus* species as related to economic and health concerns. In: DEVRIES, J. W.; TRUCKSESS, M. W.; JACKSON, L. S. (Ed.). **Advanced in Experimental Medicine and Biology**. 2000. v. 504, p. 3-17.

WOSIACKI, G. Enzimas pectinolíticas de *Fusarium oxysporum* Schlecht EX. Fr. Isolado de frutos de café. 1977. 73 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade de Campinas, Campinas.

CAPÍTULO 2

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS TOXIGÊNICOS EM FRUTOS E GRÃOS DE CAFÉ.

RESUMO

BATISTA, L. R. Isolamento e identificação de fungos toxigênicos em frutos e grãos de café. In: _____. **Incidência de Fungos Produtores de Ocratoxina A em Grãos de Café (*Coffea arabica* L.) pré-processados por Via Seca e Úmida** 2005. p 77-130. (Tese de Doutorado em Ciência do Alimento) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

Com o objetivo de estudar a incidência de fungos produtores de ocratoxina A em amostras de grãos de café, procedeu-se ao isolamento e identificação de fungos do gênero *Aspergillus* Seção *Circundati* e Seção *Nigri*, bem como a avaliação do potencial toxigênico dos isolados identificados. Foram analisadas 127 amostras coletadas em 10 municípios do sul de Minas Gerais. As frações coletadas foram bóia (17), cereja+verde (5), cereja descascado/despulpado (12), mistura (45), varrição (44) e verde (4). Das amostras de frutos e grãos beneficiados constatou-se a contaminação por fungos do gênero *Aspergillus* Seção *Circundati*, em 79,81% e 41,35% respectivamente, ocorrendo assim uma redução significativa na população deste grupo de fungos após o beneficiamento. Em 100% e 86,67% dos frutos das amostras de varrição e bóia respectivamente foi detectada a presença desta comunidade de fungos. Levando em consideração que as amostras de varrição e bóia, foram coletadas em todas as localidades, estes resultados mostram que esta comunidade é comum dentro do ambiente da lavoura de café. Das 8 amostras de frutos/grãos processadas via úmida, 25% dos grãos com pergaminho estavam contaminados com fungos do gênero *Aspergillus* Seção *Circundati*, valores bem abaixo se comparado com as demais frações. Das 12 amostras de grãos 33,33% apresentaram contaminação. Com referência aos fungos do gênero *Aspergillus*, Seção *Nigri*, verificou-se a sua ocorrência em 73,08% dos frutos e 25,20% dos grãos beneficiados. Em 72,73 e 64,71% dos frutos das amostras de varrição e bóia respectivamente, foi detectada a presença destas comunidades de fungos. Levando em consideração que as amostras de varrição e bóia foram coletadas em todas as localidades, estes resultados mostram que esta comunidade também é comum dentro do ambiente da lavoura de café. Das 8 amostras de frutos/grãos processadas via úmida, 62,5% dos grãos com pergaminho estavam contaminados com fungos do gênero *Aspergillus* Seção *Nigri*. Das 12 amostras de grãos analisadas 25% apresentaram contaminação. Dos 178 fungos do gênero *Aspergillus* Seção *Circundati* identificados (165 – *A. ochraceus*; 3 – *A. melleus*; 4 – *A. sulphureus*, 02 – *A. dimorphicus*, 03 – *A. sclerotiorum* e 1 – *A. auricomus*) 85,39% foram produtores de ocratoxina A, sendo que dos isolados de *A.*

ochraceus, 95% foram produtores de ocratoxina A. Das espécies de *Aspergillus* Seção *Nigri*, *A. niger* (58) e *A. foetidus* (25) nenhum foi produtor de ocratoxina A. Das 127 amostras analisadas em 62 (48,82%) destas não foi detectada a presença de ocratoxina A, em 29 (22,83%) as amostras apresentaram níveis de contaminação que variaram de 1,7 a 3,33 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ e em 36 (28,35%) amostras apresentaram contaminação com ocratoxina A acima de 5,0 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de grãos de café. Estes resultados demonstraram que 71,65% das amostras analisadas apresentaram níveis de contaminação de ocratoxina A abaixo de 5,0 $\mu\text{g}/\text{Kg}$. Das 36 amostras contaminadas com ocratoxina A com níveis acima de 5,0 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, 24 foram varrição, 6 bóia e 4 mistura, destas 30 (83,33%) são parcelas já reconhecidas na cafeicultura como parcelas que comprometem a qualidade do café. As amostras contaminadas com ocratoxina A acima de 5,0 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ também apresentaram uma média superior de contaminação com fungos do gênero *Aspergillus* seção *Circumdati* que neste estudo foram consideradas as principais responsáveis pela contaminação de ocratoxina A nas amostras analisadas.

Orientador: Dr^a Sara Maria Chalfoun – EPAMIG

ABSTRACT

BATISTA, L. R. Isolation and identification of toxigenic fungi in fruits and coffee beans. In: _____. **Fungi Ochratoxin A Producing in Coffee Beans (*Coffea arabic* L.) Dried and Wet Processing Method.** 2005.p 77-130. Thesis (Doutorate in Food Science) - Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.

Fungi ochratoxin A producer incidence in coffee beans samples was studied, after isolating and identifying from *Aspergillus* Section *Circumdati* and Section *Nigri*, gender as well as evaluating their toxigenic potentials. Hundred twenty-seven samples from ten south of Minas Gerais locations were analyzed. The collected sample types were boia "overripe dried on tree" (17), cherry+green (5), cherry husked/without pulp (also called imparchment) (12) and mixes of (45), varrição (beans coffee swept from ground) (44) and green (4). From fruits and processed grains, a contamination was observed, by fungi Section *Circumdati* from *Aspergillus* gender, in 79,81% and 41,35% respectively, occurring therefore, a significant population reduction of this group, after processing. In 100 and 86,67% of varrição samples and boia respectively the presence of this fungi was detected. Taking in accounting that, varrição samples and boia were collected at all the places, these result shows that this fungi community is common at the coffee crop environment. From 8-processed humid way fruit/grain, 25% of the grains with parchment were contaminated with fungi of *Aspergillus* Seção *Circumdati* gender, values well below if compared with the other fractions. In 12-grain samples 33,33% presented contamination. Occurrence of fungi from *Aspergillus* gender Section *Nigri*, was verified in 73,08% of fruits and 25,20% of the processed grain. In 72,73 and 64,71% varrição and boia samples respectively, the fungi presence was detected. *Aspergillus ochraceus*; 3 - *Aspergillus melleus*; 4 - *Aspergillus sulphureus*, 02 - *A. dimorphicus*, 03 - *A. sclerotiorum* and 1 - *Aspergillus auricomus*) 85,39% were ochratoxin A producer, and 95% of *Aspergillus ochraceus* isolated, were ochratoxin A producer. In *Aspergillus* species Seção *Nigri*, *Aspergillus niger* (58) and *Aspergillus foetidus* (25) none was ochratoxin A producer. In 62 (48,82%) of the samples the ochratoxin presence was not detected, and in 29 (22,83%) the samples presented contamination levels varying from 1,7 to 3,33 $\mu\text{g/Kg}$ and in 36 (28,35%) samples presented contamination with ochratoxin A above 5,0 $\mu\text{g/Kg}$ of coffee beans. These results demonstrated that 71,65% of the samples presented ochratoxin A contamination at levels below 5,0 $\mu\text{g/Kg}$. In 36 contaminated samples ochratoxin A levels were above

5,0µg/Kg, 24 were from varrição, 6 boia and 4 mixture, of these 30 (83,33%) they were portions already recognized in the coffee growing as portions that commit coffee quality. Ochratoxin A contaminated samples with above 5,0µg/Kg also presented an superior contamination average with *Aspergillus* Section *Circumdati* gender that in this study were the main responsible for ochratoxin A in the samples.

Adviser: Ds Sara Maria Chalfoun – EPAMIG

1 INTRODUÇÃO

A colonização de parte aérea de plantas ocorre logo que as primeiras folhas e/ou flores são expostas ao ar. Normalmente as bactérias colonizam primeiro, mas elas são seguidas por leveduras e, então, por fungos patogênicos e fungos saprófitas (Lacey, 1989). Os fungos continuam se desenvolvendo especialmente na fase de senescência das plantas e amadurecimento das sementes. A colheita rompe o ecossistema e faz a transição de um dinâmico ambiente da lavoura para o relativamente estável ambiente de armazenamento, tudo isto acompanhado por uma profunda mudança na população microbiana (Lacey, 1989).

O desenvolvimento de microrganismos particularmente os fungos, é um dos mais sérios fatores responsáveis pelas perdas pós-colheita, sendo que o desenvolvimento dos fungos pode ser acompanhado pela produção de micotoxinas (Aidoo, 1993). As micotoxinas são metabólitos secundários de fungos filamentosos e são tóxicas ao homem e animais mesmo em pequenas concentrações (Pitt, 2000).

Como nas demais culturas os frutos e grãos de café estão sujeitos à contaminação e, conseqüentemente, à colonização de microrganismos durante todas as fases de desenvolvimento, colheita, preparo, transporte e armazenamento (Batista et al., 2003), vários gêneros de fungos ocorrem sobre os frutos do cafeeiro, desde o campo até o armazenamento, entre eles espécies de *Aspergillus*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Eurotium*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Trichoderma*, *Wallemia* e outros (Bucheli et al., 1998; Carvalho et al., 1997; Chalfoun & Batista, 2003, Joosten et al., 2001; Prado et al., 2004). Dentre estes gêneros estão os principais responsáveis pela presença de micotoxinas em produtos agrícolas, que são *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* (CAST, 2003). Entretanto, o tipo e a quantidade de micotoxinas que um fungo produz

dependem completamente dos parâmetros ecológicos e de processamento de um produto particular (Filtenborg et al., 1996).

A principal micotoxina estudada em café, a ocratoxina A, possui propriedades hepatotóxica, nefrotóxica, carcinogênica e imunossupressiva para animais e, possivelmente, para humanos (Smith & Ross, 1991; Xiao et al., 1996), sendo que, no café, estudos têm mostrado que ela é produzida principalmente por *Aspergillus ochraceus* e espécies relacionadas, *Aspergillus carbonarius*, e raramente por *Aspergillus niger* (Chalfoun & Batista, 2003; Joosten et al., 2001; Prado et al., 2004; Suárez-Quiroz et al., 2004).

A incidência dos fungos em produtos agrícolas varia com o tipo de grão, as condições climáticas e a qualidade do processamento durante a colheita, transporte e armazenamento. De particular significância é o fato de que as micotoxinas são raramente uniformemente distribuídas em um lote de grão, ocorrendo normalmente desigual e irregularmente (Smith & Cuero, 1986). Da mesma forma, ainda não foi possível traçar uma correlação entre presença de fungos toxigênicos e níveis de contaminação com ocratoxina A em grãos de café. Segundo Filtenborg et al. (1996), a prevenção da deterioração e produção de micotoxinas em alimentos só ocorrerá com sucesso quando tais espécies forem conhecidas.

Vários estudos têm avaliado a incidência de fungos toxigênicos em frutos e grãos de café, mas avaliações durante o processo produtivo e de preparo do café ainda são raras.

Este estudo teve como objetivo identificar fungos toxigênicos nas diferentes frações de café desde a lavoura até os originados dos pré-processamentos via seca e via úmida em municípios localizados na região sul do estado de Minas Gerais, bem como avaliar quais amostras apresentam maior e/ou menor risco de contaminação com ocratoxina A devido à presença de fungos produtores desta toxina.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Caracterização e localização das áreas em estudo

O levantamento foi efetuado em até 5 propriedades, de cada um dos 10 municípios produtores, sendo coletadas amostras em Boa Esperança, Campestre, Campos Gerais, Carmo do Rio Claro, Cássia, Guaxupé, Machado, Monte Santo de Minas, Poços de Caldas e São Sebastião do Paraíso.

As frações coletadas foram bóia (17), cereja+verde (5), cereja descascado/despulpado (12), mistura (45), varrição (44) e verde (4). Das 127 amostras analisadas, em 104 foram analisadas os frutos e os respectivos grãos e em 23 amostras apenas os grãos, pois estas já foram coletadas beneficiadas nas localidades.

Dados sobre as propriedades, o pré-processamento e as características das amostras foram coletados através da aplicação de questionários (anexo B). Foram coletados aproximadamente 5 a 6 Kg de todas as frações presentes na propriedade por ocasião da aplicação dos questionários. As amostras foram coletadas de forma aleatória em vários pontos em que se encontravam, como terreiro, tulha, cafezal e sacos, de forma que se obtivessem amostras mais homogêneas possível.

As amostras foram transferidas para a EPAMIG, Centro Tecnológico do Sul de Minas Gerais para avaliação microbiológica dos frutos. Após serem secas em estufa a $40\pm 2^{\circ}\text{C}$, até um teor de umidade de 11 a 12%, foram realizados o beneficiamento e a análise microbiológica dos grãos. Aproximadamente 2,5Kg da amostra beneficiada foram enviados para o Laboratório de Controle de Qualidade e Segurança Alimentar/LACQSA do Ministério da Agricultura, no qual foi realizada a Análise de ocratoxina A.

O nível de ocratoxina A nas amostras foi avaliado através do método CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência).

2.2 Isolamento e identificação dos fungos

Para o isolamento dos fungos associados a frutos e grãos de café beneficiado, foi utilizada a técnica de plaqueamento direto. A metodologia faz parte do projeto da FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) intitulado *Enhancement of coffee quality through prevention of mould formation*, conforme Pereira et al. (2003).

De cada amostra foram coletados 100 frutos ou grãos de café ao acaso, nos quais foi realizada uma desinfestação com hipoclorito de sódio a 1% visando a identificação dos fungos presentes no interior dos frutos/grãos.

Durante o processo de desinfestação, inicialmente foi feita uma imersão das amostras em álcool 70% para fazer uma primeira desinfecção superficial e diminuir a tensão superficial do grão, permitindo o melhor contato entre a solução de hipoclorito e os frutos/grãos. Num segundo momento, as amostras de café foram imersas na solução de hipoclorito de sódio a 1% durante 30 segundos, sendo utilizada uma solução de hipoclorito de sódio para cada amostra analisada. Como último passo da desinfecção, as amostras foram lavadas por três vezes com água destilada e esterilizada com a finalidade de retirar resíduos de hipoclorito de sódio.

Após a desinfestação, os 100 frutos/grãos foram transferidos assepticamente para as placas de Petri de vidro com 13 cm de diâmetro, contendo meio de cultura Dicloran Glicerol 18% (DG18 – Glucose 10g; Peptona 5,0g, KH_2PO_4 1,0g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5g; Glicerol 178,0g; Ágar 15,0g; Cloranfenicol 100,0mg; Água destilada 1L e Dicloran 1ml de uma solução 0,2% peso/volume em etanol). Em cada placa foram colocados vinte e cinco frutos/grãos de cada amostra os quais foram incubados a 25°C por 8 a 12 dias.

O isolamento dos fungos foi realizado com o auxílio de palitos de madeira esterilizados em autoclave (20 min a 121^oC), transferindo-os com um leve toque na cabeça conidial dos fungos, que cresceram na superfície do fruto/grão, para uma placa de Petri contendo Malte Ágar (MA-Extrato de Malte 20g, Ágar 20g e Água destilada 1L), os quais foram repicados sucessivamente até a obtenção de culturas puras.

A partir das culturas puras, as espécies do gênero *Aspergillus* Seção *Circumdati* foram identificadas de acordo com Christensen (1981) e as espécies da Seção *Flavi*, de acordo com Christensen (1982). As espécies da Seção *Nigri*, *Nidulantes*, *Fumigati*, *Versicolores* e *Usti* foram identificadas de acordo com Klich (2002a), sendo estas identificações amparadas por Raper & Fennell (1965), e Pitt & Hocking (1997) e Sansom et al. (2000).

A identificação das espécies do gênero *Penicillium* foi realizada de acordo com Pitt (2000), as espécies do gênero *Fusarium* foi identificada de acordo com Nelson et al. (1983). E as do gênero *Cladosporium* foram identificadas de acordo com Samson et al. (2000).

2.2.1 Identificação de fungos filamentosos do gênero *Aspergillus*

Com o isolamento feito em meio MA, as colônias dos fungos apresentam características morfológicas que possibilitam fazer um direcionamento dos meios de cultura que devem ser utilizados de acordo com o provável Subgênero/Seção. Para os isolados que permaneceram em dúvida, foi preparada uma lâmina, corada e observada ao microscópio.

Todos os isolados foram incubados em meio CYA – Czapek Yeast Ágar (K₂HPO₄ 1.0g; Concentrado Czapek 10.0ml; Extrato de Levedura, 5.0g, Ágar 15.0g, Água Destilada 1Litro; Concentrado Czapek NaNO₃ 30.0g, KCl 5.0g, MgSO₄.7H₂O, 5.0g, FeSO₄.7H₂O 0.1g, ZnSO₄.7H₂O 0.1g, CuSO₄.5H₂O 0.05g, Água Destilada 100ml) e MEA (Extrato de Malte 20.0g, Peptona 1.0g, Glucose

30.0g, Ágar 20g, Água Destilada 1 Litro) a 25°C e CYA a 37°C e após 7 dias de incubação foram observadas as características microscópicas e macroscópicas descritas por Klich (2002a).

Características macroscópicas: coloração (massa conidial) e diâmetro das colônias, presença ou ausência e coloração dos escleródios e coloração no reverso das colônias, em todos os meios de cultura.

Características microscópicas: o arranjo entre métulas e fiálides ligadas à vesícula (esterigma bisseriada: presença de métulas ligadas à vesícula e as fiálides ligadas à métula ou esterigma monosseriada: fiálides inseridas direto na vesícula), comprimento do conidióforo, forma e tamanho dos conídios, vesículas, métulas e fiálides, textura dos conídios e do conidióforo, presença ou ausência de células Hülle.

2.3 Determinação da produção de ocratoxina A por fungos pelo método Plug Ágar.

Os isolados testados foram inoculados em meio YES – Yeast Extract Sucrose Ágar (Extrato de Levedura – 20.0g, Sacarose – 150.0g, Ágar – 20.0g, MgSO₄.7H₂O – 0.5g, Água Destilada – 1 Litro) com solução metálica por 7 dias a 25 – 26 °C. O tempo de incubação para a detecção da produção de micotoxina pela técnica de Plug Ágar é de cinco dias, a uma temperatura de 25 °C (Filtenborg & Frisvad, 1980).

Um corte circular de aproximadamente 0,5 cm do micélio do fungo com ágar foi colocado sobre uma placa de CCD (Merk-Sílica Gel 60, 20x20) previamente ativada, junto com o micélio dos demais isolados, um ao lado do outro, com 1,5 cm de distância. Ao lado do último micélio foi feita a aplicação do padrão da ocratoxina A. O micélio foi então retirado e após 15 minutos foi feita a eluição em cuba de vidro, utilizando como fase móvel TEF-Tolueno Acetato de Etila e Ácido Fórmico 90% (50:40:10).

Este método conta com o fato de que muitas micotoxinas são extracelulares, difundindo-se no substrato. A toxina é transferida para a placa de CCD pelo micélio do fungo colocado diretamente sobre a placa (Filténborg & Frisvad, 1980).

Após a eluição, as placas foram secas em capela pelo fluxo de ar. A confirmação quanto a produção das micotoxinas foi feita em luz ultravioleta com λ 366nm em cromatovisor CAMAG (UF-BETRACHTER).

Os isolados considerados produtores de ocratoxina A apresentaram um RF (fator de retenção) e um spot de fluorescência semelhantes aos do padrão da ocratoxina A

2.4 Análise de Ocratoxina A em Grãos de Café

As análises de ocratoxina A foram realizadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) no Laboratório de Controle de Qualidade e Segurança Alimentar/LACQSA em Belo Horizonte. Conforme Diário Oficial da União n.62, Seção 1, p.37 de 30 de março de 2000.

Extração:

Pesaram-se 25g da amostra, à temperatura ambiente, os quais foram adicionados 200ml de metanol-bicarbonato de sódio 3% (1:1) e agitado por 5 minutos em agitador mecânico.

Foram feitas duas filtrações uma em papel Whatman 4 e outra em papel de filtro GB/ β de microfibras de vidro em pressão reduzida. Quatro mililitros do segundo filtrado foram transferidos para um balão de 100 ml contendo PBS.

Purificação:

A purificação foi feita em colunas de imunoafinidade (ochratest-Vicam) através de um fluxo de 2-3 ml/min. As amostras foram concentradas e ressuspensas em 300 μ L da fase móvel (metanol:acetonitrila:água:ácido

acético – 35:35:29:1, v/v/v/v), agitadas em ultra-som e injetadas no Cromatógrafo Líquido.

Quantificação por CLAE:

Condições do equipamento: Cromatógrafo Líquido em coluna Shimpack C18 CLC ODS (M) 250x4,6mm, como fase móvel acetonitrila:metanol:água:ácido acético (35:35:29:1, v/v/v/v) com fluxo de 0,8mL/min, detector de fluorescência com excitação em 332 nm e emissão em 476nm. O limite de detecção do método é de 0,12µg/Kg e o limite de quantificação é de 0,20 µg/Kg.

Confirmação

A confirmação foi realizada com solução metanólica de BF3 (14%), em que foi observado um aumento no tempo de retenção das amostras devido à derivatização da ocratoxina A.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 127 amostras analisadas conforme Tabela 1, em 104 foram analisados os frutos e os grãos e em 23 amostras, apenas os grãos, pois estas já foram coletadas beneficiadas nas localidades.

Das amostras analisadas, 99,2% apresentaram contaminação com algum dos gêneros de fungos analisados, sendo identificados os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Eurotium* e *Cladosporium*. Estes gêneros têm sido frequentemente encontrados em frutos e grãos de café em diferentes tipos de pré-processamento e após o beneficiamento, *Aspergillus* (Alves, 1996; Batista et al., 2003; Bitancourt, 1957; López-Garay et al., 1987; Meirelles, 1990; Mislivec et al., 1983; Pasin et al., 2002; Pereira, 2002; Silva et al., 2000; Silva, 2004; Wosiacki, 1977), *Fusarium* (Alves, 1996; Bitancourt, 1957; Chalfoun et al., 1992; Krug, 1940; Meirelles, 1990; Pasin et al., 2002; Pereira, 2002; Resende, 2003; Silva, 2004; Silva et al., 2000; Teixeira et al., 1977; Wosiacki, 1977), *Penicillium* (Alves, 1996; Batista et al., 2001; Bitancourt, 1957; Chalfoun et al., 1992; Lopez-Garay et al., 1987; Meirelles, 1990; Mislivec et al., 1983; Pasin et al., 2002; Pereira, 2002; Silva, 2004; Silva et al., 2000; Teixeira et al., 1977; Wosiacki, 1977), *Cladosporium* (Pasin et al., 2002; Pereira, 2002; Silva, 2004;) e *Eurotium* (Batista et al., 2003).

Outros gêneros identificados foram principalmente *Rhizopus* e *Mucor*, os quais também já foram identificados em frutos e grãos de café (Taniwaki et al., 2000; Pereira, 2002).

TABELA 1. Níveis de Contaminação em porcentagem dos principais grupos de fungos e Concentração de ocratoxina A nas amostras analisadas.

Amostra	C. S	CIF	Cireum	CIF	Nigri	CIG	Cireum	CIG	Nigri	Conc	ocratoxina A	Penicillium	Fusarium	Eurotium	Cloasporium	outros
Bóia	ANR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7F	2F	2F	0
Bóia	2,0x10+2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	28F	1F	0	7F
Cereja descascado	ANR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2G	2G	1G	0
Cereja despolpado	ANR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2G	15G	0	0
Mistura	ANR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2G	94F e 8G	0	98F e 1G	0
Mistura	1,07x10+4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	27F e 5G	0	38F e 1G	0
Mistura	ANR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11G	0	0	0
Mistura	ANR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1G	27G	0	0
Mistura	ANR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5G	1G	1G	0
Mistura	ANR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	76G	10G	0	0
Mistura	1,26x10+3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12F e 23G	79F e 1G	0	1G	84F
Cereja descascado	ANR	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1F	7F	0	0	0
Mistura	ANR	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1F	82F	0	98F	0
Mistura	6,6x10+3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2F e 2G	95F e 16G	0	0	0
Mistura	2,73x10+4	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1F e 1G	12F e 2G	16F e 2G	3F	28F e 2G
Vermelho	1,14x10+3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1G	33F e 6G	9F	18F	0
Vermelho	1,8x10+3	9	0	0	0	2	0	0	0	0	0	2F e 6G	98F e 16G	2F e 1G	8F e 3G	0
Mistura	1,33x10+4	11	0	0	0	2	0	0	0	0	0	8F e 17G	100F e 11G	0	1G	0
Cereja descascado	ANR	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5F e 2G	0	1G	5D
Mistura	4,6x10+4	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2F e 1G	87F e 9G	1F	67F e 6G	2F
Verde	8,47x10+2	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100F e 7G	0	0	0
Mistura	ANR	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1F	24F	1F	18F	0
Mistura	2,6x10+4	4	1	0	0	0	0	0	0	0	0	13G	100F e 37G	0	1F e 7G	0
Cereja descascado	ANR	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1F	17F	0	0	1D e 1G
Mistura	0,6x10+2	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11F	0	0	5F
Bóia	2,2x10+3	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	6F	38F e 2G	0	0	14F e 2G
Bóia	2,2x10+3	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	89F e 3G	0	90	0
Mistura	3,2x10+4	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	61F	0	67F e 1G	0
Mistura	1,26x10+3	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100F e 26G	0	20F e 2G	0
Mistura	6,4x10+4	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	6F	100F e 5G	0	43F e 1G	0
Mistura	1,95x10+4	4	2	0	0	0	0	0	0	0	0	8F e 3G	100F e 5G	0	0	0
Bóia	3,25x10+3	5	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2F e 2G	16F	1F	0	2F

Continuação Tabela I

Amostra	C. S	CIF Circum	CIF Nigrif	CIG Circum	CIG Nigrif	Conc Ocratoxina A	Penicillium	Fusarium	Eurotium	Claesporium	outras
Mistura	8,8x10+2	5	2	0	0	0	25F e 20G	23F e 7G	0	13F e 2G	9F
Vermelho	8,1x10+2	50	3	7	0	0	19G	100F e 52G	3G	28F e 2G	7F
Mistura	1,16x10+3	0	4	0	0	0	0	9F	0	1F	11F e 3G
Mistura	8,7x10+3	21	4	1	0	0	21F e 17G	85F e 11G	0	0	1
Vermelho	8,8x10+3	43	4	10	0	0	1F e 34G	100F e 26G	0	1G	0
Cereja+verde	1x10+2	2	5	0	2	0	1F	27F	2G	1F e 2G	1G
Bóia	1,48x10+4	11	5	0	0	0	3F e 4G	21F e 2G	1F	2F	8F
Vermelho	8,5x10+3	31	5	0	0	0	12F e 11G	18F e 10G	1F e 1G	3F e 4G	30F e 1G
Mistura	1,83x10+3	1	6	0	1	0	0	26F e 5G	0	17F e 2G	1G
Mistura	2,48x10+4	9	6	0	0	0	3G	100F e 16G	0	43F e 2G	9F
Mistura	2,8x10+3	0	7	7	0	0	8F e 7G	42F e 5G	0	3F e 1G	0
cereja+verde	5,4x10+2	1	8	1	1	0	1F	18F e 3G	2F	0	5F
Mistura	1,85x10+4	3	9	0	0	0	0	78F e 2G	0	95F e 4G	11
Bóia	3,06x10+2	3	11	0	1	0	1G	16F e 1G	18F	2F	8F
Bóia	5,6x10+3	20	12	0	0	0	2F	98F e 2G	4F	28F	0
Verde	ANR	4	13	0	2	0	3F e 2G	98F e 7G	0	0	0
Mistura	2,64x10+4	52	16	0	0	0	6F e 3G	100F e 1G	0	34F	0
Vermelho	2,54x10+4	41	21	3	0	0	18F	10F e 8G	5G	1F	51 (branco)
Bóia	7,8x10+3	6	23	0	0	0	2F	48F e 8G	22F	66F	2F
Mistura	2,3x10+2	11	23	0	2	0	6G	21F e 5G	0	3G	9F e
Cereja descascado	6,8x10+3	1	66	1	2	0	54G	24G e	0	2G	0
Bóia	ANR	ANR	ANR	0	0	0	0	0	2G	2G	0
Cereja descascado	ANR	ANR	ANR	2	0	0	0	23G	0	5G	28G
Cereja/ Descascado	ANR	ANR	ANR	0	0	0	0	0	0	1G	0
Cereja/ Descascado	ANR	ANR	ANR	0	0	0	0	0	0	0	0
Cereja/ Descascado	ANR	ANR	ANR	1	0	0	1D	0	2D	0	0
Mistura	ANR	ANR	ANR	0	0	0	0	0	4	0	0
Mistura	ANR	ANR	ANR	0	0	0	5G	6G	0	0	0
Mistura	ANR	ANR	ANR	0	0	0	0	1G	1G	0	0
Vermelho	ANR	ANR	ANR	0	0	0	1G	1G	3G	3G	0
Vermelho	ANR	ANR	ANR	0	0	0	2G	5G	10G	1G	0
Mistura	ANR	ANR	ANR	0	0	0,17	4G	7G	2G	2G	0
Mistura	ANR	ANR	ANR	0	0	0,19	1G	7F e 10G	0	1F	27G
Vermelho	2,8x10+4	8	66	1	0	0	0	0	0	0	0

Continuação Tabela 1

Amostra	C. S	CIF C/sum	CIF N/pt	CIG C/sum	CIG N/pt	Conc Ocratoxina A	Penicillium	Fusarium	Eurotium	Chaetochytrium	outros
Vermelho	ANR	ANR	ANR	0	0	0,27	4G	2G	98G	0	0
Mistura	8,4x10+2	11	1	1	0	0,28	41F e 24G	48F e 8G	0	51F	0
Vermelho	1,18x10+4	11	0	0	0	0,4	2F e 7G	73F e 11G	0	52F e 4G	8F
Mistura	0,28x10+2	18	28	0	0	0,4	18F e 15G	4F e 8G	8F	8F e 1G	13F
Mistura	ANR	ANR	ANR	2	0	0,48	1G	85F e 11G	84F e 6G	0	0
Cereja+verde	1,4x10+4	12	1	0	0	0,58	3G	88F e 5G	1F	100F	0
Mistura	ANR	0	7	0	0	0,84	0	7F	2F	0	3F
Mistura	1,8x10+4	4	8	1	0	1,08	4F e 11G	88F e 11G	2F	74F e 8G	5G
Bola	ANR	ANR	ANR	0	1	1,09	0	7G	1G	0	22G
Vermelho	1,33x10+4	48	3	3	0	1,15	16G	87F e 7G	0	2G	0
Vermelho	4,48x10+2	8	50	0	14	1,16	17G	88F e 4G	0	0	10G
ANR	ANR	0	13	1	5	1,22	0	16F e 4G	1F	0	0
Mistura	1,8x10+2	1	88	1	23	1,35	8G	0	1F	1G	87F e 17G
Mistura	1,14x10+4	23	0	1	0	1,39	3F e 8G	78F e 10G	0	78F e 4G	0
Verde	ANR	ANR	ANR	2	0	1,41	1G	5G	11G	2G	0
Mistura	1,65x10+3	9	3	0	0	1,44	7F e 3G	43F	1F	10F e 1G	28F e 8G
Mistura	ANR	0	1	0	0	1,47	1F	2F	0	1D	5D
Mistura	3,33x10+2	8	89	0	7	1,5	2F e 4G	9F e 8G	0	0	4F e 1G
Vermelho	2,78x10+4	40	ANR	2	0	1,5	1G	28G	6G	0	0
Vermelho	2,4x10+2	8	1	5	0	1,74	25F e 36G	57F e 9G	1G	28F e 2G	0
Cereja+verde	2,02x10+4	21	10	0	0	1,78	20F e 1G	43F e 5G	1F	8F	12F e 2G
Mistura	5,3x10+4	4	18	5	1	1,9	8F e 3G	28F e 4G	13F e 2G	1G	9F
Mistura	ANR	4	6	0	2	2,21	17F e 10G	92F e 20G	2G	1F	0
Mistura	8,33x10+3	6	8	0	0	2,66	4F e 27G	82F e 10G	0	78F e 8G	2G
Vermelho	1,56x10+4	11	7	2	0	2,88	1F	38F e 9G	1F	21F e 1G	18F e 1G
Vermelho	5,27x10+3	3	16	0	0	3,33	1F e 18G	97F e 20G	4F e 1G	58F e 2G	0
Vermelho	1,22x10+4	7	6	2	2	5,17	5G	44F e 13G	8F	4F e 1G	4F
Vermelho	ANR	ANR	ANR	6	1	5,88	3F e 13G	96F e 5G	3G	88F	0
Mistura	ANR	0	3	1	0	8,42	8G	5G	19G	1G	0
Mistura	ANR	0	0	1	1	8,8	2F e 9G	100F e 11G	0	84F e 3G	0
Mistura	ANR	0	0	0	0	8,91	17G	5G	80G	0	0
Vermelho	ANR	ANR	ANR	8	1	7,21	10G	8G	0	18G	0
Bola	8,1x10+3	28	8	1	0	7,42	20G	15G	0	0	3
Vermelho	9,8x10+2	28	5	0	1	7,44	18F e 3G	88F e 3G	0	37F e 3G	1G
							2G	24F e 7G	8G	11F	0

Continuação Tabela 1

Análise	C. S.	CIF Circum	CIF Nigri	CIG Circum	CIG Nigri	Conc. Caracotina A	Penicillium	Fusarium	Eurotium	Chebotomium	Outros
Bola	33	33	9	5	0	7,82	39F e 22G	42F e 9G	3F	4F	0
Vermelho	13	13	42	3	0	7,83	7F e 33G	94F e 13G	3G	92F e 5G	0
Vermelho	ANR	ANR	ANR	1	0	8,21	8G	5G	2G	6G	0
Vermelho	31	31	7	4	3	8,26	33F e 40G	40F e 47G	0	21F e 5G	0
Bola	12	12	2	0	1	8,44	8F e 4G	16F	0	2F	9F
Bola	19	19	4	0	1	8,48	1F e 14G	28F e 7G	0	29F	1G
Vermelho	39	39	13	1	2	8,49	26F e 77G	28F e 7G	0	0	46F
Vermelho	9	9	2	1	1	8,24	9G	100F e 18G	1F e 7G	41F	0
Vermelho	10	10	0	3	0	8,85	3F e 8G	73F e 12G	1F e 1G	88F e 10G	1F (Vertic)
Vermelho	ANR	ANR	ANR	0	0	11,17	26G	12G	8G	7G	1G
Vermelho	ANR	ANR	ANR	13	0	14,07	3G	14G	0	0	3
Vermelho	30	30	2	3	5	14,25	10F e 16G	97F e 10G	8F e 3G	28F e 1G	0
Vermelho	31	31	49	17	18	15,1	3F	28F e 2G	4F e 3G	14F	0
Mistura	87	87	3	4	0	15,16	21G	83F e 3G	0	48F e 2G	1G
Vermelho	16	16	2	1	0	16,5	2F e 13G	94F e 34G	3F e 1G	0	0
Vermelho	4	4	1	1	0	16,5	1F e 6B	18F e 1G	1F	0	2F
Bola	46	46	9	2	0	16,88	43F e 22G	72F e 9G	0	25F e 3G	0
Vermelho	16	16	0	0	0	16,41	1F	66F	6F	28F	14F
Vermelho	ANR	ANR	ANR	12	0	22,3	16G	16G	1G	1G	0
Vermelho	ANR	ANR	ANR	5	1	25,8	16G	28G	2G	6G	0
Vermelho	18	18	7	1	0	34,83	2F e 23G	99F e 14G	1F e 1G	37F e 6G	0
Mistura	2	2	0	0	0	42,82	1G	100F e 12G	0	64F e 2G	2F
Vermelho	28	28	0	12	0	47,43	26G	100F e 30G	0	3F e 1G	1G
Vermelho	29	29	44	5	2	58,81	8F e 18G	68F	85F e 9G	48F	0
Vermelho	67	67	2	10	0	72,92	2F e 2G	83F e 9G	3F	0	0
Bola	18	18	0	10	0	77,14	9G	100F e 32G	0	14F	0
Bola	41	41	0	21	0	90,82	29G	100F e 21G	0	0	0
Vermelho	32	32	2	15	0	101,88	5F e 13G	100F e 8G	3F	24F e 2G	0

C. S. Contaminação Superficial dos frutos de café; CIF Circum: Contaminação Interna dos Frutos de Café com fungos do gênero *Aspergillus* Seção *Circumdati*, CIF Nigri: Contaminação Interna dos Frutos de Café com fungos do gênero *Aspergillus* Seção *Nigri*, CIG Circum: Contaminação Interna dos Grãos de Café com fungos do gênero *Aspergillus* Seção *Circumdati*, CIG Nigri: Contaminação Interna dos Grãos de Café com fungos do gênero *Aspergillus* Seção *Nigri*. XF: porcentagem de contaminação do específico gênero em frutos de Café; XG porcentagem de contaminação do específico em grãos de café; Outros: representa diversos gêneros de fungos não identificados até gênero.

3.1 Espécies Gênero *Aspergillus* Identificadas

Foram identificadas 15 espécies de *Aspergillus*, sendo que seis pertencem à Seção *Circumdati*, duas à Seção *Flavi*, uma à Seção *Fumigati*, uma à Seção *Nidulantes*, duas à Seção *Nigri*, uma à Seção *Usti* e duas à Seção *Versicolores* além de duas espécies de *Eurotium*, perfazendo um total de 294 isolados identificados.

Das espécies da seção *Circumdati*, *A. ochraceus* foi a mais comum, representando cerca de 92,70%, e tem sido identificada em frutos e grãos de café em outros estudos (Batista et al., 2001; Batista et al., 2003; Freitas, 2000; Levi, 1980; López-Garay et al., 1987; Nasser, 2001; Pasin et al., 2002, Pereira, 2002; Silva, 2004, Silva et al., 2000; Suárez-Quiroz et al., 2004; Taniwaki et al., 2003). As demais espécies também já foram identificadas em café, como o *A. melleus* (Batista et al., 2001), *A. sulphureus* (Batista et al., 2001; Nasser, 2001), *A. auricomus* (Batista et al., 2001), *A. sclerotiorum* (Batista et al., 2001; Nasser, 2001, Pereira, 2002) e *A. dimorphicus* (Silva, 2004).

As principais características utilizadas para a diferenciação das espécies foram o desenvolvimento a 37°C e a produção de escleródios. *A. ochraceus* é diferenciado por que produz escleródios de coloração lavanda a vinho e não cresce a 37°C. Para a identificação de *A. auricomus*, a quantidade de escleródios amarelos e a textura, a forma e o diâmetro dos conídios (conídios lisos) foram essenciais. O *A. melleus* foi diferenciado pelo crescimento a 37°C e pela textura, cor e comprimento dos conidióforos. Os conidióforos curtos e a textura aveludada das colônias permitiram a identificação de *A. dimorphicus*. *A. sulphureus* foi identificado principalmente pela cor dos escleródios produzidos, pela textura lisa de alguns conidióforos e pelo crescimento a 37°C. *A. sclerotiorum* foi identificado principalmente pelo crescimento a 37°C, pelo comprimento e textura dos conidióforos e pela produção de escleródios levemente rosados.

Para espécies de *Aspergillus* Seção *Nigri*, *A. niger* (58 isolados identificados) e *A. foetidus* (25), as principais características utilizadas para sua diferenciação foram a cor da colônia, que do *A. foetidus* é marrom a marrom esverdeada e do *A. niger* é preta, os conídios do *A. foetidus* são lisos e amarronzados e os do *A. niger* são finamente rugosos e espinhosos e de coloração preta. Os conídios destas duas espécies não ultrapassam 6µm, o que as diferencia do *A. carbonarius*, cujos conídios medem entre 6 a 8 µm de diâmetro, chegando a 10µm, e são distintamente rugosos e espinhosos (Klich, 2002a), descartando, assim, a possibilidade de uma falha de identificação das espécies de *A. niger* e *A. foetidus* neste estudo. Estas duas espécies também têm sido identificadas em frutos e grãos de café. O *A. foetidus* foi identificado por Nakajima et al. (1997), Batista et al. (2001), Batista et al. (2001, 2003) e Silva (2004); *A. niger*, o mais comum da seção *Nigri*, já foi identificado por Batista et al. (2001, 2003), Bucheli et al. (1998), Levi (1980); Mislivec et al., (1983), Nakajima et al. (1997), Pereira (2002), Silva et al. (2000), Silva (2004), Suárez-Quiroz et al. (2004) e Taniwaki et al. (2003). Alguns estudos tem incluído o *A. foetidus* em *A. niger aggregate* devido às suas semelhanças em filogenia; porém, morfologicamente estas espécies são facilmente diferenciadas pela coloração, pelo comprimento do conidióforo e pela textura, forma, cor e diâmetro dos conídios (Klich, 2002a).

As demais espécies de *Aspergillus* identificadas neste estudo também já foram isoladas de frutos e grãos de café, como *A. flavus*, (Batista et al., 2001, 2003), Levi, 1980; Mislivec et al., 1983; López-Garay et al., 1987, Pereira, 2002; Silva, 2004, *A. tamaritii* (Batista et al., 2001; López-Garay et al., 1987; 2003; Mislivec et al., 1983; Suárez-Quiroz et al., 2004), *A. fumigatus* (Bucheli et al., 1998; López-Garay et al., 1987; Mislivec et al., 1983; Suárez-Quiroz et al., 2004), *A. ustus* (Batista et al., 2001; Mislivec et al., 1983), *A. sydowii* (; Batista et al., 2001, 2003; Mislivec et al., 1983), *A. versicolor* (Batista et al., 2001;

2003, Chalfoun & Batista, 2003; Levi, 1980; Mislivec et al., 1983;) e *A. nidulans* (Mislivec et al., 1983).

3.2 Espécies dos gêneros *Fusarium*, *Penicillium*, *Cladosporium* e *Eurotium* identificadas

Das espécies pertencentes aos gêneros *Fusarium*, *Cladosporium*, *Eurotium* e *Penicillium*, todas também já foram isoladas de frutos, grãos ou da lavoura de café (Tabela 2). Como as identificações foram direcionadas para as espécies de *Aspergillus* seção *Circumdati* e *Nigri*, os isolados pertencentes a estes gêneros foram selecionados de acordo com a sua morfologia nos grãos e sua frequência nas diferentes propriedades analisadas.

Estes fungos são contaminantes naturais de produtos agrícolas, a sua disseminação ocorre pelo vento e também por insetos presentes na lavoura.

Das espécies identificadas neste estudo, *Cladosporium*, *A. niger*, *A. flavus*, *F. solani* e espécies de *Penicillium* já foram identificadas por estarem associadas com o inseto *Hypotenemus hampei* (Ferrari) (Coleóptera:Scolytidae), conhecido como a broca do café. A broca do café é considerada uma das principais pragas do cafeeiro no Brasil e ataca os frutos em qualquer estágio de maturação, desde verde até maduros (cereja) ou secos (Souza & Reis, 1997). Segundo Carrión & Bonet (2003), algumas espécies de fungos tem funções diferentes quando associados com a broca, embora todas sejam consumidas pelo *H. hampei*. *A. flavus* e *A. niger*, *Mucor* e *Penicillium*, que são saprófitas e estariam dentro das galerias degradando as fezes da broca. *Cladosporium* poderia estar sendo usado como alimento para os progêntos do inseto. *Fusarium solani* e *Penicillium*, principalmente o *P. echinulatum*, estariam sendo transportados para inibir o crescimento de fungos como *Beauveria bassiana*, um fungo entomopatogênico inimigo natural da broca do café. Veja & Mercadier (1998) observaram que as fêmeas de *H. hampei* levavam para o interior dos

grãos de café seus ovos, como a mãe estava contaminada com *A. ochraceus* os progênitos ficaram contaminados, disseminando os fungos.

Perez et al. (2003), estudando a microbiodratoxina A associada à broca em 3 regiões produtoras de café no México, constatou que os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* foram dominantes, sendo detectados no exoesqueleto, no interior e nas fezes da broca.

Sendo assim, os danos provocados por insetos como a broca do café, e também por ácaros, nos frutos de café demonstram que eles podem ser importantes vetores de fungos, uma vez que estes fungos não são capazes de danificar diretamente os frutos sadios.

As figuras 1, 2, 3 e 4 ilustram 24 espécies de fungos filamentosos dos gêneros *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Eurotium*, *Fusarium* e *Penicillium* identificadas neste estudo.

TABELA 2 Espécies dos gêneros *Fusarium*, *Penicillium*, *Cladosporium* e *Eurotium* identificadas.

Espécies identificadas	Número. de isolados	Referencias de estudos onde tais espécies foram isoladas de frutos e grãos de café
<i>C. cladosporioides</i>	02	Pereira, 2002; Pasin et al., 2002; Suárez-Quiroz et al., 2004,
<i>Fusarium lateritium</i>	02	Silva, 2004,
<i>F. solani</i>	01	Silva, 2004
<i>Penicillium citrinum</i> ,	07	Batista et al., 2003; Chalfoun & Batista, 2003; Suárez-Quiroz et al., 2004
<i>P. brevicompactum</i>	05	Batista et al., 2003; Chalfoun & Batista, 2003; Nasser, 2001,
<i>P. corylophilum</i>	04	Batista et al., 2003; Chalfoun & Batista, 2003)
<i>P. aurantiogriseum</i>	03	Batista et al., 2003; Chalfoun & Batista, 2003),
<i>P. minioluteum</i>	02	Silva, 2004; Suárez-Quiroz et al., 2004;
<i>P. solitum</i>	01	Batista et al., 2003; Chalfoun & Batista, 2003;
<i>P. commune</i>	03	
<i>P. variabile</i>	02	Pasin et al., 2002;
<i>P. glabrum</i>	02	Batista et al., 2003; Chalfoun & Batista, 2003; Suárez-Quiroz et al., 2004;
<i>P. expansum</i>	01	Batista et al., 2003; Chalfoun & Batista, 2003
<i>Eurotium chevalieri</i>	02	Chalfoun & Batista, 2003
<i>E. am,istelodami</i>	03	Chalfoun & Batista, 2003

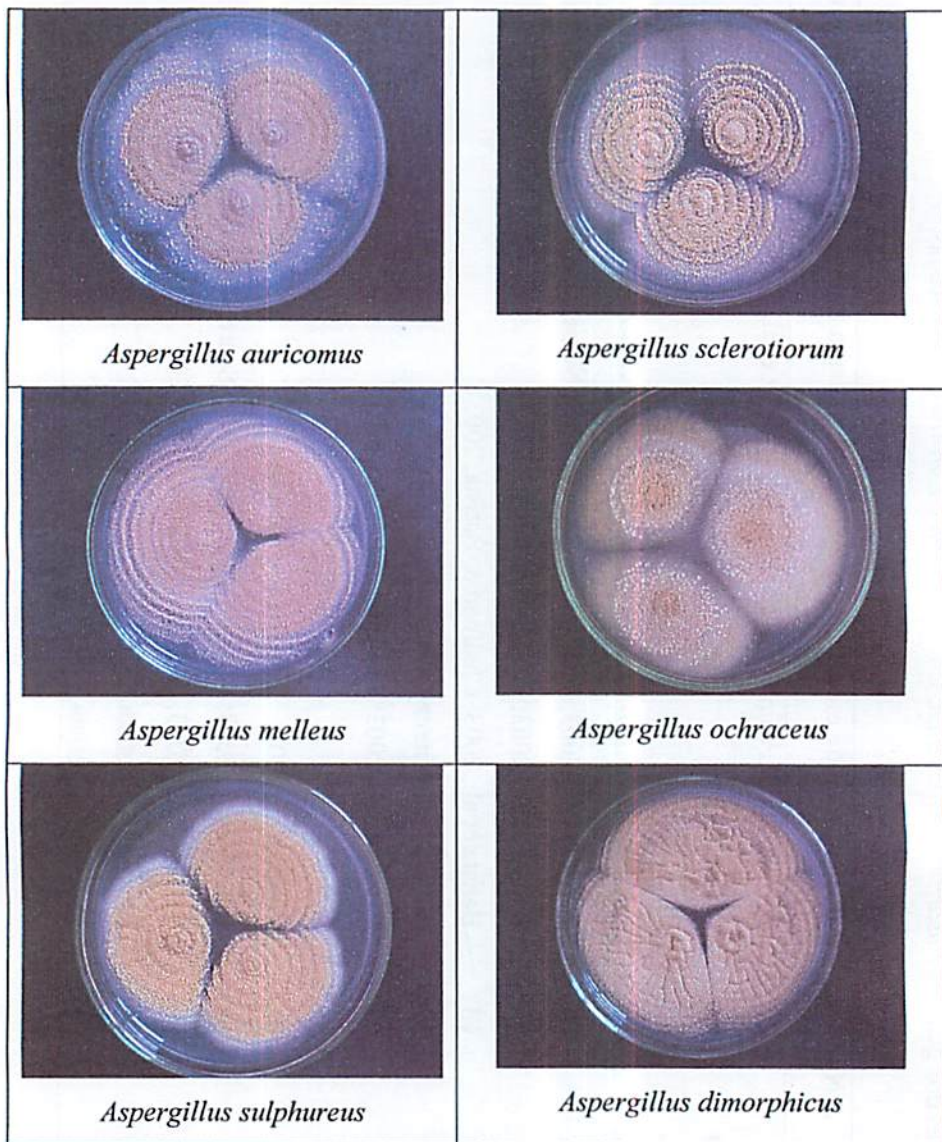
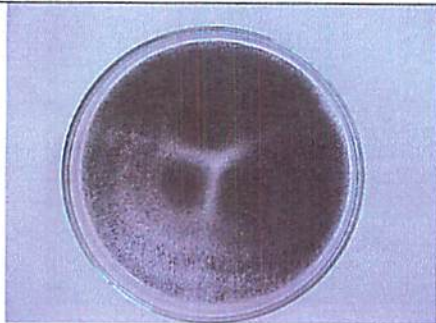


FIGURA 1 Espécies do Gênero *Aspergillus* Seção *Circundati*



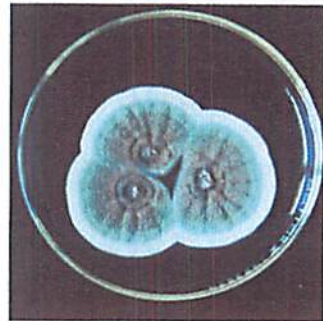
Aspergillus foetidus



Aspergillus niger



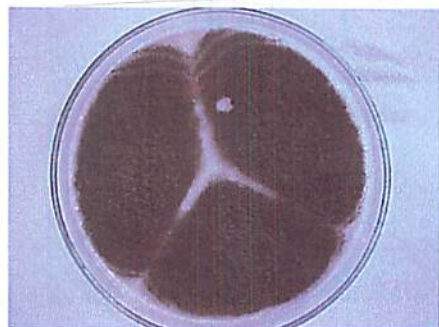
Aspergillus versicolor



Aspergillus sydowi

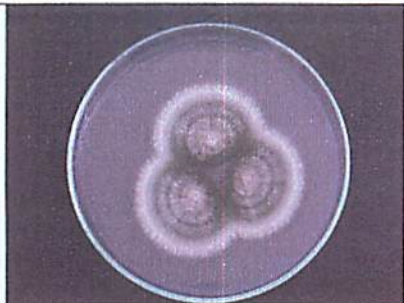


Aspergillus flavus



Aspergillus tamaris

FIGURA 2 Espécies do Gênero *Aspergillus* Seção *Nigri*, *Versicolores* e *Flavi*.



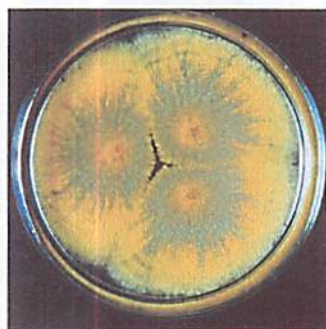
Aspergillus nidulans



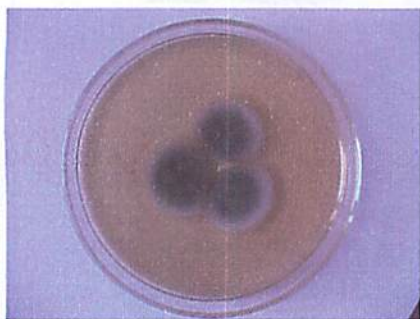
Aspergillus fumigatus



A. ustus



Eurotium amstelodami



Cladosporium cladosporioides



Fusarium lateritium

FIGURA 3 Espécies do Gênero *Aspergillus* Seção *Nidulantes*, *Fumigati*, *Usti*, gênero *Eurotium*, *Cladosporium* e *Fusarium*.

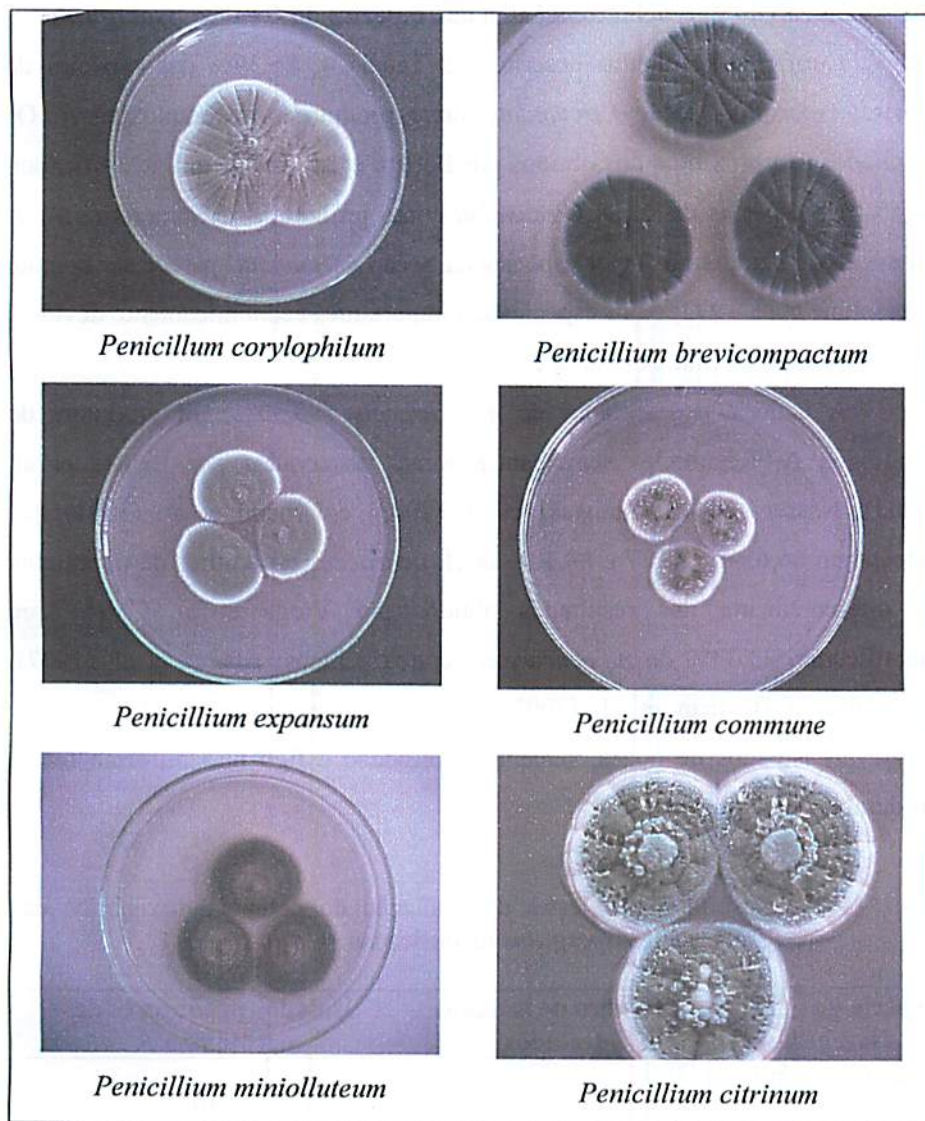


FIGURA 4 Espécies do Gênero *Penicillium*.

3.3 Avaliação do potencial toxigênico das espécies do Gênero *Aspergillus*

Conforme resultados descritos na Tabela 4, 85,39% das espécies do gênero *Aspergillus* seção *Circumdati* foram produtores de ocratoxina A. Os resultados são próximos dos obtidos por Batista et al. (2003) que identificaram 74,6% das espécies da seção *Circumdati* como produtoras de ocratoxina A. A produção de ocratoxina A por espécies da Seção *Circumdati* parece ser comum (Hesseltine et al. 1972) e tais espécies são importantes economicamente devido à produção de ocratoxina A (Varga et al., 2003).

A maioria dos isolados de *A. ochraceus* (90,30%) foi produtora de ocratoxina A. Resultados semelhantes foram observados por Batista et al. (2003), Nasser (2001), Taniwaki et al. (2003) e Urbano et al. (2001) que detectaram 66,6; 75; 77,77 e 88,10% de *A. ochraceus* produtores de ocratoxina A, diferentemente dos resultados obtidos por Varga et al. (1996) que identificaram 33,33% de *A. ochraceus* ocratoxigênicos; Abarca et al. (1997), com 16%, e Bayman et al. (2002), segundo os quais apenas 2,5% de *A. ochraceus* isolados de nozes, semente de algodão e figo na Califórnia foram produtores de ocratoxina A.

TABELA 4. Resultado dos testes de avaliação do potencial toxigênico das espécies de *Aspergillus* identificadas.

Espécie do gênero <i>Aspergillus</i>	Número de isolados testados	Isolados produtores de ocratoxina A
Seção <i>Circindati</i>		
<i>A. ochraceus</i>	165	149
<i>A. melleus</i>	03	00
<i>A. dimorphicus</i>	02	00
<i>A. sulphureus</i>	04	01
<i>A. sclerotiorum</i>	03	02
<i>A. auricomus</i>	01	00
Seção <i>Nigri</i>		
<i>A. niger</i>	58	00
<i>A. foetidus</i>	25	00

Segundo Mühlencoert et al. (2004), a produção de ocratoxina por *A. ochraceus* ocorre próximo a fase final e exponencial de crescimento e foi dependente de uma rápida utilização de glicose e uma moderada redução do pH.

De acordo com Varga et al. (2000), análises de fragmentos do DNA (DNA mitocondrial e região ITS) por PCR têm demonstrado a classificação de *A. ochraceus* em dois grupos. O grupo 2 não produz ocratoxina A e pode ser utilizado com segurança na bioconversão de esteróides e produção de enzimas; já no grupo 1, que necessita de mais estudos taxonômicos, a maioria dos isolados são produtores de ocratoxina A. Neste estudo os autores não observaram nenhuma correlação entre os isolados produtores de ocratoxina A com origem geográfica e os produtos de que os fungos foram isolados, *A. ochraceus* isolados de café foram encontrados nos dois grupos.

O número de isolados testados e a falta de padronização das metodologias, tanto na identificação como na avaliação do potencial toxigênico, utilizadas nos diferentes estudos podem ter ocasionado esta diferença entre isolados produtores e não produtores de ocratoxina A. Segundo Bars & Bars (2000), a distribuição do potencial toxigênico de *A. ochraceus* tem variado de 80 a 25% de isolados ocratoxigênicos, porém outros estudos são necessários para esclarecer esta variação.

Nas demais espécies da Seção *Circumdati*, por não serem muito comuns a porcentagem de isolados considerados produtores de ocratoxina A também varia consideravelmente. Varga et al. (1996) identificaram que 50% dos isolados de *A. sulphureus* eram produtores de ocratoxina A, 25% de *A. sclerotiorum* foram ocratoxigênicos e 1 dos 4 isolados de *A. auricomus* também produziu a toxina.

Ciegler (1972) identificou como produtores de ocratoxina A o *A. ochraceus*, *A. melleus*, *A. sulphureus* e *A. sclerotiorum* em meio de cultura YES. Walker (1997), Wilson et al. (2002) e Moss (1996) citam, além do *Aspergillus*

ochraceus, o *A. sulphureus* e *A. sclerotiorum* como as espécies de *Aspergillus* mais conhecidas como produtoras de ocratoxina A em climas tropicais e subtropicais; estas três espécies foram identificadas neste estudo. Tsubuchi et al. (1984) relatam a presença de *A. ochraceus*, *A. elegans* e *A. sclerotiorum* produtores de ocratoxina A em amostras de grãos de café importadas pelo Japão.

Nenhum isolado de *A. melleus* foi produtor de ocratoxina A, semelhante resultado foi obtido por Bayman et al. (2002) e Frisvad & Samson (2000). De acordo com Frisvad & Samson (2000), *A. melleus* não é uma espécie produtora de ocratoxina A, e sim uma espécie morfologicamente muito semelhante a *A. muricatus*.

Nenhum isolado de *Aspergillus* Seção *Nigri* foi considerado como produtor de ocratoxina A a partir da metodologia utilizada neste estudo. Vários estudos têm detectado *A. niger* ou *A. niger aggregate* como produtores de ocratoxina A (Abarca et al., 1994; Accensi et al., 2004; Bucheli & Taniwaki 2002; Suárez-Quiroz et al., 2004; Viani, 2002; Téren et al. 1996), sendo que a maioria tem demonstrado que *A. niger* ou *A. niger aggregate* são raramente produtores de ocratoxina A.

Os isolados identificados como *A. foetidus* neste estudo não foram produtores de ocratoxina A. Esta espécie já foi citada como produtora de ocratoxina A (Magnoli et al., 2003; Nakajima et al., 1997, Téren et al., 1996).

Nenhum isolado de *A. carbonarius* foi identificado nestes estudo, estes resultados refletem os obtidos por Bucheli et al. (1998) e Urbano et al. (2001), que analisando várias amostras de diferentes regiões não detectaram esta espécie de *Aspergillus*.

Considerando as condições em que os fungos da Seção *Nigri* foram incubados para a produção de ocratoxina A (temperatura ótima e ausência de luminosidade) e que o meio de cultura contém nutrientes que estimulam a produção de ocratoxina A, apesar do método não ser tão sensível quanto à

análise de HPLC, a ausência de um spot e um Rf semelhante ao padrão da ocratoxina A nos fungos testados permitem considerá-los como não produtores.

De acordo como Mühlencoert et al. (2004) a divergência em alguns casos sobre a produção de ocratoxina A em *Aspergillus*, sugere que a síntese de ocratoxina A é dependente da interação de vários fatores ambientais mais do que o simples fato de crescimento. A produção de metabólitos secundários como as micotoxinas não são essenciais para o organismo. Os fatores ambientais irão regular os genes e enzimas envolvidas na produção de ocratoxina A. Alguns isolados de *A. carbonarius* não produzem ocratoxina A em meio básico mas produz em grãos de café e em meio a base de leite de coco. A diferença observada em vários estudos pode ser resultado da variabilidade de sintetizar a ocratoxina pela espécie testada. Rösenthaller et al. (1984) observaram variações na produção de ocratoxina A em culturas de esporos único em *Aspergillus*. Uma outra explicação seria a variabilidade de produção de ocratoxina A dentro da mesma espécie que pode chegar até 1000 vezes (Bars & Bars, 2000) ou a perda irreversível da produção de ocratoxina A em culturas de laboratório. Mühlencoert et al. (2004) afirma ainda que a biossíntese de ocratoxina A por espécies de *Aspergillus* é determinada mais pelas condições ambientais do que pela inerente habilidade do organismo em produzir a micotoxina. Se o isolado não produz a toxina em determinadas condições não justifica qualquer conclusão sobre a habilidade geral para a produção de ocratoxina A. Também qualquer agrupamento em produtores e não produtores de ocratoxina A baseado sobre os dados acima descritos podem gerar enganos.

3.4 Incidência de fungos toxigênicos – Gênero *Aspergillus* Seção *Circumdati*

Das 104 amostras de frutos analisadas 83 (79,81%) apresentaram contaminação com fungos do gênero *Aspergillus* Seção *Circumdati*, sendo identificados também em 43 (41,35%) dos grãos destas mesmas amostras,

ocorrendo, assim, uma redução significativa na população deste grupo de fungos após o beneficiamento.

Das 127 amostras de grãos de café analisadas, neste contexto já estão incluídas as amostras que foram coletadas já beneficiadas nas fazendas; em 54 (42,52%) foi detectada a presença de fungos do gênero *Aspergillus* Seção *Circumdati*. Estes resultados mostram que a contaminação do café com fungos do gênero *Aspergillus* Seção *Circumdati* ocorre na lavoura; sendo assim, não seria correto chamar estes fungos de fungos de armazenamento.

Em 100 e 86,67% dos frutos das frações varrição e bóia, respectivamente, foi detectada a presença desta comunidade de fungos. Levando em consideração que as amostras varrição e bóia foram coletadas em todas as localidades, estes resultados mostram que os fungos do gênero *Aspergillus*/Seção *Circumdati* são comuns dentro do ambiente da lavoura.

Sendo um isolado toxigênico, e tendo condições favoráveis, a biossíntese de ocratoxina A ainda pode ocorrer na lavoura, uma vez que estes resultados representam a microbiota principalmente da casca/polpa/mucilagem.

As espécies da Seção *Circumdati* são amplamente distribuídas na natureza, desde campos cultivados e florestas até solo de deserto, mas geograficamente são mais comuns em regiões tropicais e subtropicais (Domsch et al., 1980; Klich, 2002a), o que demonstra a possibilidade da presença destas espécies no café de varrição (café que teve contato com o solo).

Das 8 amostras de frutos/grãos processadas via úmida, 25% dos grãos com pergaminho estavam contaminados com fungos do gênero *Aspergillus* Seção *Circumdati*, valores bem abaixo se comparado com as demais frações. Das 12 amostras de grãos analisadas, 33,33% apresentaram contaminação com fungos do gênero *Aspergillus* Seção *Circumdati*.

O processo de remoção da casca/polpa/mucilagem reduziu a ocorrência de todos os gêneros estudados, inclusive *Aspergillus* Seção *Circumdati*, e este

efeito pode ser observado na presença de ocratoxina A nas amostras. Chalfoun & Carvalho (1989) observaram uma redução significativa da contaminação fúngica após o beneficiamento, demonstrando que a contaminação destes fungos ocorre principalmente da casca para o grão. Estando presentes principalmente na casca, o pré-processamento do café é fundamental na remoção destes fungos ou na paralisação ou redução de seu desenvolvimento e síntese de metabólitos, impedindo que atinjam o grão.

Das 36 amostras, sendo sete coletadas já beneficiadas que apresentaram níveis de contaminação acima de 5,0µg/Kg, em 24 (das 29) amostras foi detectada a presença deste grupo de fungos no fruto e nos grãos, em sete amostras foram detectados apenas nos grãos, em três amostras, somente nos frutos, e em duas amostras não foi detectada a presença de fungos do gênero *Aspergillus* Seção *Circumdati*. Estes resultados demonstram que 82,76% dos frutos e grãos contaminados com ocratoxina A acima de 5µg/Kg apresentaram contaminação com fungos do gênero *Aspergillus* seção *Circumdati*.

A presença da ocratoxina A não pode existir sem o desenvolvimento de fungos produtores (Pitt et al., 2000). As análises de técnicas moleculares como de PCR (Polimerase Chain Reaction -Reação em Cadeia da Polimerase) para a detecção de *A. ochraceus* produtores de ocratoxina A (Schmidt et al., 2004a) e AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism – Polimorfismo de Comprimento de Fraguimentos Amplificados) e para *A. carbonarius* (Schmidt et al., 2004b) têm estabelecido uma correlação entre a presença do fungo e da ocratoxina A. Sendo assim, a ausência do fungo pelo método de plaqueamento direto não indica necessariamente a ausência da ocratoxina A (Pitt et al., 2000). Pode ter ocorrido uma eliminação dos fungos após os sucessivos processamentos do café, ou então as células destes fungos não permaneceram viáveis nos grãos de café, ou mesmo a metodologia usada não foi suficiente para

ativar as células dos fungos provavelmente injuriadas, uma vez que normalmente ocorreu o desenvolvimento dos fungos.

Das 20 amostras, sendo três coletadas já beneficiadas, que apresentaram níveis de contaminação entre 1 e 5µg/Kg de grãos de café, em sete (das 17) foi detectada a presença dos fungos nos frutos e nos grãos, em oito amostras os fungos foram detectados apenas nos frutos e em três amostras foi detectada apenas nos grãos. Em duas amostras foi detectada a ocratoxina A, mas não foi detectada a presença dos fungos.

Das nove amostras que apresentaram níveis de contaminação menor que 1µg/Kg de grãos de café, sendo três já coletadas beneficiadas, em três (das 6) foi detectada a presença dos fungos nos frutos e nos grãos, em duas amostras foi detectado apenas nos frutos e em uma amostras foi detectado a presença dos fungos apenas nos grãos. Em três das amostras não foi detectada a presença de fungos deste grupo.

Das 52 amostras de frutos analisadas nas quais não foi detectada a presença de ocratoxina A, 36 (69,23%) apresentaram contaminação com fungos do gênero *Aspergillus* Seção *Circumdati*, sendo identificados também em nove (17,31%) dos grãos destas mesmas amostras. Das 62 amostras de grãos de café em que não foi detectada a presença de ocratoxina A, e neste contexto já estão incluídas as amostras que foram coletadas já beneficiadas nas fazendas, em 11 (17,74%) foi detectada a presença de fungos do gênero *Aspergillus* Seção *Circumdati*.

Conforme representado na Figura 5, as amostras com maiores níveis de contaminação com fungos pertencentes ao gênero *Aspergillus* seção *Circumdati* apresentaram também níveis mais elevados de contaminação com ocratoxina A, indicando serem os fungos desse gênero/seção os principais responsáveis pela presença de ocratoxina A.

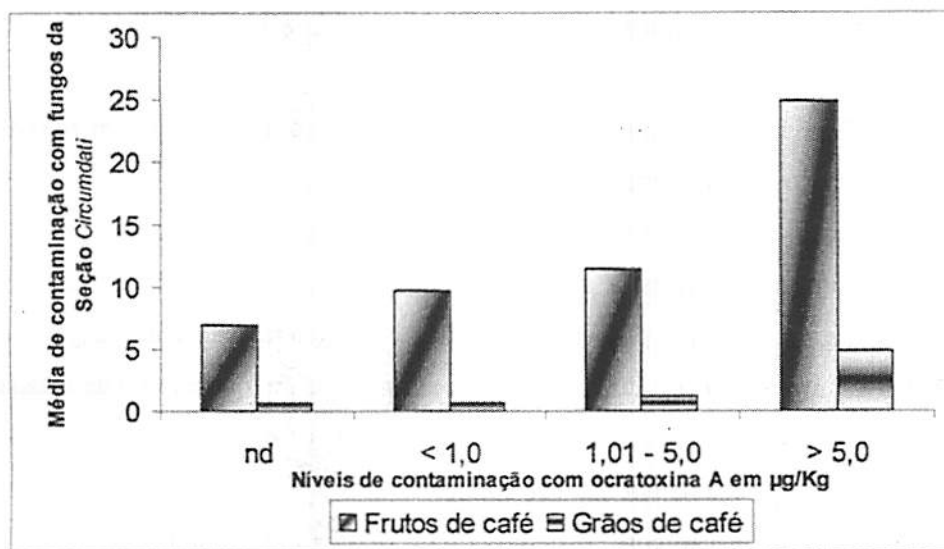


FIGURA 5. Média de contaminação dos frutos e grãos de café com fungos do Gênero *Aspergillus* Seção *Circumdati*

Considerando que foram analisados 100 frutos e 100 grãos nas amostras de café que foram coletadas com casca e 100 grãos nas amostras de café que foram coletadas já beneficiadas, a contaminação média dos frutos (com casca) nas amostras em que não foi detectada a presença da ocratoxina A foi de sete frutos por amostra, já nas amostras que apresentaram contaminação acima de $5,0\mu\text{g/Kg}$ este valor foi de 24,93 frutos por amostra, um nível de contaminação três vezes maior. Esta desigualdade é ainda maior quando analisamos os grãos contaminados. Das amostras em que não foi detectada a presença de ocratoxina A, a contaminação média foi de 0,60 grãos por amostra, já nas amostras que apresentaram um nível de contaminação maior que $5,0\mu\text{g/Kg}$, a média foi de 4,91, sendo o nível de contaminação oito vezes superior. A média de contaminação com fungos da seção *Circumdati* nas amostras com níveis de contaminação abaixo de $1\mu\text{g/Kg}$ foi de 9,67 nos frutos e 0,63 nos grãos, já nas amostras que apresentaram contaminação com ocratoxina A entre 1,0 e

5,0µg/Kg a média de contaminação com os fungos foi de 11,35 nos frutos e 1,15 nos grãos.

Todavia não foi possível utilizar o nível de contaminação com fungos ocratoxigênicos como critério para posicionar uma amostra em seu nível de contaminação com ocratoxina A como não detectado ou acima de 5,0µg/Kg.

Conforme demonstra a Tabela 5 e Figura 6, as amostras de varrição apresentam proximidade dos valores médios de contaminação com fungos do gênero *Aspergillus* Seção *Circumdati* entre as amostras em que não foi detectada a presença de ocratoxina A e as amostras com níveis de contaminação acima de 5,0µg/Kg. Nas amostras em que não foi detectada a presença de ocratoxina A, a média de contaminação com os fungos foi de 29,17 frutos contaminados, 6,33 nas amostras com níveis de contaminação com ocratoxina A abaixo de 1,0µg/Kg, 18,38 nas amostras com níveis de ocratoxina A entre 1,0 e 5,0µg/Kg e uma média de 23,41 nas amostras com níveis de ocratoxina A acima de 5,0µg/Kg. A contaminação média do fungos da Seção *Circumdati* nos grãos foi de 2,14 grãos contaminados nas amostras em que não foi detectada a presença de ocratoxina A. Não foi detectado nenhum isolado ocratoxigênico nas amostras que apresentaram níveis de contaminação abaixo de 1,0µg/Kg. A contaminação média foi de 1,44 grãos contaminados nas amostras com níveis de contaminação com ocratoxina A entre 1,0 e 5,0µg/Kg e de 5,50 grãos contaminados nas amostras com níveis de contaminação com ocratoxina A acima de 5,0µg/Kg.

A Tabela 5 descreve a média de contaminação com fungos do gênero *Aspergillus* Seção *Circumdati* nas amostras de varrição bóia e mistura.

TABELA 5. Média de contaminação com fungos do gênero *Aspergillus* Seção *Circumdati* nas amostras bóia, misturas e varrição nos diferentes níveis de contaminação com ocratoxina A

	Não detectado		< 1,0µg/Kg		1,0 a 5,0 µg/Kg		> 5,0 µg/Kg	
	Fruto	Grão	Fruto	Grão	Fruto	Grão	Fruto	Grão
Bóia	5,25	0,0	*	*	0,00a	0,00a	28,14	5,57
Mistura	4,75	0,32	9,0	0,80	4,20	0,40	22,25	1,50
Varrição	29,17	2,14	6,33	0,00	18,38	1,44	23,41	5,50

*nenhuma amostra contaminada, - (a) apenas uma amostra foi analisada.

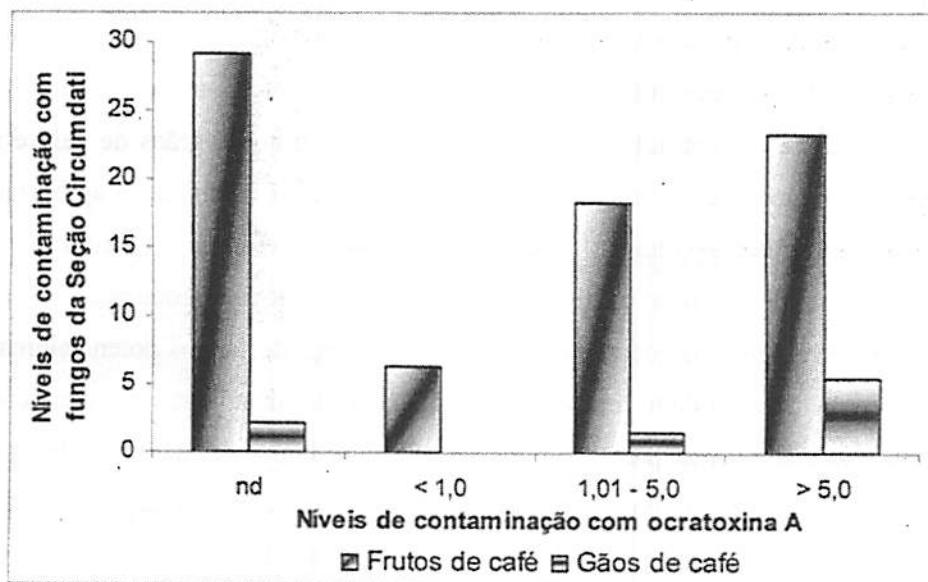


FIGURA 6. Média de contaminação dos frutos e grãos de café com fungos do Gênero *Aspergillus* Seção *Circumdati* em amostras de varrição.

Estes resultados demonstram que nas amostras de variação, o nível de contaminação com fungos do gênero *Aspergillus* seção *Circumdati* não indicou necessariamente uma contaminação acima de 5,0µg/Kg, mas que existe um risco em potencial. Isto ocorre possivelmente porque, sendo a ocratoxina A influenciada pelas condições ambientais, estes fatores climáticos são mais importantes que a presença e a intensidade do inóculo, podendo favorecer ou inibir a produção de ocratoxina A

Considerando que 85,39% dos isolados da seção *Circumdati* foram produtores de ocratoxina A, os resultados da Tabela 5 tendem a demonstrar que as amostras que apresentaram uma média de contaminação com fungos do gênero *Aspergillus* Seção *Circumdati* acima de 20 nos frutos e de 5 nos grãos seriam rejeitadas em uma legislação que permitisse uma concentração máxima de ocratoxina A de 5,0µg/Kg

A presença dos fungos produtores de micotoxinas não indica necessariamente a presença da toxina, mas que existe um risco em potencial (Pitt et al., 2000). O desenvolvimento dos fungos e a produção de micotoxinas são consequência de uma interação entre os fungo, os frutos e grãos de café e as condições ambientais. Segundo Pitt et al. (2000), uma combinação apropriada destes três fatores (fungo x planta x ambiente) determina a quantidade da colonização do substrato e o tipo e quantidade da micotoxina produzida.

A ausência da ocratoxina A mais a presença de fungos potencialmente ocratoxigênicos podem ter sido consequência de uma falta de condições ambientais favoráveis para a síntese da toxina; se houve condições ambientais favoráveis, estas não ocorreram em tempo suficiente para a produção da toxina nos grãos de café em quantidade suficiente para ser detectada pela metodologia utilizada neste estudo, ou até mesmo houve ação do substrato (grãos de café), que possui compostos como a cafeína, reconhecida entre alguns pesquisadores, que inibe tanto o desenvolvimento dos fungos como a produção de ocratoxina A.

Quando são incluídas nas análises as amostras de grãos beneficiados que foram coletadas na fazenda, ocorre uma redução na porcentagem das amostras contaminadas, demonstrando, assim, que estes fungos não são fungos de armazenamento. Ao mesmo tempo, estes resultados demonstram que estes fungos estão presentes nos grãos e que um armazenamento mal adequado pode resultar no desenvolvimento destes fungos e na produção de ocratoxina A.

O processo de remoção da casca/polpa/mucilagem reduziu a presença de todos os gêneros estudados, inclusive os *Aspergillus* Seção *Circumdati*, conforme observado por Chalfoun & Carvalho (1989), e este efeito pode ser observado na presença de ocratoxina A nas amostras. Segundo Bucheli et al. (2000), a maior parte da contaminação com ocratoxina A encontra-se na casca do café devido, principalmente, a sua composição química diferente da composição dos grãos de café.

3.5 Incidência de fungos toxigênicos – Gênero *Aspergillus* Seção *Nigri*

Das 104 amostras de frutos analisadas, 76 (73,08%) apresentaram contaminação com fungos do gênero *Aspergillus* Seção *Nigri*, sendo identificados também em 28 (26,92%) dos grãos destas mesmas amostras.

A maioria dos estudos sobre microbiocratoxina A de frutos e grãos de café tem mencionado os fungos do gênero *Aspergillus* Seção *Nigri*, sendo algumas vezes predominantes sobre os demais grupos de fungos (Alves, 1996; Freitas, 2000; Meirelles, 1990; Nakajima et al., 1997; Tsubouchi et al., 1984).

Sendo assim, a espécies identificadas que pertencem a esta Seção podem fazer parte da microbiota dos ambientes da lavoura de café. Os fungos da Seção *Nigri* são contaminantes de inúmeros produtos e, em café, estão relacionados com a redução na qualidade da bebida por estarem associados a produtos de padrão inferior, o que não ocorre em cafés com bebidas de melhor qualidade (Alves, 1996; Meirelles, 1990).

Das 127 amostras de grãos de café analisadas, e neste contexto já estão incluídas as amostras que foram coletadas já beneficiadas nas fazendas, em 32 amostras (25,20%) foi detectada a presença de fungos do gênero *Aspergillus* Seção *Nigri*.

Em 72,73 e 64,71% dos frutos das amostras de varrição e bóia, respectivamente, foi detectada a presença desta comunidade de fungos. Levando em consideração que as amostras varrição e bóia foram coletadas em todas as localidades, estes resultados mostram que esta comunidade também é comum dentro do ambiente da lavoura de café.

As espécies da seção *Nigri* são mais comuns em florestas e solos cultivados (Klich, 2002b); na natureza são encontradas no solo, em compostos e em matéria orgânica em decomposição (Schuster et al. (2002); embora a maior fonte de espécies da seção *Nigri* seja o solo, os membros desta seção são também isolados de outros produtos (Varga et al., 2004). O ambiente em que as espécies da seção *Nigri* são encontradas favorece o seu desenvolvimento em café de varrição devido ao contato dos frutos com o solo e, em café bóia, devido ao estado de senescência adiantado dos frutos de café na lavoura.

Das oito amostras de frutos/grãos pré-processadas via úmida, 62,5% dos grãos com pergaminho estavam contaminados com fungos do gênero *Aspergillus* Seção *Nigri*. Das 12 amostras de grãos analisadas, 25% apresentaram contaminação.

Das 36 amostras, sendo sete coletadas já beneficiadas que apresentaram níveis de contaminação acima de 5,0µg/Kg, em nove (das 29) amostras foi detectada a presença deste grupo de fungos no fruto e nos grãos, em quatro amostras foram detectados apenas nos grãos, em 12 amostras somente nos frutos e em 11 amostras não foi detectada a presença de fungos do gênero *Aspergillus* Seção *Nigri*.

Neste estudo não foi identificada nenhuma espécie de *Aspergillus* pertencente à Seção *Nigri* produtora de ocratoxina A. Sendo assim, aparentemente as espécies da seção *Nigri* não estariam influenciando diretamente nestes resultados. A espécie *A. niger* foi a mais encontrada neste trabalho, pertencente a esta Seção, e é raramente produtora de ocratoxina A (Pitt, 2000).

Das 52 amostras de frutos analisadas, em que não foi detectada a presença de ocratoxina A, em 34 (65,38%) ocorreu contaminação com fungos do gênero *Aspergillus* Seção *Nigri*, sendo identificados também em dez (19,23%) dos grãos destas mesmas amostras. Das 62 amostras de grãos de café em que não foi detectada a presença de ocratoxina A analisadas, incluindo as amostras que foram coletadas já beneficiadas nas fazendas, em dez amostras (16,13%) foi detectada a presença de fungos do gênero *Aspergillus* Seção *Nigri*.

A principal espécie produtora de ocratoxina A pertencente à Seção *Nigri* é *A. carbonarius*, que é facilmente diferenciado do *A. niger*. Apesar de ser potencialmente mais produtor, *Aspergillus carbonarius* tem sido muito pouco detectado em café (Taniwaki et al., 2003, Urbano et al., 2001), sendo mais comum em regiões muito quentes (Pitt et al., 2001).

3.6 Incidência de fungos toxigênicos – Gêneros *Fusarium*, *Penicillium*, *Cladosporium*,

Conforme Tabela 1, a presença dos outros gêneros, assim como para as espécies de *Aspergillus*, está mais relacionada com o café processado via seca, ou seja, contendo a casca. Nas amostras de café descascado/despulpado a contaminação fúngica é reduzida para todos os gêneros estudados.

O gênero *Fusarium* foi detectado na maioria das amostras e em porcentagem geralmente superior à dos demais gêneros, principalmente nos frutos, sendo reduzida após o beneficiamento. Das 104 amostras de frutos

analisadas, o gênero *Fusarium* foi detectado em 94 (90,38%) amostras, após o beneficiamento, foi detectado em 86 (82,69%) amostras de grãos. Das 127 amostras de grãos analisadas, em 105 (82,68%) amostras foi detectada a presença de espécies de fungos pertencentes a este gênero.

Apesar de estar presente na maioria dos grãos, a redução da população de *Fusarium* que ocorre após o beneficiamento do café mostra que a contaminação é principalmente na casca/polpa/mucilagem.

Durante as análises microbiológicas estes frutos ainda se encontravam frescos, com uma atividade de água mais elevada. Um maior teor de umidade favorece as espécies de fungos pertencentes a este gênero e esta situação pode ter sido responsável pelo elevado índice de contaminação de *Fusarium*, uma vez que nas amostras que foram coletadas já beneficiadas nas propriedades o índice de contaminação é menor.

O gênero *Cladosporium* foi detectado principalmente nos frutos, sendo reduzido após o beneficiamento. Das 104 amostras de frutos analisadas, o gênero *Cladosporium* foi detectado em 65 (62,5%), e das 127 amostras de grãos analisadas, em 64 (50,39%) das amostras foi detectada a presença de *Cladosporium cladosporioides*; esta foi a única espécie deste gênero identificada neste estudo, a qual é a espécie mais comum do gênero, frequentemente encontrada em café (Pereira, 2002, Silva, 2004). *C. cladosporioides* não é produtor de micotoxinas (Pitt & Hocking, 1997) e já foi associado com café de melhor qualidade (Alves, 1996); porém, Pereira (2002) não observou nenhuma correlação entre *C. cladosporioides* e qualidade do café.

O gênero *Penicillium* foi detectado principalmente nos frutos e em grãos de café. Das 104 amostras de frutos analisadas, o gênero *Penicillium* foi detectado em 62 (59,61%), e das 127 amostras de grãos analisadas, em 85 (66,93%) das amostras foi detectada a presença de *Penicillium*.

Nenhuma das espécies identificadas do gênero *Penicillium* é considerada produtoras de ocratoxina A (Pitt, 2000). As espécies consideradas produtoras são *P. nordicum*, mais associada com alimentos derivados de carne e de leite, e *P. verrucosum*, mais comum em cereais armazenados inadequadamente. As duas espécies foram frequentemente encontradas em países de clima temperado (Castella et al., 2002; Larsen et al., 2001; Samson et al., 2000) e morfológicamente foram bem distintas das espécies encontradas neste estudo.

A incidência de fungos toxigênicos e dos isolados potencialmente ocratoxigênicos pode ter ocorrido de várias formas, desde o deslocamento do ar, levantando as células viáveis dos fungos presentes no solo, até por danos provocados por insetos e ácaros, que são vetores de esporos de fungos.

Perez et al. (2003), estudando a microbiota associada à broca em três regiões produtoras de café no México, constataram que os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Candida* foram dominantes. Estes gêneros foram detectados no exoesqueleto, no interior e nas fezes do inseto. A atividade fúngica pode causar deterioração rápida dos grãos, algumas vezes acompanhada com um aquecimento espontâneo. Esta atividade fúngica pode conduzir à perda de matéria seca, à perda do valor nutritivo e da germinabilidade e à produção de micotoxinas (Magan & Lacey, 1984).

Insetos como vetores de fungos produtores micotoxinas na lavoura já são estudados e bem conhecidos principalmente em milho, no qual os insetos são responsáveis pela contaminação de *Aspergillus flavus* e espécies do gênero *Fusarium*. Em estudos conduzidos na África (Uganda) por Vega e Mercadier, em 1998, dos 632 insetos estudados, coletados em 26 lugares, 34 (5,3%) estavam infestados com *A. ochraceus*, e dos 564 insetos coletados em Benin, 98 (17,4%) estavam infestados com *A. ochraceus*. Segundo os autores, as fêmeas de *Hypotenemus hampei* levam para o interior dos grãos de café os seus ovos; como

a mãe estava contaminada com *A. ochraceus*, os progênitos ficaram contaminados, disseminando os fungos.

Os insetos podem transportar os esporos de fungos no seu exterior ou no interior, sendo que os ácaros estão associados ou são atraídos por espécies de *Aspergillus* (Dunkel, 1988).

A associação entre danos provocados por insetos e fungos na pré-colheita e armazenamento tem resultado em aumento da contaminação com aflatoxina em milho, e na disseminação de fungos toxigênicos e de seus metabólitos (Dunkel, 1988). Os insetos e ácaros são vetores de esporos de fungos, os quais eles introduzem dentro dos grãos através de suas lesões. A contaminação de amendoim, semente de algodão e milho por *Aspergillus flavus* ou aflatoxinas antes da colheita é algumas vezes ligada ao ataque de insetos.

Os fungos que atualmente são conhecidos como produtores de ocratoxina A não são fitopatogênicos nem endofíticos em café, então a infestação interna direta não seria possível. Estes fungos são saprófitas e oportunistas (Bars & Bars, 2000).

Com base nestes estudos, os insetos e ácaros nos frutos de café podem ser importantes vetores de fungos produtores de ocratoxina A, uma vez que estes fungos não são capazes de danificar diretamente os frutos sadios.

4 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos durante este estudo, conclui-se que

Das amostras analisadas, 99,2% apresentaram contaminação com algum dos gêneros de fungos analisados, sendo identificados os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Eurotium* e *Cladosporium*.

Foram identificadas 15 espécies de fungos do gênero *Aspergillus*, sendo que o *A. sclerotiorum*, *A. sulphureus* e 90% dos isolados de *A. ochraceus* foram produtores de ocratoxina A. Estas três espécies do gênero *Aspergillus* fazem parte da seção *Circumdati*, sendo consideradas como as principais responsáveis pela presença de ocratoxina A nas amostras de grãos de café analisadas.

Todas as amostras de varrição apresentaram contaminação com fungos do gênero *Aspergillus* Seção *Circumdati*. As amostras que apresentaram maior índice de contaminação com os fungos também apresentaram os maiores níveis de contaminação com ocratoxina A.

As espécies de *Aspergillus* seção *Nigri*, *A. niger* e *A. foetidus* não foram produtoras de ocratoxina A. Também não foi identificado o *A. carbonarius*, principal espécie produtora de ocratoxina A na seção *Nigri*.

5 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

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

ABARCA, M. L.; BRAGULAT, M. R.; CASTELLÁ, G.; CABAÑES, F. J. Ochratoxin Production by strain of *Aspergillus niger* var *niger*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60. n. 7, p. 2650-2652, July 1994.

ACCENSI, F.; ABARCA, M. L.; CANO, J.; FIGUERA, L.; CABAÑES, F. J. Distribution of ochratoxin A producing strain in the *A. niger* aggregate. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 79, n. 3/4, p. 365-370, 2001.

AIDOO, K. E. Post-harvest Stored and Preservation of Tropical Crops. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Oxford, v. 32, n. 5, p. 161-173, Oct. 1993

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

BARS, J. L.; BARS, P. L. Mycotoxigenic in Grains Application to Mycotoxic Prevention in Coffee. In: SEMINARIO INTERNACIONAL SOBRE BIOTECNOLOGIA NA AGROINDÚSTRIA CAFEEIRA, 3., 2000, Londrina. **Anais...** Londrina: IAPAR/IRD, 2000. p. 513.

BATISTA, L. R.; CHALFOUN, S. M.; PRADO, G. Identificação de espécies toxigênicas de *Aspergillus* associadas aos grãos de café armazenados. **Revista Brasileira de Armazenamento**, Viçosa, v. 26, n. 3, p. 11-16, 2001. Especial café.

BATISTA, L. R.; CHALFOUN, S. M.; PRADO, G.; SCHWAN, R. F.; WHEALS, A. E. Toxigenic fungi associated with processed (green) coffee beans. (*Coffea arabica* L.). **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 85, n. 3, p. 293-300, Aug. 2003.

BAYMAN, P.; BAKER, J. L.; DOSTER, M. A.; MICHAILIDES, T. J.; MAHONEY, N. E. Ochratoxin production by the *aspergillus ochraceus* group and *A. alliaceus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 5, p. 2326-2329, May 2002.

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

BUCHELI, P.; MEYER, I.; PITTET, A.; VUATAZ, G.; VIANI, R. Development of ochratoxin A during robusta (*Coffea canephora*) coffee cherry drying. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 48, n. 4, p. 1358-1362, Apr. 2000.

BUCHELI, P.; MEYER, I.; PITTET, A.; VUATAZ, G.; VIANI, R. Industrial storage of green robusta under tropical conditions and its impact on raw material quality and ochratoxin A content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 46, n. 11, p. 4507-4511, Nov. 1998.

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 – Review. **Food Additives and Contaminants**, Oxford, v. 19, n. 7, p. 655-665, July 2002.

CARRIÓN, G.; BONET, A. Mycobiota associated with the coffee berry borer (Coleoptera: Scolytidae) and its galleries in fruit. **Annals of the Entomological Society of America**, Lanham, v. 97, n. 3, p. 492-499, May 2004.

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

CASTELLA, G.; LARSEN, T. O.; CABAÑES, J.; SCHMIDT, H.; ALBORESI, A.; NIESSEN, L.; FÄRBER, R.; GEISEN, R. Molecular characterization of ochratoxin A producing strains of the genus *Penicillium*. **Systematic and Applied Microbiology**, Jena, v. 25, n. 1, p. 74-83, Apr. 2002.

CHALFOUN, S. M.; BATISTA, L. R. Fungos associados a frutos e grãos de café – *Aspergillus & Penicillium*. EMBRAPA, 2003. 69 p.

CHALFOUN, S. M.; CARVALHO, V. D. Microflora associada a frutos e grãos de café de diferentes locais, tipos de colheita e diferentes etapas de preparo. Ano 1: 1987. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISA CAFEEIRA 15., 1989, Maringá. Resumo... Rio de Janeiro: MIC/IBC, 1989. p. 17-21.

CHALFOUN, S. M.; CARVALHO, V. L de; AZEVEDO, P. J. de; CARVALHO, V. D. de. Efeitos de tratamento com fungicidas, aplicados na fase pré colheita, sobre a qualidade do café. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 18., 1992, Araxá. Resumos... Rio de Janeiro: MARA/ PROCAFÉ, 1992. p. 63-65.

CHRISTENSEN, M. The *Aspergillus ochraceus* Group: Two new species from western soils and a synoptic key, *Mycologia*, Bronx, v. 74, n. 2, p. 210-225, 1982.

CHRISTENSEN, M.A Synoptic key and evaluation of Species in the *Aspergillus flavus* group. *Mycologia*, New York, v.73, n.6, p.1056-1084, Nov./Dec. 1981.

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

COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY – CAST. *Mycotoxins: risks in plant, animal, and human systems*. Ames, 2003. n. 139.

DOMSCH, K. H.; GAMS, W.; ANDERSON, T. H. *Compendium of soil fungi*. London: Academic Press, 1980. v. 1.

DUNKEL, F. V.; The relationship of to the deterioration of stored grain by fungi. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v. 7, n. 3, p. 227-244, Dec. 1988.

FILTENBORG, O.; FRISVAD, J. C. A simple screening method for toxigenic moulds in pure cultures. *Lebensmittel-Wissenschaft Technologie*, London, v. 13, n. 3, p. 128-130, 1980.

FILTENBORG, O.; FRISVAD, J. C.; THRANE, U. Moulds in food spoilage. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v. 33, n. 1, p. 85-102, Nov. 1996.

FLORIANI, C. G. Café - a certificação é o caminho. *Agro Técnico, Caderno Técnico* – IMA, Belo Horizonte, n. 4, p. 36, 2003.

FREITAS, R. F. Fungos Associados a Grãos de café (*Coffea arabica* L.) beneficiado em Diversos Municípios da Região Sul de Minas Gerais. 2000. 72 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. *Neopetromyces* gen. nov. and an overview of teleomorphs of *Aspergillus* subgenus *Circumdati*. In: SEIFERT, K. A.; GAMS, W.; CROUS, P. W.; SAMUELS, G. J. (Ed.). *Studies in Mycology – Molecular, morphology and classification: towards monophyletic genera in the Ascomycetes*. Ed CBS, 2000. v. 45, p. 201-207.

HESELTINE, C.W.; VANDERGRAFT, E.E.; FENNELL, D.I.; SMITH, M. L.; SHOTWELL, O.L. *Aspergilli* as ochratoxin Producers. *Mycologia*, New York, v.64, n.3, p.539-550, May/June 1972.

JOOSTEN, H. M. L. J.; GOETZ, J.; PITTET, A.; SCHELLENBERG, M.; BUCHELI, P. Production of ochratoxin A by *Aspergillus carbonarius* on coffee cherries *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v. 65, n. 1/2, p. 39-44, Apr. 2001.

KLICH, M. A. *Identification of Common Aspergillus species*. Centraalbureau voor Schimmelcultuur. The Netherlands. 2002

KLICH, M. A.; PITT, J. I. *A Laboratory Guide to Common Aspergillus species and their Teleomorphs*. North Ryde, 1988.

KRUG, H. P. Cafés Duros, III. Relação entre porcentagem de microrganismos e qualidade do café. *Revista do Instituto de Café*, São Paulo, v. 26, n. 169, p. 1827-1831, mar. 1940.

LACEY, J. Pre-and post-harvest ecology of fungi causing spoilage of foods and other stored products. *Journal of Applied Bacteriology*, Oxford, n. 18, p. 11S-25S, 1989. Supplement.

LARSEN, T. O.; SVENDESEN, A.; SMEDSGAARD, J. Biochemical of ochratoxin A-producing strains of the genus *Penicillium*. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 67, n. 8, p. 3630-3635, Aug. 2001.

LEVI, C. Mycotoxins in coffee. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, Washington, v. 63, n. 6, p. 1282-1285, June 1980

LÓPEZ GARAY, C.; BATUTISTA ROMERO, E.; MORENO GONZÁLEZ, E. Microflora of the stored coffee and its influence on quality. ASIC, 12^a Colloque, Montreux, 1987. p. 758-770.

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

MAGNOLI, C.; VIOLANTE, M.; COMBINA, M.; PALACIO, G.; DALCERO, A. Mycoflora and ochratoxin-producing strains of *Aspergillus section Nigri* in wine grapes in Argentina. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 37, n. 2, p. 179-184, 2003.

MEIRELES, 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. 71 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

MISLIVEC, P. B.; BRUCE, V. R.; GIBSON, R. Incidence of Toxigenic and other Molds in Green Coffee Beans. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 46, n. 11, p. 969-73, Nov. 1983.

MOSS, M. O. Mode of formation of ochratoxin A. **Food Additive and Contaminants**, Oxford, v. 13, p. 5-9, 1996. Supplement.

MÜHLENCOERT, E.; MAYER, I.; ZAPF, M. W.; VOGEL, R. F.; NIESSEN, L. Production of ochratoxin A by *Aspergillus ochraceus*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 110, n. 5/6, p. 651-659, June 2004.

NAKAJIMA, M.; TSUBOUCHI, H.; MIYABE, M.; UENO, Y. Survey of Aflatoxin B 1 and Ochratoxin A in commercial green coffee beans by high-performance liquid chromatography linked with immunoaffinity chromatography. **Food and Agricultural Immunology**, Oxon, v. 9, n. 2, p. 77-83, June 1997.

NASSER, P. P. Influência da separação de grãos de café (*Coffea arabica* L.) por tamanho na qualidade e ocorrência de ocratoxina A. 2001. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG

NELSON, P. E.; TOUSSOUN, T. A.; MARASAS, W. F. O. *Fusarium species* - an Illustrated Manual for Identification. EUA, 1983. 193 p.

PASIN, L. A. A. P.; ABREU, M. S.; CHALFOUN, S. M.; PÁDUA, T. R. P. de. Efeito de Micronutrientes na população fúngica associada a grãos de café (*Coffea arabica* L.). *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras-MG, v. 26, n. 5, p. 918-926, set./out. 2002.

PEREIRA, R. T. G. **Influência de *Cladosporium cladosporioides* na qualidade da bebida do café.** 2002. 42 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

PEREIRA, R. T. G., FRANK, J. M., PFENNING, L. H. Método para análise de comunidade de fungos associados a frutos e grãos do cafeeiro. In Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil 3. Anais. P.177-178. 2003

PEREZ, J.; INFANTE, F. VEGA, F. E.; HOLGUIN, F.; MACÍAS, J.; VALLE, J.; NIETO, G.; PETERSON, S. W.; KURTMAN, C. P.; O'DONNELL, K.; Mycobiocratoxina A associated with the coffee berry borre (*Hypothenemus hampei*) in Mexico. *Mycological Research*, New York, v. 107, n. 7, p. 879-887, July 2003.

PITT, J. I. Toxigenic fungi: which are important. *Medical Mycology*, Oxford, v. 38, p. 17-22, 2000. Supplement 1.

PITT, J. I.; BASÍLICO, J. C.; ABARCA, M. L.; LÓPEZ, C. Mycotoxins and toxigenic fungi. *Medical mycology*, Oxford, v. 38, p. 41-46, 2000. Supplement 1.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. *Fungi and food Spoilage*. 2. ed. Cambridge: Chapman & Hall, 1997. 593 p.

PITT, J. I.; TANIWAKI, M. H.; TEIXEIRA, A. A.; IAMANAKA, B. T.; Distribution of *Aspergillus ochraceus*, *A. niger* and *A. carbonarius* in coffee in four regions of Brazil. In: ASIC Coffee conference, 19., 2001, Trieste, Itália.

PRADO, E.; MARÍN, S.; RAMOS, A. J.; SANCHIS, V. Occurrence of ochratoxigenic fungi and ochratoxina A in green coffee from different origins. *Food Science and Technology International*, London, v. 10, n. 1, p. 45-49, Feb. 2004.

RAPER, K. B.; FENNELL, D. I. **The Genus *Aspergillus***. Baltimore: Williams and Wilkins, 1965.

RESENDE, A. **Espécies de *Fusarium* associadas ao cafeeiro (*Coffea arabica* L.)**. 2003. 87 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras. Lavras, MG.

RÖSCHENTHALER, R.; CREPPY, E. E.; DIRHEIMER, G. Ochratoxin A: on the mode of action of a ubiquitous mycotoxin. **Journal of Toxicology - Toxin Reviews**, Madison, v. 3, n. 1, p. 53-86, 1984.

SAMSON, R. A.; HOEKSTRA, E. S.; FRISVAD, J. C.; FILTENBORG, O. **Introduction to food-borne fungi**. 4 ed. Centraalbureau Voor Schimmelcultures Baarn Delft. 2000.

SCHMIDT, H.; BANNIER, M.; VOGEL, R. F.; NIESSEN, L. Detection and quantification of *Aspergillus ochraceus* in green coffee by PCR. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 38, n. 6, p. 464-469, 2004a.

SCHMIDT, H.; TANIWAKI, M. H.; VOGEL, R. F.; NIESSEN, L. Utilization of AFLP markers for PCR-based identification of *Aspergillus carbonarius* and identification of its presence in green coffee samples. **Journal Applied Microbiology**, Oxford, v. 97, n. 5, p. 899-909, 2004b.

SCHUSTER, E.; DUNN-COLEMAN, N.; FRISVAD, J. C.; van DIJCK, P. W. M. On the safety of *Aspergillus niger* – a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 59, n. 4/5, p. 426-435, Aug. 2002.

SILVA, C. F. **Sucessão microbiana e caracterização enzimática da microbiocratoxina A associada aos frutos e grãos de café (*Coffea arabica* L.) do município de Lavras-MG**. 2004. 156 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SILVA, C. F.; SCHWAN, R. F.; DIAS, E. S.; WHEALS, A. E. Microbial diversity during maturation and natural processing of coffee cherries of *Coffea arabica* in Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 60, n. 2/3, p. 251-260, Sept. 2000.

SMITH, J. E.; CUERO, R. G. Interaction between toxic and non-toxic fungi in gamma irradiation sterilised cereals. In: FLANNIGAN, B. (Ed.). **Spoilage and mycotoxins of cereals and other stored products**. CABI, 1996. v. 22.

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

SOUZA, J. C.; REIS, P. R. *Broca-do-café: histórico, reconhecimento, biologia, prejuízos, monitoramento e controle*. Belo Horizonte: EPAMIG, 1997. (EPAMIG. Boletim Técnico, n. 50).

SUÁREZ-QUIROZ, M. L.; GONZÁLEZ-RIOS, O.; BAREL, M.; GUYOT, B.; SCHORR-GALINDO, S.; GUIRAUD, J. P. Study of ochratoxin A-producing strains in coffee processing. *International Journal of Food and Technology*, Oxford, v. 39, n. 5, p. 501-507, May 2004.

TANIWAKI, M. H.; BANHE, A. A.; IAMANAKA, B. T. Incidência de Fungos em café. In: SEMINARIO INTERNACIONAL SOBRE BIOTECNOLOGIA NA AGROINDÚSTRIA CAFEEIRA, 3., 2000, Londrina. *Programas e resumos...* Londrina: IAPAR/IRD, 2000. p. 85.

TANIWAKI, M. H.; PITT, J. I.; TELXEIRA, A. A.; IAMANAKA, B. T. The source of ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to processing methods. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v. 82, n. 2, p. 173-179, Apr. 2003.

TELXEIRA, A. A.; SILVEIRA, A. P. da; ARRUDA, H. V. de; MARIOTTO, P. R.; FIGUEIREDO, P. Influência de diversos fungicidas aplicados a alto e baixo volumes na qualidade da bebida do café. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 5., 1977, Guarapari. *Resumos...* Rio de Janeiro: IBC-GERCA, [1977]. p. 89-90.

TÉREN, J.; VARGA, J.; HAMARI, Z.; RINYU, E.; KEVEL, F. Immunochemical detection of ochratoxin A in black *Aspergillus* strains. *Mycopathologia*, Dordrecht, v. 134, n. 3, p. 171-176, 1996.

TSUBOUCHI, H.; YAMAMOTO, K.; HISADA, K.; SAKABE, Y. A Survey occurrence of mycotoxins and toxigenic fungi in imported green coffee beans. *Proceedings of the Japanese Association of Mycotoxicology*, Tokyo, n. 19, p. 16-21, 1984.

URBANO, G. R.; TANIWAKI, M. H.; LEITÃO, M. F. E.; VICENTINI, M. C. Occurrence of ochratoxin A-producing fungi in raw brazilian coffee. *Journal of Food Protection*, Des Moines, v. 64, n. 8, p. 1226-1230, Aug. 2001.

VARGA, J.; JUHÁSZ, A.; KEVEI, F.; KOZAKIEWICZ, Z. Molecular diversity of agriculturally important *Aspergillus* species. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 110, n. 5/6, p. 627-640, June 2004.

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

VARGA, J.; KEVEI, E.; TÓTH, B.; KOZAKIEWICZ, Z.; HOEKSTRA, R. F. Molecular analysis of variability within the toxigenic *Aspergillus ochraceus* species. **Canadian Journal Microbiology**, Montreal, v. 46, n. 7, p. 593-599, July 2000.

VARGA, J.; RIGÓ, K.; TÓTH, J.; TÉREN, J.; KOZAKIEWICZ, Z.; Evolutionary Relationships among *Aspergillus* species producing economically important mycotoxins. **Food Technology and Biotechnology**, Zagreb, v. 41, n. 1, p. 29-36, Jan./Mar. 2003.

VIANI, R. Effect of processing on ochratoxin A (OCRATOXINA A) content of coffee. In: DEVRIES, J. W.; TRUCKSESS, M. W.; JACKSON, L. S. (Ed.). **Advanced in Experimental Medicine and biology**. 2002. v. 504, p. 189-193.

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

WILSON, D. M.; MUBATANHEMA, W.; JURJEVIC, Z. Biology and ecology of mycotoxigenic *Aspergillus* species as related to economic and health concerns. In: DEVRIES, J. W.; TRUCKSESS, M. W.; JACKSON, L. S. (Ed.). **Advanced in Experimental Medicine and Biology**. 2002. v. 504, p. 3-17.

WOSIACKI, G. **Enzimas pectinolíticas de *Fusarium oxysporum* Schlecht EX. Fr. Isolado de frutos de café**. 1977. 73 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade de Campinas, Campinas.

XIAO, H.; MADHYASTHA, S.; MARQUARDT, R. R.; LI, S.; VODELA, J. K. FROHLICH, A. A.; KEMPPAINEN, B. W. Toxicity of ochratoxin A, its opened lactone form and several of its analogs: structure-activity relationships. **Toxicology and Applied Pharmacology**, San Diego, v. 137, n. 2, p. 182-192, Apr. 1996.

CAPÍTULO 3

INCIDÊNCIA DE OCRATOXINA A EM DIFERENTES FRAÇÕES DO CAFÉ

RESUMO

BATISTA, L. R. Incidência de ocratoxina A em diferentes frações do café. In: _____. **Incidência de Fungos Produtores de Ocratoxina A em Grãos de Café (*Coffea arabica* L) Pré-Processados por Via Seca e Úmida.** 2005. p. 131-203. (Tese de Doutorado em Ciência do Alimento) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

A ocorrência de ocratoxina A foi estudada em diferentes frações e métodos de processamento de café. Foram analisadas 289 amostras coletadas em 11 municípios do sul de Minas Gerais. As frações coletadas foram bóia (35), fruto cereja (4), cereja+verde (11), cereja descascado (18), cereja despulpado (2), mistura (97), fruto seco na planta (4), varrição (106) e verde (12). Das 289 amostras analisadas, em 128 ou seja 44,29% não foi detectada a presença de ocratoxina A, em 89 amostras, 30,80%, foram detectadas a presença de ocratoxina A em níveis que variaram de 0,1 a 5,0 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de café. Estes resultados demonstram que 75,09% das amostras analisadas estariam dentro dos limites em estudo da Legislação Européia que regulamenta a concentração máxima de ocratoxina A em grãos de café. As demais amostras, 24,91% apresentaram contaminação acima de 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Os tipos de café cereja, cereja despulpado, cereja descascado verde e seco na planta mostram níveis de contaminação de ocratoxina A abaixo de 5 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ em sua grande maioria. As frações misturas, bóia e principalmente a varrição apresentam os maiores índices de contaminação com ocratoxina A acima do limite de 5 $\mu\text{g}/\text{Kg}$. Das amostras de café bóia analisadas 42,86% não apresentaram contaminação com ocratoxina A e um percentual de 34,28% das amostras, a contaminação de ocratoxina A superior a 5 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ e as amostras de café de varrição, em apenas 22,64% das amostras não foi detectado a presença de ocratoxina A, na grande maioria 77,36% foi detectada a presença de ocratoxina A, sendo que duas amostras apresentaram níveis superiores a 100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de grãos de café. A varrição dá origem a um café de baixa qualidade, neste estudo demonstramos que a varrição também representa um risco para a segurança do café devido a presença de ocratoxina A.

Orientador: Dr^a Sara Maria Chalfoun – EPAMIG

ABSTRACT

BATISTA, L. R. Ochratoxin A incidence in different coffee fractions. In: _____. **Fungi Ochratoxin A Producing in Coffee Beans (*Coffea arabica* L.) Dried and Wet Processing Method.** 2005. p 131-203. Thesis (Doutorate in Food Science) - Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.

The ochratoxin A occurrence was studied in different coffee (*Coffea arabica* L.) types according to the processing method. Two hundred eighty nine coffee samples from 11 locations of the south of Minas Gerais State were collected and analyzed. The sample types were overripe (35), cherry (4), cherry + green (11), cherry husked (18), cherry (imparchment) (2), mixes (boia, "overripe dried on tree" varrição "coffee beans swept from ground" and green "non ripe"). In 128 (44,29%) the ochratoxin A presence was not detected, in 89 samples (30,80%), ochratoxin A presence were detected at 0,1 to 5,0 µg/kg levels. This shows that 75,09% of the samples would be inside of the limits in study in European Legislation that regulates maximum ochratoxin A concentration in coffee beans. Other 24,91% samples presented, contamination above 5,0 µg/Kg. Most cherry, cherry imparchment, husked, green and coco (dried cherry) sample types has shown ochratoxin A contamination level bellow of 5 µg/kg. Coffee sample mixture as, boia and mainly the varrição presented the greatest contamination ochratoxin A index above the limit of 5µg/Kg. In 42,86% boia samples no ochratoxin A contamination was found, however, in 34,28% of the samples presented ochratoxin A contamination level above 5µg/kg, and in varrição samples only 22,64% the ochratoxin A presence was not detected, but in 77,36% the ochratoxin presence was detected, and two samples presented levels above 100µg/kg of beans coffee. The varrição coffee type gives low quality coffee drinking, in this study shows that the varrição type also represents risk for coffee safety due to ochratoxin presence.

Adviser: Ds Sara Maria Chalfoun – EPAMIG

1 INTRODUÇÃO

Como nas demais culturas, os frutos e grãos de café estão sujeitos a sofrer contaminação por microrganismos presentes no ambiente da lavoura em diferentes fases do cultivo, colheita, preparo e armazenamento (Chalfoun & Batista, 2002; Serra et al., 2004). A influência dos microrganismos sobre as características organolépticas do café tem sido reconhecida desde os anos 1940 (Krug, 1940, Krug, 1941). Os principais gêneros de fungos toxigênicos (*Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*) são contaminantes naturais do café e estão presentes desde o campo até o armazenamento (Batista et al., 2003).

A presença de fungos toxigênicos, além de alterar a qualidade do café pode colocar em risco a segurança do produto. Isto pode ocorrer devido a produção de micotoxinas, que são metabólitos secundários que mesmo em pequenas concentrações, são tóxicas ao homem e aos animais. Atualmente as micotoxinas mais estudadas e de maior importância para a saúde humana presentes nos alimentos são aflatoxinas, fumonizinas, patulina, ocratoxina e zearalenona (CAST, 2003). Nos grãos e produtos de café, a única que representa risco e é a mais estudada é a ocratoxina A.

A ocratoxina A tem sido produzida por *Penicillium verrucosum* e *Penicillium nordicum* (Larsen et al., 2001) e um número variado de espécies do gênero *Aspergillus*, como o *Aspergillus ochraceus*, *A. ostianus*, *A. auricomus*, *A. sulphureus*, *A. carbonarius*, *A. niger* e *A. sclerotiorum* (Abarca, 2001; Batista et al., 2003; Pitt, 2000).

As pesquisas de frequência e níveis de ocorrência de ocratoxina A em alimentos e em sangue humano indicam que os produtos alimentícios estão frequentemente contaminados (European Community, 2002)

A presença de ocratoxina A em cereais não é facilmente localizada ou diretamente associada com um fungo particular, como é o caso das aflatoxinas. Os seguintes produtos têm sido relatados por estarem contaminados com ocratoxina A; cevada, trigo, café, cerveja, vinho, carnes, cacau, alimentos infantis, ração animal, milho, aveia, centeio, figo, sangue e rins de suínos e outros tecidos de origem animal (CAST, 2003; Wilson et al., 2002), sendo os principais cereais afetados cultivados em regiões temperadas, a maioria estando ligada ao desenvolvimento de fungos do gênero *Penicillium*. As espécies do gênero *Aspergillus* podem ser as mais importantes em regiões de clima quente (Wilson et al., 2002)

O limite máximo de ocratoxina A para cereais ($5,0\mu\text{g}/\text{Kg}$) e seus subprodutos ($3,0\mu\text{g}/\text{Kg}$) tem sido estabelecido pela Comissão de Regulamentação da União Européia EC n. 472 (European Community, 2002),

Desde que a casca de café é uma fonte significativa de ocratoxina A, a limpeza e a padronização dos grãos são métodos efetivos para reduzir os níveis de ocratoxina A. Durante o processo industrial de converter os grãos de café em café torrado e café solúvel, pode ocorrer uma redução de até 90% nos níveis de ocratoxina A (Viani, 2002).

Avaliar a incidência de ocratoxina A em diferentes frações de café submetidas a diferentes métodos de pré-processamento (via seca e via úmida) foi o principal objetivo deste estudo além, de descrever de forma não pontual as condições favoráveis para ocorrência de ocratoxina A em grãos de café a partir de dados das localidades e das propriedades estudadas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Caracterização e localização das áreas em estudo

O levantamento foi efetuado em até 5 propriedades de cada um dos 11 municípios produtores, sendo coletadas amostras em Boa Esperança, Campestre, Campos Gerais, Carmo do Rio Claro, Cássia, Guaxupé, Machado, Monte Santo de Minas, Poços de Caldas, Pratinha e São Sebastião do Paraíso.

As frações coletadas foram bóia (35), fruto cereja (4), cereja+verde (11), cereja descascado (18), cereja despulpado (2), mistura (97), frutos seco na planta (4), varrição (106) e verde (12), perfazendo um total de 289 amostras analisadas.

Dados sobre as propriedades, o pré-processamento e as características das amostras foram coletados através da aplicação de questionários (anexo B). Foram coletados aproximadamente 5 a 6 Kg de todas as frações presentes na propriedade por ocasião da aplicação dos questionários. As amostras foram coletadas de forma aleatória, em vários pontos em que onde se encontravam, como terreiro, tulha, cafezal e sacos, de forma fosse obtidas amostras o mais homogêneas possível.

As amostras foram transferidas para a EPAMIG, Centro Tecnológico do Sul de Minas. As frações que foram coletadas ainda frutos (cereja, cereja+verde, verde, mistura) foram secas em estufa a $40\pm 2^{\circ}\text{C}$ até um teor de umidade de 11 a 12%. Foi realizado o beneficiamento e aproximadamente 2,5Kg da amostra beneficiada e 2,5Kg da amostra em coco foram enviados para o Laboratório de Controle de Qualidade e Segurança Alimentar/LACQSA do Ministério da Agricultura, no qual realizada a análise de ocratoxina A. No LACQSA, as amostras que foram enviadas em coco foram beneficiadas antes das análises de ocratoxina A.

A análise de ocratoxina A foi realizada em amostras que apresentaram teores de umidade entre 11 e 12%.

2.2 Análise de Ocratoxina A em Grãos de Café

As análises de ocratoxina A foram realizadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) no Laboratório de Controle de Qualidade e Segurança Alimentar/LACQSA em Belo Horizonte. Conforme Diário Oficial da União n.62, Seção 1, p.37 de 30 de março de 2000.

Extração:

Pesaram-se 25g da amostra, à temperatura ambiente, os quais foram adicionados 200ml de metanol-bicarbonato de sódio 3% (1:1) e agitado por 5 minutos em agitador mecânico.

Foram feitas duas filtrações uma em papel Whatman 4 e outra em papel de filtro GB/β de microfibra de vidro em pressão reduzida. Quatro mililitros do segundo filtrado foram transferidos para um balão de 100 ml contendo PBS.

Purificação:

A purificação foi feita em colunas de imunoafinidade (ochratest-Vicam) através de um fluxo de 2-3 ml/min. As amostras foram concentradas e ressuspensas em 300μL da fase móvel (metanol:acetonitrila:água:ácido acético – 35:35:29:1, v/v/v/v), agitadas em ultra-som e injetadas no Cromatógrafo Líquido.

Quantificação por CLAE:

Condições do equipamento: Cromatógrafo Líquido em coluna Shimpack C18 CLC ODS (M) 250x4,6mm, como fase móvel acetonitrila:metanol:água:ácido acético (35:35:29:1, v/v/v/v) com fluxo de 0,8mL/min, detector de fluorescência com excitação em 332 nm e emissão em 476nm. O limite de detecção do método é de 0,12μg/Kg e o limite de quantificação é de 0,20 μg/Kg.

Confirmação

A confirmação foi realizada com solução metanólica de BF₃ (14%), em que foi observado um aumento no tempo de retenção das amostras devido à derivatização da ocratoxina A.

2.3 Análises Estatísticas

A metodologia estatística empregada nesse estudo consistiu basicamente de técnicas multivariadas. Especificamente para análise das localidades em função dos níveis de contaminação de ocratoxina A, aplicou-se a análise de Cluster conforme Johnson & Wichern (1998), por variáveis (0,0 µg/K; 5,0 µg/K e > 5,0µg/K), sendo estas representativas dos níveis de contaminação da toxina. Desta forma, identificou-se a formação de dois agrupamentos, sendo o primeiro determinado pela variável (>5 µg/K) e outro, pelas variáveis (0,0 µg/K; 5,0 µg/K), respectivamente denominados por Grupo 1 e Grupo 2. Com base nos agrupamentos sugeridos, utilizou-se a análise de cluster por k-médias para identificar quais localidades são similares em relação ao nível de ocratoxina A detectado nas diferentes frações.

Para a relação dos níveis de contaminação de ocratoxina A com as diferentes frações de café, utilizou-se a análise de correspondência simples conforme descrito por Greenacre (1993). Essa técnica consiste da aplicação de componentes principais, como a tabela de contingência, neste caso, uma tabela de freqüências dos níveis de contaminação dispostos em linha, e as frações de café dispostas em colunas. A proporção dos totais das amostras de café corresponde ao perfil das variáveis dispostas em coluna. Analogamente tem-se o perfil para as variáveis linhas. A identificação da associação entre as variáveis é analisada conjuntamente pelas contribuições de cada variável (linha e coluna) em função dos componentes obtidos por meio da análise de componentes

principais. Cada componente representa o eixo que irá compor o mapa perceptual.

Em relação às análises de comparação das frações bóia, mistura e varrição versus tipo de terreiro (cimento, terra e asfalto), realizaram intervalos de confiança para diferença entre duas proporções com o nível de significância fixado em 5%. É importante salientar que essas comparações foram feitas considerando a proteção de bonferroni para manter o nível de significância global. Os resultados foram apresentados semelhantemente ao teste de Tukey com a disposição das letras.

Para realização das metodologias estatísticas mencionadas nesse trabalho, utilizou-se o software MINITAB 13.20.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme demonstrado nas Tabelas 1 e 2 e figura 1, das 289 amostras analisadas, em 128, ou seja, 44,29%, não foi detectada a presença de ocratoxina A; em 89 amostras, 30,80%, foi detectada a presença de ocratoxina A em níveis que variaram de 0,1 a 5,0 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de café. Estes resultados demonstram que 75,09% das amostras analisadas estariam dentro dos limites em estudo pela Legislação Européia que regulamenta a concentração máxima de ocratoxina A em grãos de café. As demais amostras, 24,91%, apresentaram contaminação acima de 5 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, ficando acima do limite em estudo pela União Européia.

Os estudos sobre a incidência de ocratoxina A em grãos de café têm demonstrado uma grande variação. A porcentagem de amostras contaminadas tem variado de 22 a 65,4%, (Batista et al., 2003; Bucheli et al., 1998; Moraes & Luchese 2004; Nakajima et al., 1997; Taniwaki, et al., 2003).

Varição semelhante ocorre com as amostras com valores acima de 5,0 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de café. Segundo Batista et al. (2003), das 40 amostras analisadas, nenhuma apresentou contaminação acima de 5 $\mu\text{g}/\text{Kg}$. Em uma das propriedades estudadas por Moraes & Luchese (2004), das 14 amostras analisadas 1 (7,14%) apresentou contaminação acima de 5 $\mu\text{g}/\text{Kg}$. Taniwaki et al. (2003) detectaram, em 9 (6,66%) das 135 amostras, contaminação acima deste limite. Das 90 amostras de grãos de café analisadas por Iamanaka & Taniwaki (2003), 13,33% apresentaram contaminação com ocratoxina A acima de 5,0 $\mu\text{g}/\text{Kg}$

Os tipos de café cereja, cereja despulpado, cereja descascado, verde e seco na planta mostram-se com uma contaminação de ocratoxina A de até 5 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ em sua grande maioria. As frações de café misturas, bóia e principalmente varrição, apresentam os maiores índices de contaminação, com ocratoxina A acima do limite de 5 $\mu\text{g}/\text{Kg}$.

TABELA 1. Resultado geral dos níveis de contaminação de ocratoxina A nas diferentes frações de grãos de café.

	Via Seca							Via Úmida	
	Verde	Cereja	Seco	Varrição	Mistura	Bóia	Cereja + Verde	Cereja descascado	Cereja despolpado
0,0 - 0,0 n/d	7	3	4	24	56	15	3	14	2
0,1 - 5,0	4	1	0	37	29	8	6	4	0
5,1 - 10,0	1	0	0	15	3	6	1	0	0
10,1 - 20,0	0	0	0	16	3	2	0	0	0
20,1 - 50,0	0	0	0	7	6	0	1	0	0
50,1 - 100,0	0	0	0	5	0	4	0	0	0
> 100,00	0	0	0	2	0	0	0	0	0
Total	12	4	4	106	97	35	11	18	2

Resultado Geral dos Níveis de Contaminação de Ocratoxina A em Grãos de Café

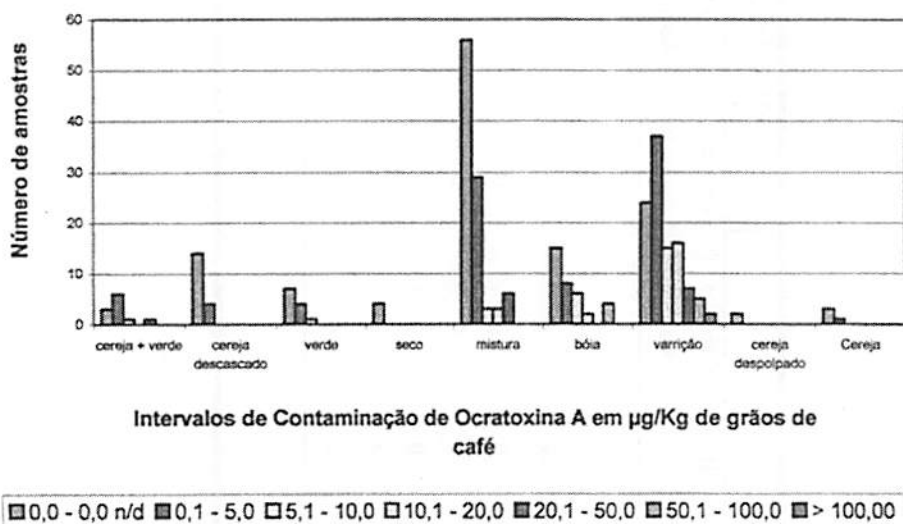


FIGURA 1. Resultado geral dos níveis de contaminação de ocratoxina A nos diferentes tipos de amostras de grãos de café

TABELA 2. Contaminação geral das amostras grãos de café por ocratoxina A e a porcentagem nos diferentes níveis de contaminação.

Intervalos de contaminação de ocratoxina A em µg/Kg	Número de Amostras	Porcentagem (%)
0,0 - 0,0 n/d	128	44,3
0,1 - 5,0	89	30,8
5,1 - 10,0	26	8,99
10,1 - 20,0	21	7,27
20,1 - 50,0	14	4,84
50,1 - 100,0	9	3,11
> 100,00	2	0,69
Total	289	100

De acordo com os resultados obtidos neste estudo, a porcentagem de amostras contaminadas, bem como os níveis acima de 5,0 µg/Kg, são influenciados também pela fração de café analisada, bóia, varrição, cereja, e pelo tipo de processamento, descascado e despulpado, além do método de análise, do limite de detecção do método, entre outros.

Em todas as frações analisadas ocorreu uma porcentagem variada de amostras não contaminadas, apesar de ser identificada a presença de fungos produtores de ocratoxina A mesmo em frações de café que possuem um risco maior como café bóia, e principalmente o café de varrição. Acreditamos que isto tenha ocorrido devido, primeiro ao fato de que as condições ambientais e/ou população microbiana não tenha favorecido o desenvolvimento dos fungos ocratoxigênicos e produção da ocratoxina A; segundo, uma vez colonizado o grão, as condições favoráveis para a produção de ocratoxina não ocorreram, e se ocorreram, não houve tempo e/ou nutrientes suficientes para a síntese da ocratoxina A; e terceiro, a composição química dos grãos de café que possuem compostos como a cafeína e os ácidos clorogênicos atua com uma barreira natural, fato já bastante estudado (Suárez-Quroz et al., 2004) em isolados geneticamente mais sensíveis a esta composição química.

A figura 2 mostra uma tendência de contaminação das amostras de café como ocratoxina A, os resultados indicam que quanto maior o nível de contaminação, menor é o número de amostras. As amostras de grãos de café analisadas tendem a ter níveis baixos de contaminação e os níveis considerados altos (acima de 20µg/Kg) são esporádicos dentro do total de amostras analisadas.



FIGURA 2. Distribuição de ocratoxina A nas amostras analisadas

Resultados semelhantes foram obtidos por Taniwake et al. (2003) e Iamanake & Taniwake (2003) segundo os quais se pode observar uma maior ocorrência de contaminação de ocratoxina A nas amostras de grãos de café até $5,0\mu\text{g}/\text{Kg}$ e raras contaminações acima de $20\mu\text{g}/\text{Kg}$.

Romani et al. (2000) observaram, também, uma maior concentração de amostras em níveis mais baixos de contaminação com ocratoxina A nas amostras de grãos de café dos continentes Americano e Asiáticos. Um perfil semelhante de contaminação de amostras de grãos de café coletadas no continente americano foi observado por Prado et al. (2004), com a grande maioria das amostras contaminada abaixo de $5,0\mu\text{g}/\text{Kg}$ e poucas amostra acima de $20\mu\text{g}/\text{Kg}$.

Os resultados da Tabela 3 demonstram o efeito da fração varrição dentro do conjunto de amostras analisadas. Retirando as amostras dessa fração, em 56,83% das amostras analisadas não foi detectada a presença de ocratoxina A e 85,24% das amostras apresentaram contaminação abaixo de $5\mu\text{g}/\text{Kg}$. Incluindo a parcela varrição, estes valores foram reduzidos para 44,3 e 75,1%, respectivamente.

Tabela 3. Contaminação geral das amostras grãos de café por ocratoxina A em porcentagem nos diferentes níveis de contaminação com e sem a fração varrição.

Níveis de contaminação de Ocratoxina A	Porcentagem (%) sem varrição	Porcentagem (%) com varrição
0,0 - 0,0 n/d	56,83	44,3
0,1 - 5,0	28,41	30,8
5,1 - 10,0	6,01	8,99
10,1 - 20,0	2,73	7,27
20,1 - 50,0	3,83	4,84
50,1 - 100,0	2,19	3,11
> 100,00	0	0,69
Total	100	100

Conseqüentemente, elevando o número de amostras em classes de níveis mais elevados de contaminação com ocratoxina A, a presença da fração varrição aumentaria o risco da presença de ocratoxina A.

A varrição já é considerada por pesquisadores e produtores como um café de baixa qualidade organoléptica, e neste estudo fica evidente que a varrição também representa um risco para a segurança do café devido à presença de ocratoxina A.

Conforme Tabela 4, observa-se que 42,86% das amostras de café bóa analisadas não apresentaram contaminação com ocratoxina A, e 34,28% das amostras apresentaram níveis de contaminação superiores a 5µg/Kg, confirmando que esta fração apresenta um maior risco de contaminação por conter frutos mal formados e injuriados (insetos, doenças, agentes de clima, etc), que se encontram mais expostos às alterações climáticas na lavoura e à contaminação durante todo o ciclo produtivo e de pré-processamento do café.

Tabela 4. Contaminação fração bóia com ocratoxina A, em porcentagem, nos diferentes níveis de contaminação.

Níveis de contaminação em µg/Kg	Número de Amostras	Porcentagem de contaminação (%)	Contaminação média (µg/Kg)
0,0 - 0,0 n/d	15	42,86	Não detectado
0,1 - 5,0	8	22,86	1,80
5,1 - 10,0	6	17,14	7,89
10,1 - 20,0	2	05,71	18,24
20,1 - 50,0	0	—	
50,1 - 100,0	4	11,43	69,58
> 100,00	0	—	
Total	35	100,00	

A fração bóia correspondente a frutos no estágio de maturação passa e seco, que são mais leves e não afundam durante a separação hidráulica do pré-processamento via úmida e apresentam um teor de umidade entre 30 e 40% para os frutos passa e de 20 a 30% para os frutos secos (Chalfoun & Carvalho, 1998). Neste estágio de maturação dos frutos o catabolismo predomina sobre o anabolismo, que é a fase de senescência dos frutos.

As espécies produtoras de ocratoxina, como o *A. ochraceus*, principal espécie ocratoxigênica identificada neste estudo, não é considerada como fitopatogênica, nem endofítica, e sim saprófitas oportunistas (Bars & Bars, 2000). Portanto, a presença de ocratoxina em café bóia pode ser consequência da colonização dos fungos produtores de ocratoxina A em frutos susceptíveis à contaminação ou danificados por insetos, ácaros e/ou condições climáticas adversas como geadas, chuvas de granizo e doenças. Outra explicação seria o fato da ocorrência de ruptura de estruturas da parede celular por modificações nas pectinas, celulose, hemicelulose e lignina nos frutos bóia (Carvalho &

Chalfoun, 1985). Estes compostos dão uma estrutura mais rígida aos frutos de café, sendo que a sua degradação natural torna os frutos mais susceptíveis à contaminação com fungos toxigênicos. Segundo Bucheli & Taniwaki (2002), os frutos que passam do estágio ideal de maturação e secam na árvore do cafeeiro tomam-se um potencial substrato para o desenvolvimento de fungos produtores de ocratoxina A.

Durante o período de senescência dos frutos, as condições climáticas associadas com a presença de microrganismos podem estar favorecendo o desenvolvimento dos fungos e a síntese de ocratoxina ainda na lavoura, podendo ter ocorrido também uma contaminação com fungos ocratoxigênicos ainda na lavoura e a síntese de ocratoxina ter ocorrido no período de secagem, sendo esta situação dependente também do tipo de terreno, tempo e condições de secagem.

A Tabela 5 demonstra os resultados de contaminação das amostras de café de varrição, em apenas 22,64% das amostras não foi detectado a presença de ocratoxina A, na grande maioria, 77,36%, foi detectada a presença de ocratoxina A, sendo que duas amostras apresentaram níveis superiores a 100µg/Kg de grãos de café. Podemos observar também que exceto nos níveis de contaminação acima de 10µg/Kg de grãos de café a média dos valores encontrados nas amostras é superior às médias dos níveis de contaminação, mostrando, assim, a superioridade dos valores de ocratoxina A encontrados nas amostras, em comparação com as demais frações de café.

O café de varrição, além de apresentar um maior número de amostras contaminadas, apresenta também os valores mais elevados. Resultados semelhantes foram observados por Moraes et al. (2002), segundo os quais a maior incidência de amostras contaminadas ocorreu no café de varrição.

TABELA 5. Contaminação da fração varrição com ocratoxina A, em porcentagem, nos diferentes níveis de contaminação.

Níveis de contaminação em µg/Kg	Número de Amostras	Porcentagem de contaminação (%)	Contaminação média (µg/Kg)
0,0 – 0,0 n/d	24	22,64	Não detectado
0,1 - 5,0	37	34,91	1,76
5,1 - 10,0	15	14,15	7,32
10,1 - 20,0	16	15,09	15,27
20,1 - 50,0	7	6,60	28,01
50,1 - 100,0	5	4,72	71,98
> 100,00	2	1,89	181,97
Total	106	100	

A presença de ocratoxina A em café de varrição é maior em frequência dos níveis e valores médios, isto se deve em grande parte ao tempo que os frutos ficam em contato com o solo. O solo é o habitat natural dos fungos produtores de ocratoxina A identificados neste estudo; uma vez em contato com o solo, o período de secagem destes frutos será maior devido à umidade do solo, ficando, assim, os frutos mais tempo em condições favoráveis à colonização e síntese de ocratoxina A.

A presença de materiais de baixa qualidade, tais como frutos danificados e com casca, é um dos mais prováveis de uma série de parâmetros que contribuem para a presença de ocratoxina A em café (Bucheli et al., 2000).

A quantidade de defeitos gerados em uma propriedade pode influenciar a concentração de ocratoxina A (Bucheli et al., 1998); quanto maior o número de defeitos, maior o risco da presença de ocratoxina A em café. Carvalho & Chalfoun (1985) observaram que o maior número de defeitos, como ardido, preto e verde, estava em frutos que foram coletados no chão.

A parcela varrição é reconhecidamente a mais comprometida em termos de quantidade de microrganismos considerados indesejáveis para a qualidade do café, de qualidade organoléptica e de segurança (contaminação por ocratoxina A). Ressalta-se que em virtude da natureza das informações, não se pode afirmar o período em que os frutos permaneceram em contato com o solo.

Conforme Tabela 6, em 57,72% das amostras de café tipo mistura não foi detectada a presença de ocratoxina A; 12,38% das amostras apresentaram contaminação acima de 5,0 µg/Kg sendo que 6 amostras, 6,18%, apresentaram contaminação elevada, entre 20,1 – 50,0 µg/Kg de grãos de café.

A fração mistura também apresenta um fator de risco, uma vez que contém frutos que seriam separados pelo processamento hidráulico, dando origem ao café bóia (uma parcela que apresenta um risco maior para a presença de ocratoxina A). Sendo assim, a presença de ocratoxina A no café mistura pode ser devida à presença de frutos que dariam origem à fração bóia.

TABELA 6. Contaminação da fração mistura com ocratoxina A, em porcentagem, nos diferentes níveis de contaminação.

Níveis de contaminação em µg/Kg	Número de Amostras	Porcentagem de contaminação (%)	Contaminação média (µg/Kg)
0,0 - 0,0 n/d	56	57,72	Não detectado
0,1 - 5,0	29	29,90	1,22
5,1 - 10,0	3	3,10	6,32
10,1 - 20,0	3	3,10	17,24
20,1 - 50,0	6	6,18	31,38
50,1 - 100,0	0	--	--
> 100,00	0	--	--
Total	97	100	--

As condições de secagem também podem contribuir para a presença de ocratoxina A, pois os frutos ficam mais tempo no terreiro, devido à desuniformidade de maturação dos frutos, e conseqüentemente dos níveis de umidade. Dependendo das condições de secagem (tipo de terreiro e clima) e com carga microbiana incluindo fungos produtores de ocratoxina A, criar-se-ia um ambiente favorável à síntese de ocratoxina A.

O tempo de secagem é muito importante, uma vez que a produção de ocratoxina A que ocorre em café com atividade de água de 0,85 a 0,99 foi observada em um período médio de 5 a 7 dias, e a 0,99, de 2 a 4 dias (Suárez-Quiróz et al., 2004); conseqüentemente, para reduzir o risco da presença de ocratoxina A são necessárias técnicas que visem reduzir a atividade de água para níveis inferiores aos que possibilitam a ocorrência da ocratoxigenesis.

Conforme os dados da Tabela 7, 27,27% das amostras de café cereja+verde não apresentaram contaminação com ocratoxina A, e 81,82% das amostras apresentaram contaminação abaixo de 5,0µg/Kg de grãos de café, em uma amostra foi detectado um valor elevado de ocratoxina A, 42,91 µg/Kg.

A fração cereja+verde é gerada apenas nas propriedades que fazem a separação hidráulica dos frutos, sendo assim, estas amostras foram coletadas no terreiro. Apesar de parte do nével de contaminação poder ter sido gerado no campo, pode-se inferir também que o tipo e as condições do terreiro em que estas amostras foram coletadas podem ter influenciado significativamente na contaminação dos fungos e na concentração de ocratoxina A detectada.

TABELA 7. Contaminação da fração café cereja + verde com ocratoxina A, em porcentagem nos diferentes níveis de contaminação.

Níveis de contaminação em µg/Kg	Número de Amostras	Porcentagem de contaminação	Contaminação média
0,0 - 0,0 n/d	3	27,27	Não detectado
0,1 - 5,0	6	54,55	1,45µg/Kg
5,1 - 10,0	1	9,09	6,14 µg/Kg
10,1 - 20,0	0	-	
20,1 - 50,0	1	9,09	42,91 µg/Kg
50,1 - 100,0	0	-	
> 100,00	0	-	
Total	11	100	

Os frutos cereja+verde na lavoura com uma umidade alta são também mais favoráveis à contaminação com outros fungos, como *Cladosporium cladosporioides*, *Fusarium*, *Penicillium*, além de leveduras e bactérias (Silva, 2004). Estes fungos podem inibir o desenvolvimento de fungos toxigênicos e a produção de ocratoxina A, pois o *A. ochraceus*, principal espécie produtora de ocratoxina identificada neste estudo, produz a ocratoxina A em uma atividade de água em torno de 0,85; estas condições foram observadas quando o café começou a secar na planta ou no terreno.

A capacidade do *A. ochraceus* para colonizar um nicho ecológico e produzir micotoxinas é primeiramente determinada pela sua relativa capacidade competitiva com outras espécies contaminantes. Isto é importante para identificar o potencial para capturar fontes primárias de nutrientes (Lee & Magan, 1999). Em milho, o *A. ochraceus* é um importante colonizador pré e pós-colheita; a interação entre *A. ochraceus* e outras espécies de fungos varia consideravelmente de acordo com a atividade de água e temperatura. A interação entre *A. ochraceus* e espécie do gênero *Fusarium* mostra que em 0,98 a_w , *F.*

moniliforme e *F. proliferatum* foram mais competitivos sobre grãos de milho em termos de infecção de sementes. Entretanto, em menor nível de atividade de água, o *A. ochraceus* foi mais dominante (Lee & Magan, 1999). De acordo com Mc Leane & Berjak (1987), é possível que as espécies de *Aspergillus* sejam xerotolerantes e não xerofílicas. Conforme já foi relatado, a frequência destas espécies é maior em baixa atividade de água devido a sua incapacidade de competir com espécies de fungos como *Fusarium*, *Cladosporium* e *Alternaria* quando mais água está disponível. Em um ecossistema, e um grãos pode ser considerado como tal, há um grande número de fatores envolvidos que irão determinar a espécie dominante; o próprio grão é um dos fatores e outros incluem a temperatura, a atividade de água e a interação entre as espécie.

De acordo com Bars & Bars (2000), as espécies de *Aspergillus* ocratoxigênicas como o *A. ochraceus* não são fitopatogênicas nem endofíticas; sendo assim, a contaminação por ocratoxina A em frutos sadios não seria possível. Estes fungos são saprófitas e oportunistas, a presença de ocratoxina A neste tipo de amostra pode ser devido a injúrias como as provocadas por *H. hampei* conhecido como a broca do café, o qual, segundo Vega & Marcadier (1998), é um vetor de *A. ochraceus*. A broca ataca os frutos de café em qualquer estágio de maturação, levando em seu corpo conídios de *A. ochraceus*, as suas fezes, junto com os componentes, do café tornam o ambiente favorável ao desenvolvimento dos fungos e síntese de ocratoxina A em frutos de diferentes estádios de maturação. Uma outra possibilidade é a colonização por fungos toxigênicos de frutos de café no estágio cereja danificados por fungos fitopatogênicos causadores de doenças como a Cercosporiose, causada pelo fungo *Cercospora coffeicola* Berk e Cooke e por insetos como a mosca da fruta, e danos mecânicos que irão deixar expostas a polpa e mucilagem para o desenvolvimento de fungos.

Bucheli et al. (2000), analisando café robusta, indicam que a ocratoxina A tem uma tendência maior de estar presente em frutos “overripe” (passa ou seco) e cereja danificados do que em frutos verdes e cereja, que normalmente não contêm ocratoxina A. A partir de tais informações, é provável que a ocratoxina tenha sido produzida também durante o período de secagem dos frutos.

Conforme Tabela 8, em 77,77% das amostras de cereja descascado não foi detectada a presença de ocratoxina A e 100% apresentaram níveis abaixo de 5µg/Kg de grãos de café. Os resultados demonstram que a retirada da casca (descascado) ou da casca e mucilagem reduzem a contaminação dos grãos, forte indicativo de que os fungos e a ocratoxina estão concentrados na casca até o momento do benefício. Adiciona-se o fato de que estas parcelas são obtidas através do uso de frutos cereja teoricamente com baixos níveis de contaminação.

Os frutos de café cereja, quando colhidos normalmente, não apresentam contaminação com ocratoxina A (Bucheli et al., 2000).

TABELA 8. Contaminação fração café cereja descascado por ocratoxina A, em porcentagem nos diferentes níveis de contaminação.

Níveis de contaminação em µg/Kg	Número de Amostras	Porcentagem de contaminação (%)	Contaminação média (µg/Kg)
0,0 - 0,0 n/d	14	77,77	Não detectado
0,1 - 5,0	4	22,23	1,00
5,1 - 10,0	0	—	
10,1 - 20,0	0	—	
20,1 - 50,0	0	—	
50,1 - 100,0	0	—	
>100,0	0	—	
Total	18	100	

A presença de ocratoxina A em cafés cereja descascado pode ser devido à presença de frutos levemente brocados, sendo que a broca é considerada um vetor de fungos ocratoxigênicos. As condições de secagem também podem influenciar, o tipo de terreiro, o clima e a espessura das camadas e a remoção diária do café. Segundo Bucheli et al. (2000), a casca do café é o principal substrato para o desenvolvimento de fungos ocratoxigênicos.

A remoção da casca, além de eliminar uma quantidade de inóculo, acelera o período de secagem, diminuindo o risco de desenvolvimento dos fungos e produção de ocratoxina, apesar de expor uma pequena quantidade da mucilagem, substrato favorável para o desenvolvimento dos fungos e outros microrganismos. Segundo Bucheli & Taniwaki (2002), a qualidade inicial dos frutos colhidos, a presença de fungos produtores de ocratoxina A e as condições do local de processamento podem certamente contribuir para a formação de ocratoxina A em café processado via úmida.

Das amostras de frutos de café verde (Tabela 9) analisadas, em 58,33% não foi detectada a presença de ocratoxina A e, em 91,66%, os níveis de contaminação ficaram abaixo de 5,0 µg/Kg de grãos de café verde.

Levando em consideração que as espécies toxigênicas de *Aspergillus* produtoras de ocratoxina A identificadas neste estudo não são consideradas fitopatogênicas nem endofíticas, a colonização e produção de ocratoxina A em frutos de café verde não seria possível. De acordo com Bucheli & Taniwaki (2002), a ausência de ocratoxina A em frutos verde é explicada pela extrema firmeza dos frutos e pela possível baixa quantidade de açúcares livres. Sendo assim, a presença de ocratoxina A em frutos de café verde pode ser devida à presença de frutos brocados, uma vez que a broca é um vetor de fungos ocratoxigênicos (Veja & Mercadier, 1998), além de falhas no período de secagem, associadas com as condições climáticas.

TABELA 9. Contaminação da fração fruto verde por ocratoxina A, em porcentagem nos diferentes níveis de contaminação.

Níveis de contaminação em µg/Kg	Número de Amostras	Porcentagem de contaminação (%)	Contaminação média (µg/Kg)
0,0 - 0,0 n/d	7	58,33	Não detectado
0,1 - 5,0	4	33,33	1,35
5,1 - 10,0	1	8,34	8,48
10,1 - 20,0	0	--	
20,1 - 50,0	0	--	
50,1 - 100,0	0	--	
> 100,1	0	--	
Total	12	100	

Das quatro amostras de frutos seco na planta analisadas, em nenhuma foi detectada a presença de ocratoxina A (Tabela 10). Todas as amostras foram coletadas no mesmo município (Pratinha-MG), local onde normalmente o período de colheita do café é seco e com baixa umidade do ar; estes podem ser os fatores responsáveis pela ausência da ocratoxina A nestas amostras.

TABELA 10. Contaminação da fração fruto seco por ocratoxina A, em porcentagem nos diferentes níveis de contaminação.

Níveis de contaminação em µg/Kg	Número de Amostras	Porcentagem de contaminação	Contaminação média
0,0 - 0,0 n/d	4	100	Não detectado
Total	4	100	

Das quatro amostras de fruto cereja analisadas, 100% apresentaram contaminação abaixo de 5,0µg/Kg de grãos de café (Tabela 11) e uma amostra apresentou uma contaminação de 0,22µg/Kg. Estes resultados foram semelhantes ao obtido por Taniwaki et al. (2003), segundo os quais de 6 amostras analisadas, a média de contaminação foi de 0,12 µg/Kg com os valores variando de não detectado a 0,4µg/Kg de grãos de café. Bucheli et al. (2000) observaram que as amostras de café verde e café cereja apresentaram apenas traços de contaminação com ocratoxina A, com uma média 0,3µg/Kg. Segundo os autores, a integridade, a firmeza dos frutos cereja e a disponibilidade de açúcares no pericarpo podem afetar o desenvolvimento dos microrganismos.

Conforme discutido anteriormente, na amostra de café cereja+verde as espécies de *Aspergillus* ocratoxigênicas como o *Aspergillus ochraceus* não são fitopatogênicas nem endofíticas; sendo assim, a contaminação por ocratoxina A em frutos sadios não seria possível. Estes fungos são saprófitas e oportunistas e a presença de ocratoxina A neste tipo de amostra pode ser devida a injúrias provocadas por insetos, entre eles a broca do café. Segundo Vega & Marcadier (1998), a broca é um vetor de *Aspergillus ochraceus*.

TABELA 11. Contaminação da fração cereja por ocratoxina A, em porcentagem nos diferentes níveis de contaminação.

Níveis de contaminação em µg/Kg	Número de Amostras	Porcentagem de contaminação (%)	Contaminação média (µg/Kg)
0,0 – 0,0 n/d	3	75	Não detectado
0,1 - 5,0	1	25	0,22
Total	4	100	

Uma outra possibilidade é a colonização por fungos toxigênicos de frutos de café no estágio cereja, danificado por fungos fitopatogênicos causadores de doenças como a Cercosporiose, ou por insetos como a mosca da fruta e danos mecânicos que irão deixar expostas a polpa e a mucilagem para o desenvolvimento de fungos. Neste sentido, a produção de ocratoxina A pode ocorrer durante o período de secagem, quando os nutrientes e o teor umidade se tornam mais favoráveis. Joosten et al. (2001), trabalhando com café robusta, observaram que nos frutos recém-colhidos não foi detectada a presença de ocratoxina A nas amostras; entretanto, após 5 e 10 dias de secagem a quantidade de ocratoxina A foi de 1,7 e 6.9 µg/Kg, respectivamente. Bucheli et al. (2000), analisando café robusta, indicaram que a ocratoxina A tem uma maior tendência de estar presente em frutos cereja danificados do que sobre frutos cereja sadios, que normalmente não contêm ocratoxina A. Bucheli & Taniwaki (2002) alertam que nos frutos cereja, após serem seco e beneficiados, as partículas da casca contendo ocratoxina A geradas após o beneficiamento podem ser misturadas com os grãos sadios, comprometendo a amostra.

As duas amostras de café cereja despulpado não apresentaram contaminação com ocratoxina A (Tabela 12). Frank (1999), citado por Bucheli & Taniwaki (2002), informa que o processamento úmido parece ser menos susceptível à contaminação com *Aspergillus* produtores de ocratoxina A.

TABELA 12. Contaminação das amostras grãos de café (café cereja despulpado) por ocratoxina A, em porcentagem nos diferentes níveis de contaminação.

Níveis de contaminação em µg/Kg	Número de Amostras	Porcentagem de contaminação	Contaminação média
0,0 - 0,0 n/d	2	100	Não detectado
Total	2	100	

Segundo Bucheli et al. (2000), a casca do café é o principal substrato para o desenvolvimento de fungos ocratoxigênicos. A remoção da casca, além de eliminar uma quantidade de microrganismos produtores de ocratoxina A, acelera o período de secagem, diminuindo o risco de desenvolvimento dos fungos e a produção de ocratoxina A. Entretanto, a qualidade inicial dos frutos colhidos, a presença de fungos produtores de ocratoxina A e as condições do local de processamento podem certamente contribuir para a formação de ocratoxina A em café processado via úmida (Bucheli & Taniwaki, 2002).

3.1 Análise de Correspondência entre os Níveis de Contaminação de Ocratoxina A com as diferentes Frações de Grãos de Café.

Esta análise tem por objetivo associar o nível de contaminação ao tipo de amostras analisadas, bem como indicar similaridades e/ou dissimilaridades entre as amostras de grãos de café avaliadas. Desta forma, procederam-se os seguintes resultados a partir da Tabela 1: Os resultados apresentados na Tabela 13 evidenciam que 2 componentes explicam aproximadamente 92% da variabilidade Total. Esse fato torna-se apropriado à análise das proporções (linha e coluna) em um gráfico bi-dimensional.

TABELA 13. Análise de componentes principais para a Tabela de contingência níveis de contaminação × amostras de grãos de café.

Eixo	Inertia	Proporção	Prop. Acum.
1	0,2004	0,7186	0,7186
2	0,0565	0,2024	0,9210
Total	0,2789		

Os resultados apresentados por meio da Tabela 14 indicam que os níveis de contaminação 0-0n/d; 5,1-10,0 e 10,1-20,0 apresentaram maiores contribuições em relação ao componente 1, ao passo que os demais níveis foram mais relevantes para o componente 2. Especificamente para o maior nível de contaminação (>100), em ambos os componentes a contribuição foi baixa.

Os resultados apresentados por meio da Tabela 15 indicam que as frações cereja descascado, mistura e varrição apresentam maior variabilidade no componente 1, ao passo que as frações bóia e cereja+verde apresentaram uma contribuição mais relevante no componente 2. Convém salientar que as demais frações apresentaram contribuições poucas expressivas e de baixa magnitude aos componentes. Em virtude dos resultados relativos às contribuições apresentadas nas Tabelas 14 e 15, segue o mapa perceptual para as devidas proporções avaliadas (perfis). Para uma melhor interpretação da figura 3, nas Tabelas mencionadas acima cada grupo é representado por uma cor.

TABELA 14. Coordenadas e Contribuições dos níveis de contaminação nos dois primeiros componentes.

Níveis de Cont.	Perfil	Componente 1		Componente 2	
		Coord.	Contr.	Coord.	Contr.
0-0n/d	0,443	-0,440	0,429	-0,083	0,054
0,1-5,0	0,308	0,127	0,025	0,173	0,164
5,1-10,0	0,090	0,621	0,173	-0,250	0,100
10,1-20,0	0,073	0,775	0,218	0,091	0,011
20,1-50,0	0,048	0,227	0,012	0,511	0,224
50,1-100	0,031	0,803	0,100	-0,888	0,435
>100	0,007	1,115	0,043	0,316	0,012

TABELA 15. Coordenadas e Contribuições para as amostras dos grãos de café nos dois primeiros componentes.

Café	Perfil	Componente 1		Componente 2	
		Coord.	Contr.	Coord.	Contr.
Cer.Verd	0,038	0,059	0,001	0,403	0,109
Cer.Desc	0,062	-0,702	0,153	-0,110	0,013
Ver.	0,042	-0,364	0,027	-0,048	0,002
Sec.	0,014	-0,984	0,067	-0,350	0,030
Mist.	0,336	-0,355	0,211	0,129	0,098
Bóia	0,121	0,185	0,021	-0,569	0,694
Varr.	0,367	0,499	0,456	0,075	0,037
Cer.	0,014	-0,667	0,031	-0,080	0,002
Cer.Desp	0,007	-0,984	0,033	-0,350	0,015

Conforme os resultados mostrados na Figura 3, torna-se evidente a associação entre as amostras de café e os níveis de contaminação. É importante ressaltar que a formação desses grupos foi feita analisando as contribuições comuns a i -ésimo componente ($i=1,2$) mostradas nas Tabelas 13 e 14. Um outro resultado importante é que os grupos são dissimilares entre si, ao passo que os elementos de cada grupo são similares entre si.

Com base nestes resultados, a partir dos níveis de contaminação fica claro a formação de quatro grupos de amostras, sendo estes grupos diferentes entre si e as amostras dentro do mesmo grupos, semelhantes nos perfis de contaminação. Os diferentes tipos de amostras apresentam um maior ou menor risco para a ocorrência de ocratoxina A. O grupo da varrição e o grupo do café bóia representam uma maior risco para a presença de ocratoxina A acima do limite de $5,0\mu\text{g/Kg}$ de café. São amostras que, por seu histórico, são comprometidas com altos risco de contaminação com ocratoxina A.

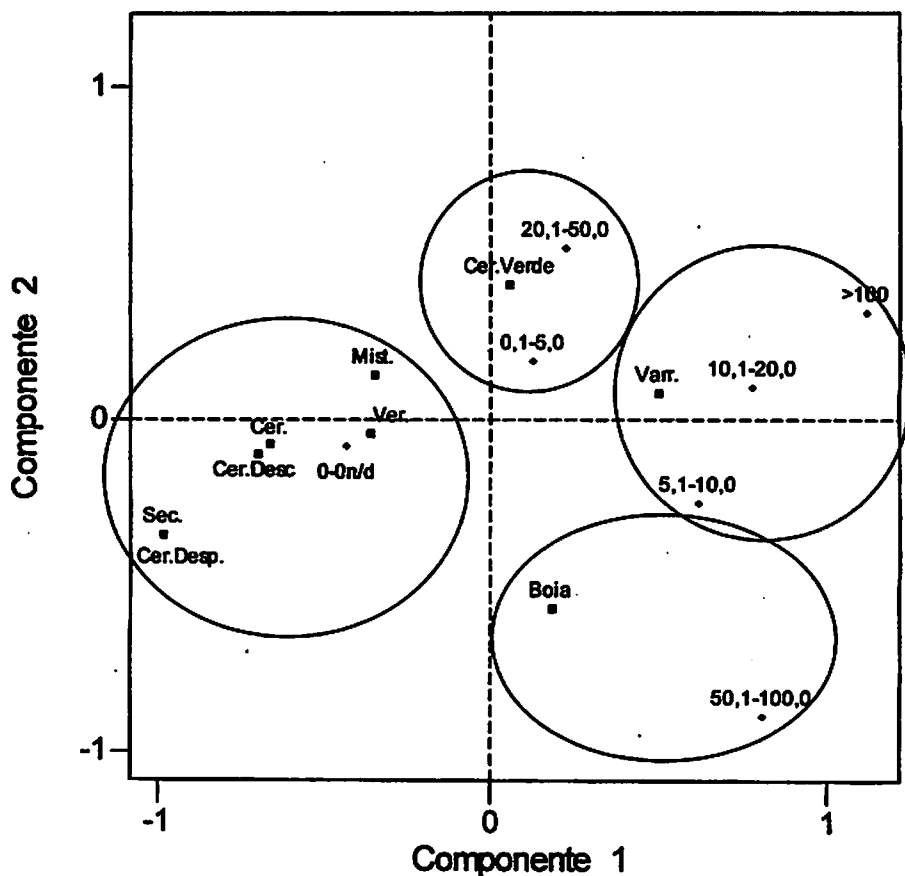


FIGURA 3. Gráfico dos perfis (Níveis de contaminação de ocratoxina A x frações de grãos de café).

A varrição, por ter ficado em contato com o solo, fonte natural de fungos toxigênicos, inclusive dos produtores de ocratoxina A, é composta de frutos que, devido a este processo, irão apresentar também um maior número de defeitos e, conseqüentemente, um maior risco para a presença de ocratoxina A.

As espécies de *Aspergillus* produtoras de micotoxinas são comuns em áreas quentes, subtropicais e tropicais do que em regiões temperadas do planeta (Wilson et al., 2002). Em período de temperaturas mais elevadas e de seca, várias espécies de *Aspergillus* aumentam rapidamente em associação com cereais. Em climas tropicais, as espécies de *Aspergillus* são comuns em solo, sobre vegetação e no ar (Lacey, 1994)

Em amendoim os fatores mais importantes que favorecem e controlam a contaminação com *A. flavus* e aflatoxinas são o local, a umidade e a temperatura do solo e os danos provocados por insetos (Wilson et al., 2002).

Segundo Wilson et al. (2002), a maturidade dos frutos de café na colheita afeta a susceptibilidade dos grãos para a contaminação com ocratoxina A; os frutos bóia são os que estão em processo de senescência na lavoura, e são mais susceptíveis à contaminação com fungos, ou são frutos fisiologicamente alterados ou que sofreram danos provocados por insetos, doenças ou injúrias climática. Para Bucheli et al. (2000), a presença de materiais de baixa qualidade, tais como frutos danificados e colhidos após o estágio ideal de maturação, é um dos mais prováveis parâmetros que contribuem para a presença de ocratoxina A. Em milho, no Estado da Geórgia, nos Estados Unidos, estresse como adensamento das plantações, fertilidade e doenças interagem com o meio ambiente, podendo aumentar ou reduzir o risco de contaminação com aflatoxinas produzidas por *A. flavus* (Wilson et al., 2002). Amostras representativas destas duas frações, independentemente do processamento que irão sofrer após a colheita (processamento seco ou úmido e tipo de secagem), poderão apresentar problemas de contaminação pelo fungo e pela ocratoxina A, podendo ser agravada a contaminação com ocratoxina A caso não sejam manuseadas adequadamente. As aflatoxinas, e possivelmente a ocratoxina A podem ser produzidas no campo durante a formação ou durante o processamento

de secagem e má estocagem dos grãos (Wilson et al., 2002). Vega & Marcadier (1998) isolaram *A. ochraceus* da broca do café, que é o único inseto capaz de perfurar os grãos de café em todos os estádios de maturação. Dos mais de 800 insetos relatados sobre os frutos de café, a broca é o único capaz de utilizar o café como fonte de alimento (Vega et al., 2003). Na pré e na pós-colheita, os insetos que atuam como vetores de fungos ocratoxigenicos e insetos que causam danos no frutos de café podem aumentar o risco de contaminação com ocratoxina A (Wilson et al., 2002).

A separação dos defeitos (Bucheli et al., 2000) e a seleção dos grãos por peneiras (Nasser, 2001) podem reduzir o risco de contaminação com ocratoxina A. Desde que a casca é significativa fonte de ocratoxina A, o beneficiamento adequado e a seleção de grãos são métodos efetivos para a redução dos níveis de ocratoxina A em grãos de café (Viani, 2002).

Para o grupo do cereja+verde, apesar de representar um risco, um processamento pós colheita como via úmida e uma secagem adequada podem reverter esta situação, dando origem a café descascado ou despolpado e a café verde, que fazem parte do grupo de amostras com perfis muito baixos, isentos de contaminação.

O grupo formado principalmente pelas amostras mistura, cereja, verde, seco, cereja descascado e cereja despolpado ficou agrupado em níveis de menor risco de contaminação com ocratoxina A.

A Tabela 16 descreve que estes grupos se diferenciam pelos riscos de rejeição de lotes, se considerarmos somente as amostras contaminadas, e também de exposição da ocratoxina A à saúde dos consumidores.

TABELA 16. Média de contaminação das amostras positivas e os valores caso ocorra uma redução de 80% durante a torração.

Tipo de amostra	n. de amostras contaminadas	Média das amostras contaminadas em $\mu\text{g/Kg}$	Estimativa considerando redução 80% na torração (em $\mu\text{g/Kg}$)	Porcentagem em relação ao nível proposto pela EU
Via Seca				
Bóia	20	18,82	3,76	75,20
Varição	82	16,33	3,27	65,40
Cerj + verde	8	7,24	1,45	29,00
Mistura	41	7,18	1,43	28,60
Cereja	1	0,22	0,04	0,80
Verde	6	2,31	0,46	9,20
Via Úmida				
Cerj Desça	4	1,00	0,20	4,00
Cerj Despo	3	3,33	0,66	13,20

Levando em consideração a afirmação de Viani (2002) que durante o processo de torração e café solúvel até 90% os níveis de ocratoxina A podem ser reduzidos, os riscos apresentados pelos grupos estudados poderiam variar, ao mesmo tempo em que os limites em estudo para café torrado e solúvel seriam reduzidos para 5,0 $\mu\text{g/Kg}$ (Verstraete, 2004).

Com os resultados da Tabela 16, as amostras de café bóia após a torração ficariam mais próximas do limite em proposta pela União Européia e teriam uma contaminação de aproximadamente 75% deste limite proposto.

A varrição teria 65,40% do limite de 5,0 $\mu\text{g/Kg}$, enquanto a fração bóia teria 75,20% deste limite. Estas duas frações apresentariam um maior risco de rejeição no mercado europeu. As frações cereja +verde e mistura apresentam

praticamente o mesmo valor após a torração, com uma porcentagem de 26,60% e 29,00%, respectivamente; apresentando um risco mínimo de rejeição estão as amostras processadas via úmida e os frutos cereja e verde.

3.2 Riscos de Intoxicação ao Consumidor com Relação às Amostras Analisadas

De acordo com o JECFA, um nível seguro aceitável de ocratoxina A é de 100 ng/peso corpóreo/semana, cerca de 14,3 ng/peso corpóreo/dia (Soares, 1999). Para uma pessoa de 60 Kg, isso significa aproximadamente 857 ng/dia. Se levamos em consideração que não ocorra perda de ocratoxina A durante o preparo da bebida do café, para um consumidor de 60 Kg que consome 4 xícaras de café por dia (24 g de café torrado), que é o consumo *per caput* nos países europeus (WHO, 2001), e considerando o valor médio encontrado nas amostras bóia e varrição, o nível de ocratoxina A corresponderia a 90,24 e 78.48ng/dia, respectivamente. Estas amostras de grãos de café iriam contribuir com 10,52%, no caso do café bóia e 9,16%, da varrição, em relação ao limite permitido pelo JECFA. As amostras cerja +verde e mistura que apresentaram resultados muito próximos na média de contaminação corresponderiam a 34,56ng/dia e estariam contribuindo com cerca de 4,03% do limite estabelecido pelo JECFA. As demais amostras teriam uma contribuição inferior à do cereja descacado que seria de 15,84 ng/dia cerca de 1,85% do limite de segurança estabelecido pelo JECFA.

No Brasil, o consumo *per caput* de café é de 3 a 4 xícaras, cerca de 25g de café torrado e moído. Considerando um adulto brasileiro de 70 Kg, este adulto teria um consumo diário de 94ng/dia caso o café fosse proveniente da amostra bóia, 81,75 ng/dia se consumisse a amostra de varrição, 36 ng/dia se o consumo fosse das amostras mistura ou cereja + verde e inferior a 16,5 ng/dia se consumisse qualquer uma das outras amostras, o que corresponderia a 10,94; 9,54; 4,20 e 1,92 %, respectivamente, do limite permitido pelo JECFA.

Estes resultados demonstram que as amostras de café bóia e varrição apresentariam para os consumidores um maior risco de exposição à ocratoxina A e as amostras processadas via úmida e os frutos cereja e verde apresentariam um risco extremamente baixo.

3.3 Ocorrência de ocratoxina A em função das localidades estudadas

Objetivando associar as localidades em função dos níveis de contaminação de ocratoxina A detectados nas amostras de grãos de café analisadas, foi realizada a técnica de agrupamento com análise de cluster por variáveis com a função de verificar inicialmente a similaridade entre as localidades avaliadas. Conforme os resultados apresentados na Figura 4, pode-se notar que os dois primeiros níveis de contaminação apresentam-se similares, desta forma, sugere-se a classificação das localidades em função de dois grupos, sendo estes representativos por Grupo 1 ($> 5,00 \mu\text{g/k}$) e Grupo 2 ($0,00 \mu\text{g/k}$; $\leq 5,00 \mu\text{g/k}$).

Similaridade

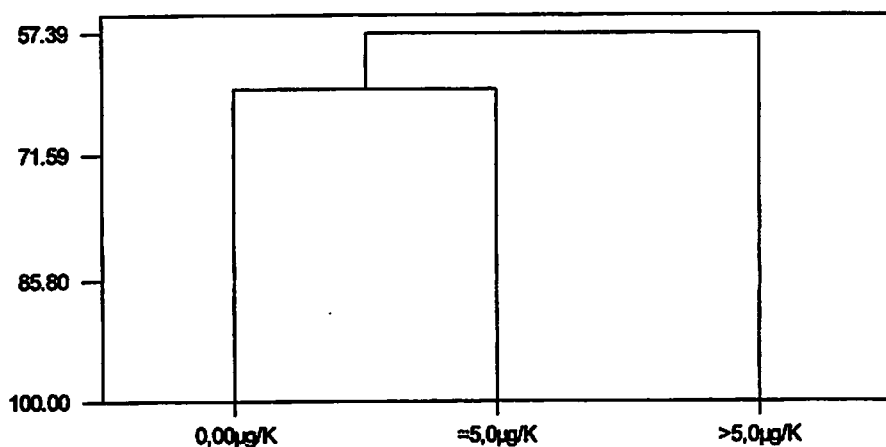


FIGURA 4 – Dendrograma para os níveis de contaminação com ocratoxina A

De acordo com os resultados preliminares proporcionados pela Figura 4, procedeu-se a classificação das localidades em função de dois grupos. Os resultados seguem abaixo utilizando a análise de cluster para k-médias (Bussab et al., 1990).

Os resultados encontrados na Tabela 17, além de mostrarem quantas observações foram classificadas para cada grupo, permitem nomear os grupos formados com base na distância média, de tal forma que ao grupo que apresentou menor distância (entre $0,0 - \leq 5,0\mu\text{g/Kg}$ e $\geq 5,0\mu\text{g/Kg}$) denomina-se localidades que apresentam um maior risco de contaminação, acima de $5,0\mu\text{g/Kg}$, principalmente das amostras do tipo varrição, ao passo que o grupo de maior média (maior distância entre $0,0 - \leq 5,0\mu\text{g/Kg}$ e $\geq 5,0\mu\text{g/Kg}$) é nomeado como o das localidades que apresentam menor risco de contaminação, acima de $5,0\mu\text{g/Kg}$. As localidades classificadas no grupo 1 apresentam tanto o número de amostras não contaminadas como o número de amostras contaminadas com níveis abaixo de $5,0\mu\text{g/Kg}$ e acima de $5,0\mu\text{g/Kg}$ próximos. Nas localidades do grupo 2, a maior parte das amostras analisadas apresentaram níveis de contaminação entre $0,0$ e $\leq 5,0\mu\text{g/Kg}$.

Os resultados das Tabela 18 demonstram que independentemente das localidades estudadas, a maior parte das amostras contaminadas com níveis acima de $5,0\mu\text{g/Kg}$ são provenientes da fração varrição, com especial atenção às amostras classificadas no grupo 1.

TABELA 17 – Resultados preliminares da análise de cluster por k-médias

	Número de Observações	Distância média
Grupo 1	6	4.177
Grupo 2	5	6.640

TABELA 18. Agrupamento das localidades, em função dos grupos formados pela análise de cluster por k-médias e as frações que apresentaram contaminação acima de 5,0µg/Kg

0,00µg/Kg	≤5,0µg/Kg	>5,0µg/Kg	Localidade	Classificação	V	B	M	Outros
12	6	9	Boa Esperança	1	9	-	-	-
6	9	13	Carmo do Rio Claro	1	8	-	5	-
8	3	6	Cássia	1	5	-	1	-
9	10	10	Guaxupé	1	2	3	3	2
8	3	7	Monte Santo de Minas	1	7	-	-	-
6	3	6	São Sebastião do Paraíso	1	5	-	1	-
8	12	3	Campestre	2	3	-	-	-
12	14	6	Campos Gerais	2	5	1	-	-
17	12	3	Machado	2	1	1	1	-
21	14	9	Poços de Caldas	2	-	7	1	1
21	3	0	Pratinha	2	-	-	-	-

V = varrição, B = bóia, M = mistura, outros = representa os demais tipos de amostras de grãos de café analisadas.

Algumas localidades apresentam particularidades, onde são possíveis as inferências de eventuais efeitos climáticos, características daquelas localidades que estejam favorecendo a infecção dos fungos produtores de ocratoxina A

Nas propriedades localizadas sobre a influência da represa de Furnas, em cidades como Boa Esperança e Carmo do Rio Claro, pode ocorrer o acúmulo de ar frio durante a noite e a formação de neblina nas primeiras horas do dia, seguida de altas temperaturas durante o dia, condições que favorecem a ocorrência de processos fermentativos (Cortez, 1997). Nesta localidades foi encontrados o maior número de amostras da fração varrição, com níveis de contaminação acima de $5,0\mu\text{g/Kg}$. Este fenômeno climático pode aumentar a umidade do ar e do solo, o que torna os frutos mais susceptíveis à contaminação como fungos e à produção de ocratoxina A.

De acordo com Krug (1941), a infecção por fungos é mais intensa em cafés secos no chão, sem distinção da região estudada no estado de São Paulo; este fato se explica facilmente porque, no chão, as condições de umidade são sempre mais favoráveis aos fungos. A umidade do solo pode ter sido um dos fatores favoráveis à produção de ocratoxina A nas amostras de varrição destas localidades. Taniwaki et al. (2003) afirmam que a maior fonte da infecção dos frutos de café por fungos produtores de ocratoxina A foi o solo, os equipamentos e os terreiros de terra.

Cotty et al. (1994) afirmam que a localização geográfica exerce uma grande influência na frequência de contaminação, sendo que o ciclo de contaminação pode ser contínuo, esporádico ou infrequente com base na localidade e no tipo de grãos produzido.

Em Poços de Caldas destaca-se a contaminação com valores acima de $5,0\mu\text{g/Kg}$ em amostras de café bóia, o que pode ter ocorrido em consequência de o clima da região ser de maior altitude, com maiores índices de precipitação

(média de $1399\text{mm}^3/\text{m}^2$ por ano) e, conseqüentemente, mais úmido, o que prolonga a secagem do café na lavoura, favorecendo o desenvolvimento de fungos e a produção de ocratoxina A. Segundo Camargo (1985), normalmente as precipitações aumentam como o aumento da altitude quando a colheita e a secagem do café são realizadas sob condições de elevada umidade e é lenta a secagem dos grãos. Como a polpa dos frutos de café é um substrato favorável ao desenvolvimento microbiano, haverá condições satisfatórias para o desenvolvimento de fermentações com microrganismos que deterioram o produto.

De acordo com Cortez (1997), as condições climáticas de cidades como Guaxupé, Machado, Monte Santo de Minas e São Sebastião do Paraíso, com moderada deficiência hídrica aliada a baixas temperaturas, são desfavoráveis à ocorrência de processo fermentativos nos frutos de café. Esta pode ser uma das condições que explicam a baixa ocorrência de café bóia com contaminação acima de $5,0\mu\text{g}/\text{Kg}$ nestas localidades.

Nas localidades em que não foram observados fatores climáticos que poderiam estar influenciando diretamente na infecção dos fungos ocratoxigênicos e na produção de ocratoxina A, atribuímos esta ocorrência principalmente a falhas no processamento do café desde a lavoura até o final da secagem, ao mesmo tempo não descartamos a possibilidade de ocorrência de chuvas durante o processamento, o que pode ter acarretado este valor de contaminação.

Em Monte Santo de Minas, na propriedade 04, onde foram detectados níveis de 94, 7 e $181,86\mu\text{g}/\text{Kg}$ de ocratoxina A observaram-se várias falhas no processamento, tais como: o café era derriçado no chão; não era feita a lavagem do café, separando aos frutos de diferentes estádios de maturação; o terreiro era pequeno pelo volume de café originado da colheita, eram feitos alguns montes, que esperavam a completa secagem do café que já estava no terreiro.

Moraes & Luchese (2004) observaram que uma das amostras que apresentou níveis de ocratoxina A acima de 500µg/Kg na propriedade em que a derriça dos frutos era feita no chão.

Em Carmo do Rio Claro, as condições climáticas, associadas à falta de Boas Práticas Agrícolas, podem ter sido os fatores responsáveis pelos níveis elevados de ocratoxina A em amostras de café mistura. O uso de lavador separando os frutos de diferentes estádios de maturação, os teores de umidade e as impurezas trazidas da lavoura fornecem uma secagem mais uniforme dos grãos.

Os resultados da Tabela 2 demonstram que, dependendo da região, os diferentes tipos de amostras apresentaram uma maior ou menor risco de contaminação com ocratoxina A. As amostras do tipo bóia apresentaram um maior risco de contaminação em regiões de altitude elevada e com maior umidade do que em regiões com maior deficiência hídrica.

Prado et al. (2004) afirmam que a origem das amostras tem um efeito significativo na concentração de ocratoxina A em grãos de café. Os autores analisaram amostras de diferentes países e observaram que as amostras de café do continente africano apresentaram uma média de contaminação superior à média encontrada em países dos continentes asiático e americano, entretanto a contaminação com fungos ocratoxigênicos não foi significativamente superior à dos outros continentes estudados.

Romani et al. (2000) avaliaram amostras de café de diferentes localidades da África, Ásia e América Latina. De acordo com os autores, as amostras provenientes das África apresentaram os maiores níveis de ocratoxina A e as amostras contaminadas foram mais frequentes do que as amostras provenientes da América Latina. Os autores afirmam que este fato ocorre provavelmente devido a ambos os fatores, as condições climáticas e o tipo de processamento do café nas diferentes áreas estudadas.

De acordo com Robledo et al. (2001), a posição geográfica do local de origem das amostras de café que apresentaram altos índices de contaminação com ocratoxina A foram as principais responsáveis por estes resultados, a região se caracteriza por ser chuvosa e a seca ocorre na época da floração e altas temperaturas. Para os autores deste estudo, estas condições favorecem o desenvolvimento de fungos e a produção de micotoxinas tanto na lavoura como no período em que o café está armazenado.

Lee & Magan (2000) demonstram que a umidade e a temperatura são essenciais para que o *A. ochraceus* possa dominar um nicho ecológico e produzir ocratoxina A. Em milho nas condições de maior umidade, o *A. ochraceus* não é competitivo com o *Fusarium*, que através do seu potencial enzimático consegue capturar as principais fontes nutricionais, restando para outros fungos como o *A. ochraceus* fontes secundárias, o que resulta em fraco crescimento e baixa produção de ocratoxina A.

Com as condições ambientais controlam o desenvolvimento dos fungos e a produção de ocratoxina A, Bucheli et al. (1998) relatam que a fraca correlação que existe entre a quantidade de ocratoxina A e a presença de fungos produtores desta toxina indica que a contaminação com ocratoxina A não ocorre no período de armazenamento, mas está mais ligada às condições de produção do café na lavoura e/ou durante a secagem.

Os esporos de fungos normalmente contaminam a superfície dos grãos e a umidade e a temperatura são fatores cruciais que irão determinar a taxa de germinação e qual espécie irá se desenvolver. Esta atividade fúngica pode causar rápida deterioração dos grãos, perda de matéria seca, do valor nutritivo, e também a produção de micotoxinas (Magan & Lacey, 1988). Para Krug (1941) a infecção por fungos em café ocorre no momento em que o café começa a secar, a intensidade desta infecção depende da localização do cafezal.

3.4 Cultivares

O universo amostral constituiu-se de cultivares da espécie arábica, sendo que todas as propriedades cultivavam duas ou mais cultivares, com predominância das tradicionalmente cultivadas, Catuaí (86,0%) e Mundo Novo (80,0%). Outras cultivares, como Icatu, Acaiaí, Bourbon, e Catucaí, também foram identificadas em menor escala, conforme representado na figura 2. Segundo Matiello (1986), embora todas as cultivares sejam susceptíveis à contaminação por fungos e síntese de micotoxinas, particularmente a ocratoxina A, sua adaptação à região de cultivo e seu manejo com relação a fatores como espaçamento utilizado, podas e controle fitossanitário, entre outros, podem afetar indiretamente a incidência dos fungos toxigênicos e a síntese da ocratoxina A.

Os resultados observados neste estudo demonstraram que a presença de ocratoxina A nas amostras de café são mais influenciadas pelas condições ambientais e pelo pré-processamento do café desde a lavoura até o armazenamento, tendo pouca ou nenhuma influência no tipo de cultivar.

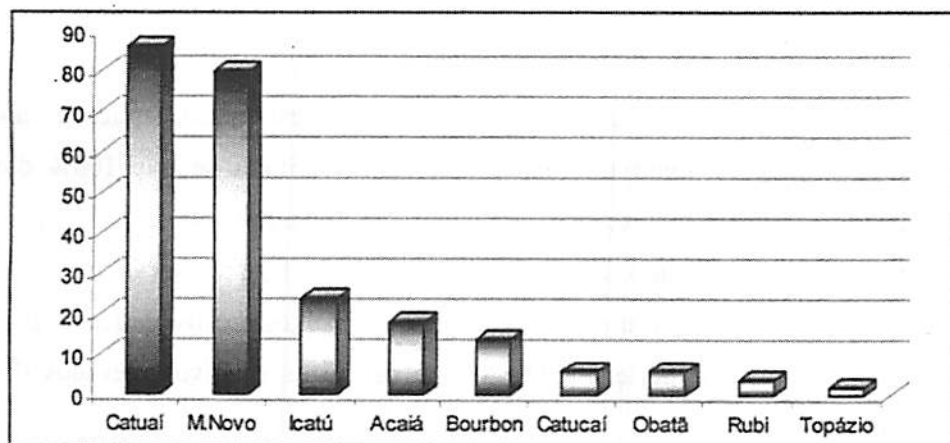


FIGURA 5. Variedades de Café *Coffea arabica* identificadas neste estudo.

A composição química do substrato irá influenciar o tipo e a quantidade da toxina produzida pelos fungos toxigênicos. Conforme Clifford et al. (1989), a composição química das variedades de café arábica são muito próximas, principalmente com relação à quantidade de cafeína e de ácidos clorogênicos. Sendo assim, a diferenciação da composição química das variedades estudadas não estaria influenciando tanto os níveis de ocratoxina A detectados nos diferentes tipos de amostras.

Pasin & Abreu (2000) com o objetivo de avaliar a incidência fúngica e a presença de ocratoxina A em grãos de café de diferentes cultivares, observaram que a incidência de *Aspergillus ochraceus* foi evidente em todas as cultivares estudadas, entretanto a cultivar Icatu apresentou uma maior porcentagem de grãos infectados quando processados via úmida, diferindo consideravelmente das demais. Todavia, esta mesma cultivar, quando processada pela via seca, apresentou a menor incidência deste fungo. Segundo os autores, este fato pode ter ocorrido em consequência da alta incidência de *Cladosporium*. A ocorrência de ocratoxina A foi detectada em apenas uma amostra da cultivar Rubi.

3.5 Adubação

Com base nos dados coletados no questionário aplicado aos cafeicultores ou responsáveis pela propriedade, verificou-se que 100% dos produtores declararam executar as adubações minerais no solo com os macronutrientes nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K) e adubação foliar com Cobre (Cu), Boro (B) e Zinco (Zn), a despeito dos baixos preços praticados para o produto durante o período 2001/2002 e os custos relativos elevados dos insumos.

Como todos os produtores declararam realizar a adubação com minerais no solo e foliar, não foi possível fazer uma correlação com os níveis de

ocratoxina A detectados nas frações estudadas. Entretanto, estes dados indicam um elevado grau de conscientização dos produtores no sentido de que o bom estado nutricional das lavouras deve ser mantido prioritariamente, sem o que a produtividade, a longevidade das plantas e a qualidade final do produto seriam comprometidas.

O manejo adequado da adubação tem efeitos no vigor da planta e, por conseguinte, pode afetar a susceptibilidade à contaminação ao desenvolvimento dos fungos e à síntese de ocratoxina A. Portanto, este é um fator indispensável na composição de um Programa de Boas Práticas Culturais.

Segundo Carvalho et al. (2002), em situação de desequilíbrio nutricional as plantas ficam mais vulneráveis, pois direta ou indiretamente os elementos minerais estão envolvidos nestes mecanismos de susceptibilidade das plantas aos agentes patogênicos.

Carvalho et al. (2002) observaram que níveis médios e altos de adubação de N, K e B no solo diminuem a infecção de cercosporiose nos frutos de café, uma doença que poderia favorecer a infecção secundária de fungos produtores de ocratoxina A através da lesão causada pelo fungo *Cercospora* sp.

Pasin et al. (2002) observaram que todos os micronutrientes (Cu, Zn, Mn, e B), aplicados isoladamente, foram efetivos na redução da incidência de fungos como *A. ochraceus*, *Fusarium semitectum* e *Cladosporium cladosporioides*. Entretanto, quando esses foram aplicados em associação, esse efeito não foi verificado; a presença de ocratoxina A não foi detectada em nenhuma das 12 amostras analisadas, mesmo quando se detectou a presença de *A. ochraceus* em amostras com 50% de infecção.

Frank (1999) afirma que a perda de vigor das plantas do cafeeiro é um fator que contribui com a infecção dos grãos por fungos produtores de ocratoxina A, mas nem toda perda de vigor é efetivamente igual. Para o autor, os fatores mais importantes na redução e prevenção de infecção dos grãos de café

são a competição com os microrganismos presentes nos frutos de café e a respostas imune da planta contra a invasão de outros microrganismos.

3.6 Controle Fitossanitário

Conforme dados da Tabela 19, a maioria das propriedades estudadas declarou efetuar o controle fitossanitário através da utilização das seguintes classes de fungicidas: triazóis (63,7%), cúpricos e triazóis (30,05%), cúpricos (0,5%), orgânicos e cúpricos (5,7%).

A maioria dos produtores declarou utilizar fungicida sistêmico do grupo dos triazóis específico para o controle da ferrugem do cafeeiro (*Hemileia vastatrix*). O método convencional de combate à ferrugem é o uso de fungicidas cúpricos para a prevenção e controle do inóculo inicial, e os sistêmicos curativos são utilizados para diminuir a taxa de progresso da doença.

TABELA 19. Frequência de aplicação de tratamentos fitossanitários e níveis de ocratoxina A.

Níveis de Ocratoxina A (µg/Kg)	Triazóis		Cúpricos		Triazóis + Cúpricos		Orgânico + Cúprico		Total	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
0,00 – 0,1	56	45,5	0	0	29	50,0	2	18,18	87	45,1
0,1 – 5,0	35	28,5	1	100	15	25,9	2	18,18	53	27,5
5,1 – 10,0	11	8,9	0	0	8	13,8	2	18,18	21	10,1
10,1 – 20,0	11	8,9	0	0	6	10,3	2	18,18	19	9,8
20,1 – 50,0	7	5,7	0	0	0	0,0	1	9,09	8	4,1
50,1 – 100,0	3	2,4	0	0	0	0,0	1	9,09	4	2,1
> 100	0	0,0	0	0	0	0,0	1	9,09	1	0,5
Total	123	63,7	1	0,5	58	30,05	11	5,70	193	100

O controle de doenças que afetam as folhas, ramos e frutos contribui indiretamente para a manutenção da sanidade das plantas e frutos e diretamente impedindo a penetração de fungos através de lesões causadas aos frutos.

Outros produtos utilizados como os cúpricos e orgânicos, controlam doenças como a cercosporiose, mancha aureolada e antracnose. A prevenção de doenças e pragas na lavoura é uma das Boas Práticas Agrícolas para prevenir a presença de micotoxinas em produtos agrícolas (<ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/mycotoxin-manual.pdf>). Um ataque de pragas e doenças aos frutos provocará sua má-formação, ocasionando ainda manchas, aderência da casca e queda; as lesões causadas servirão de entrada aos microrganismos, proporcionando fermentações indesejáveis e redução na qualidade do produto (Souza, 1996), podendo ocorrer, como consequência desta infecção, a produção de micotoxinas pelos fungos potencialmente toxigênicos.

Oliveira (1972), citando Bitencourt, afirma que as pulverizações em cafeeiros com calda bordaleza (Sulfato de Cobre) a 1% levam a uma melhoria da qualidade por evitarem fermentações e deteriorações por microrganismos.

O efeito de fungicidas sobre fungos produtores de micotoxinas tem sido estudado *in vitro*, e principalmente sobre a produção de aflatoxinas em *A. flavus* e *A. parasiticus*. D'Mello et al. (1998), revisando vários autores, descrevem que o fungicida thiabendazole foi efetivo na redução de aflatoxina em milho tratado, porém a concentração do fungicida foi o fator determinante neste efeito. O fungicida Carbendazim, adicionado como Bavistin, estimula o crescimento de *A. flavus* e *A. ochraceus* em meio líquido em níveis de até 100µg/ml, com a aflatoxina e a ocratoxina permanecendo no valor do controle, mas em níveis de 2-3mg/ml; ambos, o crescimento e a produção de micotoxinas, foram totalmente inibidos. Níveis sub-inibitórios de miconazole estimulam a produção das quatro

aflatoxinas produzidas por *A. parasiticus* e o triciclazole reduz a produção das quatro aflatoxinas em concentração superior a 100µg/ml.

Com relação aos níveis de ocratoxina A detectados, verificou-se que nas amostras em que os grupos químicos mais utilizados foram os triazóis e triazóis + cúpricos, os teores de ocratoxina A nas amostras apresentaram 74% e 75,9%, respectivamente, dentro do nível tolerável de ocratoxina A, ou seja, de até 5ng/g (Tabela 19). Entretanto, não podemos afirmar que tais fungicidas estejam exercendo um efeito fungicida direto sobre os fungos produtores de ocratoxina A, uma vez que estes fungicidas são produzidos para controlar fungos como aos agentes causais da ferrugem, cercosporiose e não *Aspergillus*.

D'Mello et al. (1998) relatam a ineficácia de fungicidas para controlar fungos produtores de micotoxinas como *Aspergillus* e *Fusarium*. De acordo com os autores, esta afirmação não é completamente incompatível, uma vez que, tais fungicidas foram desenvolvidos para o controle de doenças e não necessariamente contra a produção de micotoxinas. Em doses sub-letais de alguns fungicidas e inseticidas tem ocorrido até mesmo um estímulo à produção de micotoxinas como a aflatoxina.

Em café a redução de riscos da presença de ocratoxina A pode ocorrer futuramente através de plantas geneticamente modificadas com resistência à infestação por insetos que atuam como vetores de fungos ocratoxigênicos ou até mesmo de *A. ochraceus* e *A. carbonarius*, principais espécies responsáveis pela presença de ocratoxina A em grãos de café.

A produção de plantas geneticamente modificadas tem uma grande importância econômica pela possibilidade de incorporar novas características agrônômicas à plantas cultivadas, como resistência a insetos e patógenos, além da melhora de qualidade do produto, sendo que, no café, as plantas geneticamente modificadas com gene de *Bacillus thuringiensis* com resistência a insetos já estão em fase de teste (Pereira et al., 1999).

Minorshy (2002) afirma que cultivares de milho geneticamente modificado com gene de *Bacillus thuringiensis* que codifica uma proteína que dá à planta uma resistência a insetos, foram mais resistentes à contaminação com *Fusarium* produtor de fumonisina. O *Ostrinia nubilalis*, conhecido como a broca dos cereais europeus, às vezes leva à infecção do *Fusarium* ainda no campo e, conseqüentemente, à produção de fumonisina. Estudos realizados em 3 anos indicaram uma menor ocorrência de fumonisina em milho transgênico (1,3µg/g) do que em milho não transgênico (11,8µg/g).

3.7 Separação Hidráulica

No presente estudo verificou-se que acima de 90% dos produtores declararam efetuar a separação hidráulica dos frutos (Lavagem dos frutos). Os produtores declararam utilizar este procedimento principalmente pela vantagem sobre o fluxo da secagem e pela redução do risco de contaminação de microrganismos de frutos sadios pelos frutos bóia.

O efeito da separação hidráulica pode ser observado pelas amostras que apresentaram maior ou menor risco de contaminação, conforme demonstrado no anteriormente; as amostras do tipo bóia apresentaram maior risco de contaminação com ocratoxina A do que as amostras de frutos cereja+verde. Se a parcela cereja+verde for direcionada para o processamento via úmido, o risco de ocorrência da ocratoxina A reduz ainda mais. Conseqüentemente, a lavagem ou separação hidráulica dos frutos de café proporciona a separação de amostras que apresentam diferentes riscos de presença de ocratoxina A, além da separação de impurezas.

De acordo com Matiello (1991), lavagem mecânica é o método tradicionalmente utilizado com o objetivo de eliminar as impurezas que vêm junto com os frutos de café, tais como folhas, torrões, paus, terra e pedra, e separar por densidade os café mais leves (passa ou seco), chamados de bóia dos

café mais pesados (frutos cereja e verde). Segundo Chalfoun & Carvalho (1998), a utilização de hipoclorito de sódio e quaternários de amônio (Fegatex) na água de lavagem reduz o número de microrganismos presente nos frutos de café.

De acordo com Bucheli & Taniwaki (2002), a infecção com fungos produtores de ocratoxina A e a formação de ocratoxina podem ocorrer ainda na planta em frutos que já passaram do estágio de maturação cereja.

Qualquer que seja o encaminhamento do café para a secagem, visando a obtenção do café natural (seca do fruto integral) ou a obtenção do café descascado ou despulpado, a separação hidráulica é capaz de separar os frutos com alta umidade (cerejas e verdes) dos frutos com baixo teor de umidade (parcela bóia), formando lotes mais homogêneos.

A separação de frutos contendo grãos defeituosos (mau formandos, brocados, injuriados por outros fatores bióticos ou abióticos) é também possibilitada pela separação na água da parcela menos densa, que bóia.

3.8 Pré-Processamento via seca e via úmida

Dos dois métodos de pré-processamento dos frutos de café, via seca e via úmida, conforme representado na Tabela 20, verificou-se que 50,01% das propriedades utilizam o processamento via seca, no qual os frutos são secos integralmente, obtendo-se o café denominado natural, e 49,98% utilizam o processamento via úmido e, conseqüentemente, o processamento via seca para os café que bóiam.

TABELA 20. Freqüência de diferentes tipos de preparo do café nas localidades estudadas.

Município	Via Seca		Via Úmida		Total	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Poços de Caldas	2	4,16	2	4,16	4	8,32
Machado	1	2,08	4	8,35	5	10,43
Campestre	5	10,42	0	0,00	5	10,42
Monte S. Minas	1	2,08	3	6,25	4	8,32
Boa Esperança	2	4,16	2	4,16	4	8,32
Cássia	0	0,00	5	10,42	5	10,42
Guaxupé	4	8,35	1	2,08	5	10,43
Carmo R. Claro	1	2,08	2	4,16	3	6,24
Campos Gerais	3	6,25	2	4,16	5	10,42
São S. Paraíso	1	2,08	2	4,16	3	6,24
Pratinha	4	8,35	1	2,08	5	10,43
Total	24	50,01	24	49,98	48	≈ 100

O valor relativamente elevado de adoção do preparo via úmida indica uma tendência de adoção deste método anteriormente pouco utilizado, através do qual se obtêm os cafés descascados e despulpados obtidos por meio da remoção da casca, polpa e mucilagem, respectivamente, por fermentação e mecanicamente. Seguindo o mesmo raciocínio anterior, prevê-se que com o descascamento ou despulpamento se esteja eliminando a principal fonte de contaminação dos grãos. Outra vantagem da aplicação do sistema de preparo via úmida é a redução do volume de café na secagem, reduzindo o seu período e área de terreiro e de secadores necessária para a secagem, melhorando o fluxo desse processo.

No processamento via seca é de grande importância a prévia separação hidráulica do café, o que permite a separação das frações cereja e verde do bóia, com suas umidades e conseqüentes tempos de secagem diferentes e riscos de presença de fungos e síntese de micotoxinas.

O preparo via seca dá origem aos “cafés naturais”, os quais por secarem integralmente, apresentam características qualitativas diferenciadas dos cafés descascados e despulpados (obtidos por via úmida). No entanto, a tecnologia de secagem deve ser adequada para impedir a interferência de fungos que promovem fermentações indesejáveis da mucilagem que são transferidas para os grãos. O mesmo pode ocorrer se os fungos sintetizarem micotoxinas, uma vez que pesquisas como as de Bucheli et al. (2000) demonstraram que a maior concentração de ocratoxina A situava-se na casca.

Resultados experimentais obtidos por pesquisadores da EPAMIG recomendam a adição do produto Fegatex (cloreto de benzalcônio) ou produto equivalente na água do lavador. Estes produtos impedem que os frutos que venham contaminados por microrganismos ainda no campo contaminem frutos sadios (Chalfoun & Carvalho, 1998).

Favarín et al. (2004) revisando vários autores, relatam que o processo fermentativo pela ação de microrganismos como bactérias fungos e leveduras deteriora as membranas dos grãos. Entretanto, se o fenômeno é interrompido após a retirada da casca e mucilagem dos frutos, o endosperma não é comprometido e a qualidade dos grãos é preservada. A continuidade do processo fermentativo implica na quebra das paredes e membranas celulares, degradação de camadas celulares e alteração de compostos químicos do grão, resultando em sabor e odor desagradável.

Conforme Anexo A, em que se encontram representados os valores dos níveis de contaminação das amostras, observa-se que o preparo via úmida,

incluindo o descascamento e despulpamento, permitiu a obtenção de amostras enquadradas em níveis mais baixos de ocratoxina A (100% abaixo de 5ng/g), indicando que esta fica concentrada na casca e/ ou que o manejo do café descascado ou despulpado é mais eficiente na prevenção do desenvolvimento de fungos e síntese da ocratoxina A.

De acordo com Bucheli et al. (2000) há uma tendência de que a contaminação com ocratoxina A ocorra mais em frutos mais maduros (passa ou seco) e danificados do que em frutos verdes e cereja, esta ausência é explicada em parte pela extrema firmeza dos frutos e, possivelmente, também pela baixa quantidade de açúcares, situações que não favorecem o desenvolvimento de fungos.

Como o processamento úmido retira a casca, a polpa e a mucilagem dos frutos de café, elimina uma parte do substrato favorável à produção de ocratoxina A e, conseqüentemente, reduz o risco da presença da ocratoxina A em amostras de café descascado ou desmucilado.

3.9 Secagem

Através do presente estudo verificou-se que 34,7% das propriedades declararam utiliza a secagem mista, utilizando o terreiro até a meia seca e secador até a secagem final.

A utilização do terreiro e do secador como duas alternativas para a secagem do café foi declarada em 51% das propriedades estudadas. Podemos deduzir também a possível ocorrência de secagem mista nestas propriedades.

Em 8,16% das propriedades declarou-se utilizar apenas o terreiro para a secagem do café.

Em 6,12% das propriedades analisadas declarou-se utilizar apenas o secador.

Souza (1996) observou que 61,23% dos cafeicultores utilizaram secagem mista, estes resultados revelaram a preocupação dos cafeicultores em reduzir o tempo de exposição do produto às condições climáticas adversas durante o período de secagem do café.

A capacidade dos terreiros e secadores deve ser compatível com o volume de café que chega ao local de secagem, de tal forma que permita um fluxo de secagem adequada, impedindo a criação de condições favoráveis para o desenvolvimento de microrganismos e síntese de ocratoxina A

Segundo a WHO (2001) uma boa secagem ao sol e a combinação com secagem mecânica dos frutos de café são processos efetivos no controle de fungos produtores de ocratoxina A.

A secagem é uma das etapas mais importantes para a preservação da qualidade do café. Segundo Bucheli & Taniwaki (2002), a secagem também é uma das rotas de contaminação de ocratoxina A.

Segundo Cortez (2001), é indispensável que o café colhido seja preparado o mais rápido possível e submetido à secagem para evitar os processos fermentativos e prejuízos à qualidade do café, e fundamental um manejo correto pós colheita, em particular quanto ao tempo de exposição a microrganismos, os quais iniciam a infecção na planta e persistem após a colheita, e no período de secagem.

As condições de secagem, o manejo da secagem, a presença de microrganismos produtores de ocratoxina A e as condições geográficas e climáticas da área produtora são mais importantes na geração de ocratoxina A em grãos de café do que o método de secagem (Bucheli et al., 2000)

3.9.1 Análise das frações bóia, mistura e varrição versus tipos de terreiro em diferentes níveis de contaminação com ocratoxina A.

A análise estatística das amostras versus o tipo de terreiro foi dada pela comparação dos intervalos de confiança para diferença de duas proporções, considerando um nível de significância fixado em 5%. Desta forma, foram realizadas duas análises cujos resultados são apresentados pelas letras (Ver nota das Tabelas).

De acordo com os resultados analisados a seguir, observa-se que do Total de 234 amostras analisadas, 151 (64,5%) foram secas em terreiro de asfalto, 62 (26,5%) foram secas em terreiro de terra e 21 (9,0%) foram secas em terreiro de cimento. Estes resultados demonstram que houve uma predominância do terreiro de asfalto, seguido pelo terreiro de terra e cimento.

As condições e localização do terreiro que favoreçam uma secagem rápida, são fundamentais para evitar o desenvolvimento de fungos produtores de ocratoxina A. Segundo Bucheli et al. (2000), a formação de ocratoxina A ocorre nos primeiros dias de secagem dos frutos de café. Segundo Taniwaki et al. (1999), o crescimento e a produção de ocratoxina ocorre só durante a secagem dos frutos e grãos de café; se a secagem é rápida e efetiva, a ocratoxina A não será sintetizada.

Bitancourt (1957) cita que é importante um adequado manejo dos frutos após a colheita, pois este diminui infecções microbianas e fermentações indesejáveis. O café seco ao sol seca mais rapidamente, evitando podridões e fermentações causadas por microrganismos. Porém, se houver falta de insolação e alta umidade do ar, os microrganismos poderão causar apodrecimentos, principalmente se estiverem presentes na polpa.

Conforme Tabela 20, das amostras de café bóia analisadas, 80% foram secas em terreiro de asfalto, 21,4% em terreiro de terra e 2,63% em terreiro de cimento.

As amostras de café bóia com níveis de contaminação acima de 20µg/Kg foram secas em terreiro de terra. Os resultados da Tabela 20 indicam também que para as amostras de café bóia o terreiro de asfalto apresentou menos risco do que o terreiro de terra; provavelmente, quando as amostras de café bóia, após saírem do lavador ainda úmidas, são colocadas em contato com o terreiro de terra, favorecem a infecção e a síntese de ocratoxina A por parte dos fungos ocratoxigênicos, condição menos favorecida em terreiro de asfalto, uma vez que o solo parece ser a principal fonte de fungos ocratoxigênicos (Frank, 1999).

TABELA 20. Análise das proporções entre as amostras Bóia e Tipo de Terreiro

AMOSTRA	TIPO DE TERREIRO		
	ASFALTO	TERRA	CIMENTO
(0,1-5,0 µg/Kg)	21aA	01aB	1B
(5,1-20,0 µg/Kg)	07bA	01aB	0
(20,1-> 100,0 µg/Kg)	00cA	04bB	0

Letras minúsculas indicam comparações das proporções para as amostras (Bóias 1,2 e 3)
 Letras maiúsculas indicam comparações das proporções para o tipo de terreiro (A, B, C)

Conforme os resultados observados na Tabela 21, para as amostras de café de varrição praticamente não houve diferença significativa entre os tipos de terreiro para as amostras contaminadas acima de 5,0µg/Kg. Estes resultados sugerem que as amostras do tipo varrição já chegam no terreiro com um grau de infecção de fungos toxigênicos, ou mesmo de ocratoxina A, o que, independentemente do terreiro utilizado, não causara redução de contaminação, podendo ser esta agravada se a amostra não for seca de forma correta. Resultado semelhante é observado nas amostras com níveis de contaminação entre 0,1 e 5,0µg/Kg, para os quais não houve diferença entre os terreiros de terra e de cimento, o que poderia estar contrariando as recomendações de Boas Práticas Agrícolas, para os quais o revestimento de terreiro com cimento favorece a produção de café com menor índice de infecção de microrganismos e proporciona um produto de melhor qualidade.

TABELA 21. Análise das proporções entre as amostras Varrição e Tipo de Terreiro

AMOSTRA	TIPO DE TERREIRO		
	ASFALTO	TERRA	CIMENTO
(0,1-5,0 µg/Kg)	35aA	15aB	9aB
(5,1-20,0 µg/Kg)	11bA	11aA	9aA
(20,1->100,0 µg/Kg)	07bA	06aA	1bB

Letras minúsculas indicam comparações das proporções para as amostras (Varrição 1,2 e 3)
 Letras maiúsculas indicam comparações das proporções para o tipo de terreiro (A, B, C)

A figura 6 ilustra uma amostra de café de varrição e uma amostras de café cereja despolpado, em que é possível observar a deterioração que a fração varrição sofre quando permanece no chão sujeita a ataque de insetos; como podemos observar grãos brocados, a coloração e a camada mais externa dos grãos mostram-se lesionados. São vários os fatores que contribuem para a baixa qualidade do produto, e estes fatores indesejáveis vêm acompanhados de um maior risco de presença de ocratoxina A.

Diferentemente, a fração cereja despolpado apresenta um aspecto mais sadio, uma aparente integridade dos grãos e uma coloração mais uniforme, fatores que contribuem para uma melhor qualidade do produto e, conseqüentemente, um menor risco da presença de ocratoxina A.

Krug (1947) relata que os microrganismos presentes na polpa dos frutos de café se nutrem dos açúcares da polpa; provocando uma secagem rápida da mesma: nestas condições, os frutos secam no pé ou caem e secam no chão. Qualquer umidade a que estes frutos forem expostos pode atingir o grão. Esta água não é pura, e sim uma solução com produtos de decomposição dos microrganismos, bem como suas secreções. Absorção e secreção desses compostos por parte dos grãos é que determina a deterioração no gosto.



FIGURA 6 Grãos de café de varrição Grãos de café cereja despolpado

De acordo com Krug (1941), a infecção por fungos é mais intensa em cafés secos no chão, sem distinção da região estudada no estado de São Paulo; este fato se explica facilmente porque, no chão, as condições de umidade são sempre mais favoráveis aos fungos.

Souza (1996), citando Mendes et al. (1995), afirma que o café preparado via seca é obtido por secagem normal em terreiros cimentados, concretados com tijolos ou asfaltados, devendo ser evitados os terreiros de terra pela dificuldade de manuseio principalmente em épocas de chuvas.

De acordo com os resultados observados na Tabela 22, a maior parte das amostras de café do tipo mistura foram secas em terreiro de asfalto, e há também uma diferença significativa entre os tipos de terreiro de asfalto e de terra, sendo que o terreiro de terra apresenta um maior número de amostras contaminadas nos níveis de contaminação entre 5,1 a 20,0 μ g/Kg e entre os níveis de contaminação de 20,01 a > 100,00 μ g/Kg do que as amostras secas em terreiro de asfalto.

Moraes & Luchese (2004) também observaram maior concentração de ocratoxina A em amostras de café secas em terreiro de terra do que em terreiro de cimento. De acordo com as autoras, o tipo de terreiro é importante na prevenção da contaminação com ocratoxina A, sendo o terreiro de terra mais favorável à contaminação. Diferentemente, Bucheli et al. (2000) observaram que a presença de ocratoxina A foi menor em café seco em terreiro de terra (1,4 μ g/Kg) do que em terreiro de concreto (4,3 μ g/Kg). Entretanto, os autores afirmam que a qualidade dos frutos do café, as condições climáticas durante a secagem, o procedimento de secagem, o inóculo de fungos produtores de ocratoxina A e as condições do local da propriedade são, sem dúvida, mais importante do que o tipo de secagem.

TABELA 22. Análise das proporções entre as amostras Mistura e Tipo de Terreiro

AMOSTRA	TERREIRO		
	TERRA	ASFALTO	CIMENTO
(0,1-5,0 µg/Kg)	14aA	68aB	1C
(5,1-20,0 µg/Kg)	5bA	1bB	0
(20,1->100,0 µg/Kg)	5bA	1bB	0

Letras minúsculas indicam comparações das proporções para as amostras (Mistura 1,2 e 3)
 Letras maiúsculas indicam comparações das proporções para o tipo de terreiro (A, B, C)

3.10 Perfil das amostras contaminadas com níveis de ocratoxina A acima de 5,0µg/Kg

De acordo com os resultados obtidos, em que foram avaliados os resultados obtidos neste estudo, algumas amostras apresentaram um maior risco de contaminação de acordo com a fração de café, a localização, o preparo e o tipo de terreiro em que foram processadas.

As amostras de varrição apresentaram um maior risco de contaminação quando foram coletadas em localidades próximas à de Furnas, conseqüentemente, o seu processamento é via seca, porém não foi observada uma interferência do tipo de terreiro.

As amostras de café bóia apresentaram maior risco quando foram coletadas em propriedades de altitude elevada; foram conseqüentemente processadas via seca (secagem com a casca) e secas em terreiro de terra.

As amostras de café bóia e varrição apresentaram riscos diferentes de acordo com a localização geográfica e as condições climáticas das lavouras.

As amostras mistura apresentam maior risco quando são processadas via seca em terreiro de terra.

As amostras de café descascado e despoldado apresentaram baixo índice de contaminação independentemente da localidade, quando foram secas tanto em terreiro de asfalto quanto em terreiro de cimento.

O perfil das amostras que apresentaram maior risco de contaminação permite traçar estratégias que visam a redução da presença de ocratoxina A em grãos de café. A partir destes resultados podemos observar também que a adoção de Boas Práticas Agrícolas como revestimento do terreiro de secagem, separação hidráulica, seleção de processamento de acordo com as condições climáticas da propriedade período ideal de colheita, evitando que os frutos sequem na planta, e a eliminação ou redução da parcela varrição são medidas que podem reduzir o risco da presença de ocratoxina A em frutos e grãos de café.

4 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos através das análises de ocratoxina A nos diferentes tipos de amostras conclui-se que:

Das as 289 amostras analisadas, em 44,29% não foi detectada a presença de ocratoxina A; em 89 amostras, 30,80%, foi detectada a presença de ocratoxina A em níveis que variaram de 0,1 a 5,0 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de café.

As frações bóia e varrição foram as que apresentaram os níveis mais elevados de exposição ao risco de contaminação por fungos toxigênicos e ocratoxina A;

O conjunto de Boas Práticas e Cultivo e Colheita e Preparo, com a eliminação da varrição, permitiu um resultado final no qual 85,1% das amostras examinadas apresentaram índices de ocratoxina A no intervalo entre 0,0 a 5 $\mu\text{g}/\text{Kg}$.

A presença de ocratoxina A nas diferentes frações é influenciada pelas diferentes condições climáticas. A contaminação da fração bóia foi mais freqüente em regiões de maior altitude e com uma maior média pluviométrica do que em regiões mais secas; a fração varrição foi mais freqüentemente contaminada em regiões próximas a grandes massas de água.

Independentemente da região, o despulpamento e o descascamento do café mostraram-se efetivos na redução do risco da presença de ocratoxina A.

As fracos bóia e mistura apresentaram níveis mais elevados de contaminação com ocratoxina A quando foram secas em terreiro de terra do que em terreiro de asfalto.

A fração varrição, independentemente do tipo de terreiro (asfalto, terra ou cimento), não apresentou relação com os níveis de contaminação com ocratoxina A.

5 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A ameaça à saúde dos consumidores representada por alimentos contaminados com micotoxinas, dentre elas a ocratoxina A, é motivação suficiente para que todos os produtos que constituem a dieta sejam analisados.

Considerando, por outro lado, que a presença de ocratoxina A no produto final resulta de eventos relativos à contaminação por fungos toxigênicos e à ocorrência de condições ambientais e do substrato para que o potencial toxigênico desses fungos se expresse na síntese da micotoxina, toda a cadeia produtiva deve ser examinada quando se pretende elucidar o problema em sua totalidade.

O presente estudo demonstrou que as operações de colheita e de pré-processamento predominantes na cafeicultura brasileira, geram frações (parcelas do produto com características diferenciadas) e tipos de café que apresentam diferentes riscos de exposição à contaminação por fungos toxigênicos e ocratoxina A.

A colheita através do sistema de derriça manual ou mecânica dá origem a uma mistura de frutos que é basicamente separada por um processo hidráulico que dá origem às frações bóia e frutos cerejas e verdes.

Os frutos cerejas separados do café verde podem ainda sofrer diferentes processamentos com a retirada total ou parcial da casca (exocarpo), polpa (mesocarpo externo) e mucilagem (mesocarpo inteiro), dando origem aos cafés cereja descascado e cereja despulpado ou desmucilado.

O café que entra em contato com o chão durante a colheita manual ou mecânica constitui a fração varrição.

Cada fração irá apresentar riscos diferentes para a contaminação, por microrganismos, devido ao seu estágio de maturação, composição química e

presença ou ausência da polpa durante a secagem. O desenvolvimento destes microrganismos ocorre dependendo das condições ambientais e de manejo da lavoura e de pré-processamento.

A adoção de Boas Práticas Agrícolas (BPA's) e Sistema de Análise de Perigo e Pontos Críticos de Controle (APPCC) irá influenciar significativamente tanto na redução do risco de contaminação de microrganismos, nas condições em que pode ocorrer a deterioração dos frutos e grãos de café, como na redução de ocratoxina A.

Dessa forma, foram examinados diferentes frações de café submetidos a diferentes métodos de pré-processamento e provenientes de diferentes municípios do estado de Minas Gerais.

Verificou-se que 24,91 % de 289 amostras analisadas apresentaram-se com níveis de ocratoxina A acima de 5,0 μ g/Kg, nível recomendado como limite para esta micotoxina.

Entre as parcelas examinadas, o maior risco de exposição à contaminação foi representado pelo contato dos frutos com o chão, constituído pela fração varrição, e pelo manejo inadequado do produto após a colheita, através da secagem em terreiros não revestidos.

Há uma tendência demonstrando que quanto maior o número de grãos contaminados com fungos produtores de ocratoxina A, maior o risco de contaminação com a toxina. Estes valores são mais altos em frações que normalmente dão origem a café de baixa qualidade. Observa-se também que as condições ambientais irão influenciar os níveis de ocratoxina A mais do que o número de grãos contaminados, uma vez que a expressão de genes envolvidos na síntese de ocratoxina A é influenciada pelos fatores ambientais.

As condições apontadas como pontos críticos pelo APPCC da cultura do café, como a geração das frações varrição e bóia e a secagem em terreiro de terra

são fatores que, a partir deste estudo, apresentam um maior risco de contaminação com ocratoxina A.

Independentemente do tipo de pré-processamento via seca ou via úmida os riscos de contaminação com ocratoxina A serão influenciadas pela qualidade inicial dos frutos colhidos e pelo pré-processamento adequado durante a lavagem, remoção da polpa (via úmida) e secagem do café. A partir de uma secagem adequada, permanecendo os grãos de café em um teor de umidade 11 a 12%, não haverá disponibilidade de água para o desenvolvimento de fungos ocratoxigênicos e a síntese de ocratoxina A

A fração varrição, reconhecida por normalmente dar origem a cafés de baixa qualidade e com maior número de defeitos, apresenta também um maior risco de contaminação com ocratoxina A. Esta fração deverá ser reduzida através do conjunto de Boas Práticas de Cultivo e Colheita e, no caso de sua ocorrência, ser manejada separadamente das demais frações. Recomendamos, que esta fração seja eliminada da cadeia produtiva para fins de consumo humano

Pesquisas realizadas pela Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais e pela Universidade Federal de Minas Gerais, para o aproveitamento de defeitos (preto verde e ardido) para obtenção de biodiesel, e pelo Instituto de Tecnologia de Alimentos, para a obtenção de óleos comestíveis e industriais, aromatizantes, cosméticos e adubos, são indícios de destinos promissores para a fração varrição.

O terreiro de terra também deve ser evitado, por ser o solo o habitat natural não só de fungos ocratoxigênicos como de outros microrganismos. As frações que foram secas em terreiro de terra apresentaram também um maior risco de contaminação com ocratoxina A do que quando foram secas em terreiro de asfalto ou de cimento.

As frações b6ia e mistura apresentaram n6veis mais elevados de contamina76o com ocratoxina A quando foram secas em terreiro de terra do que em terreiro de asfalto, demonstrando, assim, a import6ncia do revestimento do terreiro para a qualidade e para reduzir os riscos de presen7a de ocratoxina A. A fra76o varri76o, independentemente do tipo de terreiro (asfalto, terra ou cimento), n6o apresentou uma rela76o com os n6veis de contamina76o com ocratoxina A, o que se ocorre, em parte, porque a fra76o varri76o j6 chega no terreiro com elevados 6ndices de contamina76o com fungos e ocratoxina A

O presente estudo veio, desta forma, contribuir para a elucida76o do problema da ocratoxina A no caf6 brasileiro, do qual Minas Gerais participa com aproximadamente 50% da produ76o brasileira, e cujo enfrentamento sugere solu76es peculiares ao sistema de produ76o nacional.

Tais medidas envolvem a ado76o de sistema de Boas Pr6ticas Agr6colas e Boas Pr6ticas de Manejo, que permitir6o a redu76o das fra76es mais expostas aos riscos de contamina76o (varri76o e b6ia) e o aprimoramento das t6cnicas de pr6-processamento, possibilitando a manuten76o dos n6veis aceit6veis de ocratoxina A consolidando, nessas condi76es, o papel do produto caf6 como fonte marginal de ocratoxina A na dieta.

6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABARCA, M. L.; ACCENSI, F.; BRAGULAT, M. R.; CABAÑES, F. J. Current importance of ochratoxin A-producing *Aspergillus* spp. **Journal of Food Protection**, Les Moines, v. 64, n. 6, p. 903-906, June 2001.

✓ BARS, L. L.; BARS, P. L. Mycotoxigenic in Grains Application to Mycotoxic Prevention in Coffee. In: SEMINARIO INTERNACIONAL SOBRE BIOTECNOLOGIA NA AGROINDÚSTRIA CAFEEIRA, 3., 2000, Londrina. **Anais...** Londrina: IAPAR/TRD, 2000. p. 513.

BATISTA, L. R.; CHALFOUN, S. M.; PRADO, G.; SCHWAN, R. F.; WHEALS, A. E. Toxigenic fungi associated with processed (green) coffee beans. (*Coffea arabica* L.). **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 85, n. 3, p. 293-300, Aug. 2003.

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

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

BUCHELI, P.; MEYER, I.; PITTET, A.; VUATAZ, G.; VIANI, R. Development of ochratoxin A during robusta (*Coffea canephora*) coffee cherry drying. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 48, n. 4, p. 1358-1362, Apr. 2000.

BUCHELI, P.; MEYER, I.; PITTET, A.; VUATAZ, G.; VIANI, R. Industrial storage of green robusta under tropical conditions and its impact on raw material quality and ochratoxin A content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 46, n. 11, p. 4507-4511, Nov. 1998.

BUSSAB, W.O.; MIAZAKI, E.S.; ANDRADE, D.F. Introdução à análise de agrupamento. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE PROBABILIDADE E ESTATÍSTICA, 9., 1990, São Paulo. **Anais ...** São Paulo: ABE, 1990. 105p.

CAMARGO, A. P. O clima e a cafeicultura no Brasil. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 11, n. 126, p. 13-25, jun. 1985.

CARVALHO, V. D.; CHALFOUN, S. M. Aspectos qualitativos do café. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 11, n. 126, p. 79-92, jun. 1985

CARVALHO, V. L.; CHALFOUN, S. M.; GUIMARÃES, P. T. G. Influência de teores de N, K, B e Ca das folhas do cafeeiro na incidência de ferrugem (*Hemileia vastatrix* Berk & Br.) e cercosporiose (*Cercospora coffeicola* Berk & Cooke). In: ENCONTRO SUL MINEIRO DE CAFEICULTURA, 3.; SIMPÓSIO DE PESQUISA CAFEIEIRA DO SUL DE MINAS: o café Especial na Rocratoxina A do Lucro, 3., 2002, Lavras. p. 144-150.

CHALFOUN, S. M.; BATISTA, L. R. O Papel dos Microrganismos na Qualidade e Segurança do Café. In: ENCONTRO SUL MINEIRO DE CAFEICULTURA, 8.; SIMPÓSIO DE PESQUISA CAFEIEIRA DO SUL DE MINAS, 3.; SIMPÓSIO DE PESQUISA CAFEIEIRA DO SUL DE MINAS, 3., 2002, Lavras-MG. Anais... Lavras: Editora UFLA, 2002. p. 200-201.

CHALFOUN, S. M.; CARVALHO, V. D. Cafeicultura empresarial: produtividade e qualidade – colheita e preparo do café. UFLA/FAEPE, 1998. 55p.

CLIFFORD, M. N.; WILLIAMS, T.; BRIDSON, D. Chlorogenic acids and caffeine as possible taxonomic criteria in *Coffea* and *Psilanthus*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 28, n. 3, p. 829-838, Mar. 1989.

CORTEZ, J.G. Efeito de espécies e cultivares e do processamento agrícola e industrial nas características da bebida do café.. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba., 2001. 71p

CORTEZ, J. G. Aptidão climática para a qualidade da bebida nas principais regiões cafeeiras de Minas Gerais. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 18, n. 187, p. 27-31, 1997

COTTY, P. J.; BAYMAN, P.; EGEL, D. S.; ELIAS, K. S. Agriculture, aflatoxins and *Aspergillus*. In: POWELL, K. A.; RENWICK, A.; PEBERDY, J. F. (Ed.). **The Genus *Aspergillus*: taxonomy and genetics to industrial application**. Plenum Press, 1994. p. 1-58. (FEMS Symposium, n. 69).

COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TACHNOLOGY – CAST. **Mycotoxins: risks in plant, animal, and human systems**. Ames, 2003. n. 139.

D'MELLO, J. P. F.; MACDONALD, A. M. C.; POSTEL, D.; DIJKSMA, W. T. P.; DUJARDIN, A.; PLACINTA, C. M. Pesticide use and mycotoxin production in *Fusarium* and *Aspergillus* phytopathogens. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 104, n. 8, p. 741-751, Nov. 1998.

EUROPEAN Community, Commission regulation (EC) 472/2002, Amending Regulation (EC) 466/2001 setting maximum level for certain contaminants in food stuffs. **Official Journal of the European Communities**, L75, p. 18-20. 2002.

FAVARÍN, J. L.; VILLELA, A. L. G.; MORAES, M. H. D.; CHAMMA, H. M. C. P.; COSTA, J. D.; DOURADO-NETO, D. Qualidade da bebida de café de frutos cereja submetidos a diferentes manejos pós-colheita. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, p. 187-192, fev, 2004.

FRANK, M. Mycotoxin prevention and decontamination – HACCP and its Mycotoxin Control Potential: an Evolution of ochratoxin A in Coffee production. In: JOINT FAO/WHO/UNEP INTERNATIONAL, 3., 1999, Tunis, Tunisia. **Conference on Mycotoxin....** Tunis, Tunisia, 1999.

GREENACRE, M. **Correspondence analysis in practice**. New York: Academic Press, 1993.

IAMANAKA, B. T.; TANIWAKI, M. H. Ocorrência de ocratoxina A em café cru, café torrado e moído e café solúvel brasileiro. In: SIMPÓSIO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS – SIMPOCAL, 2., 2003.

IBGE, PAM - Produção Agrícola Municipal 2002 Valor da produção dos principais produtos das lavouras permanentes, segundo as mesorregiões, microrregiões e os municípios de Minas Gerais. 2002.

JOHNSON, R. A.; WICHERN, D. W. **Applied multivariate statistical analysis**. 4. ed. Prentice Hall, 1998. 816 p.

JOOSTEN, H. M. L. J.; GOETZ, J.; PITTET, A.; SCHELLENBERG, M.; BUCHELI, P. Production of ochratoxin A by *Aspergillus carbonarius* on coffee cherries **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 65, n. 1/2, p. 39-44, Apr. 2001.

KRUG, H. P. Cafés Duros III. Relação entre a porcentagem de microrganismos e qualidade do café. *Revista do Instituto do Café, São Paulo*, v. 27, n. 163, p. 1827-1831, set. 1940

KRUG, H. P. Cafés Duros IV. Relação entre zonas, qualidade de café e porcentagem de microrganismos. *Revista do Instituto do Café, São Paulo*, v.16, n. 169, p. 288-295, mar. 1941.

KRUG, H. P. A origem dos café duros. *Boletim da Agricultura, São Paulo*, v. 46, p. 397-406, 1947

LACEY, J. *Aspergillus* in feeds and seeds. In: POWELL, K. A.; RENWICK, A.; PEBERDY, J. F. (Ed.). *The Genus Aspergillus: taxonomy and genetics to industrial application*. Plenum Press, 1994. p. 73-92. (FEMS Symposium, n. 69).

LARSEN, T. O.; SVENDESEN, A.; SMEDSGAARD, J. Biochemical of ochratoxin A-producing strains of the genus *Penicillium*. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 67. n. 8, p. 3630-3635, Aug. 2001.

LEE, H. B.; MAGAN, N. Environment factors influence *in vitro* interspecific interaction between *A. ochraceus* and other maize spoilage fungi, growth and ochratoxin production. *Mycopathologia*, Dordrecht, v. 146, n. 1, p. 43-47, 1999.

LEE; H. B.; MAGAN, N. Impact of enviromental and interspecific interactions between spoilage fungi and *Aspergillus ochraceus* on growth and ochratoxin production in maize grain. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v. 61, n. 1, p. 11-16, Oct. 2000.

MAGAN, N.; LACEY, J. Ecological determinants of mould growth in stored grain. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v. 7, n. 3, p. 245-256, Dec. 1988.

MATIELLO, J. B. *O Café: do cultivo ao consumo*. Ed. Globo, 1991. 320 p.

MATIELLO, J. B. Fatores que afetam a produtividade do café no Brasil. In: *Cultura do cafeeiro: fatores que afetam a produtividade*. Ed. Alemar Braga Rena, 1986.

McLEAN, M.; BREJAK, P. Maize grains and their associated mycoflora – a microecological consideration. *Seed Science and Technology*, Zurich, v. 15, n. 3, p. 831-850, 1987.

MINORSKY, P. V. The hot and the classic. *Plant Physiology*, Rockville, v. 129, n. 2, p. 438-439, July 2002.

MORAES, M. H. P.; LIMA, E. S.; DIAS, D. P.; SEGGS, J. H.; BOTELHO, A. S.; RAMOS, K. F.; MANOEL, R. M. As condições de preparo em café produzido no estado do Rio de Janeiro como fator na determinação da bebida e na presença de ocratoxina A. In: CONGRESSO DE PESQUISAS CAFEERAS, 28., 2002, Caxambu-MG. *Anais...* Caxambu, 2002. p. 389-391.

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*, Washington, v. 51, n. 19, p. 5824-5828, Sept. 2004.

NAKAJIMA, M.; TSUBOUCHI, H.; MIYABE, M.; UENO, Y. Survey of Aflatoxin B₁ and Ochratoxin A in commercial green coffee beans by high-performance liquid chromatography linked with immunoaffinity chromatography. *Food and Agricultural Immunology*, Oxon, v. 9, n. 2, p. 77-83, June 1997.

NASSER, P. P. *Influência da separação de grãos de café (Coffea arabica L.) por tamanho na qualidade e ocorrência de ocratoxina A*. 2001. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

OLIVEIRA, J. C. *Relação da atividade da polifenoloxidase, peroxidase e catalase dos grãos de café e a qualidade da bebida*. Piracicaba, ESALQ, 80 p Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

PASIN, L. A. A. P.; ABREU, M. S. Fungos associados a grãos crus e ocorrência de ocratoxina A em diferentes cultivares de café. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 1., 2000. *Anais...* 2000. p. 1028-1031.

PASIN, L. A. A. P.; ABREU, M. S.; CHALFOUN, S. M.; PÁDUA, T. R. P. de. Efeito de Micronutrientes na população fúngica associada a grãos de café (*Coffea arabica* L.). *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 26, n. 5, p. 918-926, set./out. 2002.

PEREIRA, L. F.; KOBAYASHI, A. K.; VIEIRA, L. G. E. Desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas com vista a uniformidade de maturação dos

frutos de café. In: SEMINARIO INTERNACIONAL SOBRE BIOTECNOLOGIA NA AGROINDÚSTRIA CAFEEIRA, 3., 1999, Londrina. Programas e resumos... Londrina: IAPAR/IRD, 1999. p. 37-41.

PITT, J. I. Toxigenic fungi: which are important. *Medical Mycology*, Oxford, v. 38, p. 17-22, 2000. Supplement.

PRADO, E.; MARÍN, S. RAMOS, A. J.; SANCHIS, V. Occurrence of ochratoxigenic fungi and ochratoxina A in green coffee from different origins. *Food Science and Technology International*, London, v. 10, n. 1, p. 45-49, Feb. 2004.

ROBLEDO, A. L.; MARÍN, S.; RAMOS, A. J. Contaminación natural con micotoxinas en maíz forrajero y granos de café verde en el Estado de Nayarit (México). *Revista Iberoamericana de Micología*, Barcelona, v. 18, p. 141-144, 2001.

ROMANI, S.; SACCHETTI, G.; LÓPEZ, C. C.; PINNAVAIA, G. C.; ROSA, M. D. Screening on the occurrence of ochratoxin A in green coffee beans of different origins and types. *Journal Agriculture Food Chemistry*, Washington, v. 48, n. 8, p. 3616-3619, Aug. 2000.

SERRA, R.; MENDONÇA, C.; ALBRUNHOSA, L.; PIETRI, A.; VENANCIO, A. Determination of ochratoxin A in wine grapes: Comparison of extraction procedures and method validation. *Análitica Chimica Acta*, Amsterdam, v. 513, n. 1, p. 41-47, June 2004.

SILVA, C. F. Sucessão microbiana e caracterização enzimática da microbiocratoxina A associada aos frutos e grãos de café (*Coffea arabica* L.) do município de Lavras-MG. 2004. 156 p: Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SOARES, L. S. Ocratoxinas e aflatoxinas em café brasileiro. In: SEMINARIO INTERNACIONAL SOBRE BIOTECNOLOGIA NA AGROINDÚSTRIA CAFEEIRA, 3., 2000, Londrina. Anais.... Londrina: IAPAR/IRD, 2000. p. 447-452.

SOUZA, S. M. C. O café (*Coffea arabica* L.) na região sul de Minas Gerais – Relação da qualidade com fatores ambientais, estruturais e tecnológicos. 1996. 171 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SUÁREZ-QUIROZ, M. L.; GONZÁLEZ-RIOS, O.; BAREL, M.; GUYOT, B.; SCHORR-GALINDO, S.; GUIRAUD, J. P. Effect of chemical and environmental factors on *Aspergillus ochraceus* growth and toxigenesis in green coffee. **Food Microbiology**, London, v. 21, n. 6, p. 629-634, Dec. 2004.

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 of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 82, n. 2, p. 173-179, Apr. 2003.

TANIWAKI, M. H.; PITT, J. I.; URBANO, G.; TEIXEIRA, A. A.; LEITÃO, M. F. F. Fungi producing ochratoxin in coffee. In: **INTERNATIONAL SCIENTIFIC COLLOQUIUM ON COFFEE**, 18., 1999, Helsinki, Finland. **Proceedings...** Helsinki, Finland: 1999. p. 239-247.

VEGA, F. E.; BLACKBURN, M. B.; KURTZMAN, C. P.; DOWD, P. F. Identification of a coffee berry borer-associated yeast: does it break down caffeine? **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Oxford, v. 107, n. 1, p. 19-24, Apr. 2003.

VEGA, F. E.; MERCADIER, G. Insects, coffee and ochratoxin A. **Florida Entomologist**, Lutz, v. 81, n. 4, p. 543-544, Dec. 1998.

VERSTRATE, F. Regulating OCHRATOXINA A in coffee in the European Union. In: **WORKSHOP - OCHRATOXINA A EM CAFÉ**, 2004, Belo Horizonte. **Palestras...** Belo Horizonte, 2004.

VIANI, R. Effect of processing on ochratoxin A (OCHRATOXINA A) content of coffee. **Advanced in Experimental Medicine and Biology**, New York, v. 504, p. 189-193, 2002..

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. **Safety evaluation of certain mycotoxin in food**. Rome, 2001. p. 281-416. WHO Food Additives Serie 47 and FAO Food and Nutrition Paper 74. Prepared by the Fifty-fifth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives.

WILSON, D. M.; MUBATANHEMA, W.; JURJEVIC, Z. Biology and ecology of mycotoxigenic *Aspergillus* species as related to economic and health concerns. **Advanced in Experimental Medicine and Biology**, New York, v. 504, p. 3-17, 2002.

ANEXOS

ANEXO A

Pág

Tabela 1. Níveis de ocorrência de ocratoxina A nas diferentes frações

205

Anexo A

Tabela 1a. Níveis de ocorrência de ocratoxina A nos diferentes tipos de amostras

Fração	Amostra*	Análise de Ocratoxina A ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Chuva/Ano mm^3/m^2 (precipitação)	Altitude (m)
bóia	BE02A2-B	1,088	1200	775
bóia	CG04A3-B	16,88	1300	786
bóia	CG04A3	1,17	1300	786
bóia	CG05A2-B	0	1300	786
bóia	PC01A2	57,2	1700	928
bóia	PC01A2-B	90,82	1700	928
bóia	PC03A5	0	1.695	1.100
bóia	PC05A2	19,6	2.000	1150
bóia	PC05A2-B	7,62	2.000	1150
bóia	GU01A3	3,98	1.500	700
bóia	GU01A3-B	7,42	1.500	700
bóia	GU02A2	7,03	1.500	700
bóia	GU02A2-B	8,48	1.500	700
bóia	GU03A2	0	1.500	700
bóia	MA01A2	0	1.500	874
bóia	MA02A2	2,64	1.500	874
bóia	MA02A2-B	8,44	1.500	874
bóia	MA03A2	0	1.500	850
bóia	MA03A2-B	0	1.500	850
bóia	MA05A1	0	1.700	850
bóia	CR04A1-B	0	1690	1000
bóia	PC03A5-B	0	1.695	1.100
bóia	GU03A2-B	0	1.500	700
bóia	MA01A2-B	0	1.500	874
bóia	MA05A1-B	0	1.700	850
bóia	PT06A2	0	1.400	1250
bóia	CG04A3	2,75	1300	786
bóia	PC01A2	8,32	1700	928
bóia	PC03A5	0,79	2000	1300
bóia	PC05A2	0,93	1605	1200
bóia	GU01A3	1,03	1500	700
bóia	GU02A2	0	1690	980
Bóia	MA03A2	0	1500	874
Bóia	PC01A5-B	77,14	1700	928
Bóia	PC01A5	53,17	1700	928

Continua...

Tabela 1 cont

Fração	Amostra*	Análise de Ocratoxina A (µg/kg)	Chuva/Ano mm3/m2 (precipitação)	Altitude (m)
cereja	PT01A2	0	1.200	900
cereja	PT02A3	0,22	1.200	900
cereja	PT03A3	0	1.400	1230
cereja	PT04A2	0	1.400	1090
cereja + verde	PC05A1	2,21	2.000	1150
cereja + verde	PC05A1-B	2,21	2.000	1150
cereja + verde	GU02A1	42,91	1.500	700
cereja + verde	GU02A1-B	1,9	1.500	700
cereja + verde	GU03A1	1,04	1.500	700
cereja + verde	GU03A1-B	0	1.500	700
cereja + verde	GU04A2	6,14	1.500	700
cereja + verde	GU04A2-B	0,58	1.500	700
cereja + verde	PC03A6	0	1.695	1.100
cereja + verde	PC03A6-B	0	1.695	1.100
cereja + verde	GU02A1	0,77	1500	700
cereja descascado	PC03A3	0,96	1.695	1.100
cereja descascado	PC03A3-B	0	1.695	1.100
cereja/descascado	MA01A3	0	1.500	874
cereja/descascado	CG05A3-B	0	1300	786
cereja/descascado	BE02A1	0	1200	775
cereja/descascado	BE04A4-B	0	1200	775
cereja/descascado	BE05A3-B	0	1200	775
cereja/descascado	CR01A2	0	1690	1000
cereja/descascado	CR01A2-B	0	1690	1000
cereja/descascado	CG01A3	0	1300	786
cereja/descascado	CG01A3-B	0	1300	786
cereja/descascado	MA01A3-B	1,47	1.500	874
cereja/descascado	MA02A5	0	1.500	874
cereja/descascado	MA03A1	0,34	1.500	850
cereja/descascado	MA03A1-B	0	1.500	850
cereja/descascado	MA05A3	0	1.700	850
cereja/descascado	MA02A5-B	0	1.500	874
cereja/descascado	MA05A3-B	1,22	1.700	850
cereja/despulpado	CA02A1-B	0	1690	1.150
cereja/despulpado	PT06A1	0	1.400	1250
mistura	BE03A3-B	0,488	1200	775
mistura	BE02A3-B	0	1200	775

Continua...