



**INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
CCQA/ MICROBIOLOGIA**

JOSIANE BUENO

**COMPARAÇÃO DA INCIDÊNCIA DE FUNGOS OCRATOXIGÊNICOS E
OCRATOXINA A EM CAFÉ COM BROCA E SEM BROCA**

CAMPINAS

2018

JOSIANE BUENO

**COMPARAÇÃO DA INCIDÊNCIA DE FUNGOS OCRATOXIGÊNICOS E
OCRATOXINA A EM CAFÉ COM BROCA E SEM BROCA**

*Dissertação apresentada ao Instituto de
Tecnologia de Alimentos para obtenção do
título de Mestre em Ciência e Tecnologia de
Alimentos.*

Aluno: Josiane Bueno

Orientador: Dra. Marta Hiromi Taniwaki

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação defendida pela aluna
Josiane Bueno e orientada pelo Profa. Dra. Marta Hiromi Taniwaki

CAMPINAS

2018

Agência(s): FUNDEPAG

Nº do proc.:1263

FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborada pela Bibliotecária Adriana Gomes do Nascimento CRB/8 8853 -
Biblioteca Central do ITAL- Instituto de Tecnologia de Alimentos.

B83c Bueno, Josiane. Comparação da incidência de fungos ocratoxigênicos e ocratoxina A em café com broca e sem broca. Josiane Bueno / Dissertação de mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Campinas, SP: ITAL - Instituto de Tecnologia de Alimentos, 2018.

88f.

Marta Hiromi Taniwaki (Orientadora)

1. Café. 2. Café brocado. 3. Broca-do-café. 4. Fungos ocratoxigênicos. 5. Ocratoxina A. I Instituto de Tecnologia de Alimentos, CCQA – Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos. II Josiane Bueno Alves. III. Título.

Título em inglês: Comparison between the incidence of ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in coffee with and without coffee berry borer

Key-words: Coffee, coffee berry borer, fungi, ochratoxin A.

Titulação: Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Banca Examinadora: Dra. Marta H. Taniwaki (Orientadora), Dra. Beatriz Thie Iamanaka (membro titular), Dr. Aldir Alves Teixeira (membro titular) e Dra. Kátia Maria Vieira Avelar Bittencourt Cipolli (membro suplente).

Data da Defesa: 09/03/2018

Programa de Pós-graduação: Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Este exemplar corresponde à redação final da Dissertação de Mestrado defendida por Josiane Bueno, aprovada pela Comissão Julgadora em 09 de Março de 2018.

Dra. Marta Hiromi Taniwaki
Instituto de Tecnologia de Alimentos
(Orientadora)

Dra. Beatriz Thie Iamanaka
Instituto de Tecnologia de Alimentos
(Membro titular)

Dr. Aldir Alves Teixeira
Experimental Agrícola do Brasil Ltda.
(Membro titular)

Dra. Kátia Maria Vieira Avelar Bittencourt Cipolli
Instituto de Tecnologia de Alimentos
(Membro suplente)

A ata de defesa de dissertação de mestrado com as respectivas assinaturas dos membros da banca encontra-se arquivada junto à documentação do aluno.

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais Vera e José,
meu irmão Rafael e ao meu amor
Leandro.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me conceder saúde, sabedoria e persistência durante esta jornada.

Aos meus pais Vera e José, meus maiores exemplos, por toda atenção e amor. Por todas as orações e pensamentos positivos para conseguir vencer esta etapa.

Ao meu irmão Rafael, por colaborar com o projeto e pelos seus conhecimentos agrícolas.

Ao Leandro, meu noivo, por me incentivar e me fazer sentir capaz.

À Dra. Marta H. Taniwaki, pela excelente orientação, por acreditar em mim, por ter tido tanta paciência, principalmente no começo dessa caminhada e por sempre me motivar.

À Dra. Beatriz T. Iamanaka, pelos ensinamentos e disposição em querer sempre ajudar.

Às minhas colegas do laboratório de micologia Larissa, Gabriela, Aline, Adriana, Adriane, Natália, Cristina pela companhia, auxílio e boas conversas.

À Lígia, em especial, pela amizade, companheirismo no laboratório e por estar comigo em momentos que tanto precisei de ouvir: respira.

À todas as funcionárias do laboratório, por toda ajuda e dedicação. Por todos os momentos que passamos juntas e companhias durante o almoço. À Tamara e Tainá, estagiárias da micologia, por toda ajuda, disposição e prontidão.

As minhas amigas Luziane e Beatriz, que dividiram não só o apartamento comigo, mas também risadas e boas conversas.

As minhas colegas da pós-graduação e professores por todo aprendizado.

À secretária da pós-graduação, Maria Elenice, pela simpatia e suporte.

Ao programa de pós-graduação do ITAL pela oportunidade em realizar este mestrado.

À FUNDEPAG, por conceder a bolsa do mestrado.

À banca examinadora, pelo auxílio e por ter aceito o convite.

RESUMO

Este estudo teve como objetivo comparar a micobiota dos grãos sadios (e sem broca), com os grãos brocados (e sem outros defeitos), de amostras de café cru, das principais regiões produtoras de *Coffea arabica* e *C. canephora* do Brasil; identificar os principais fungos ocratoxigênicos à nível de seção ou espécie; otimizar a metodologia de análise de ocratoxina A (OTA) nos grãos sadios e brocados; determinar e comparar os níveis de OTA nas amostras destes dois tipos de grãos; e determinar a atividade de água e umidade destas amostras. Foi feita a separação dos grãos de café sadios (sem defeitos) e brocados (infestados pela broca-do-café), manualmente. Para a análise micológica, foi feita uma desinfecção superficial e o plaqueamento direto no meio Ágar Dichloran Glicerol 18%. O teste de produção de OTA dos isolados de *A. section Nigri* e *A. section Circumdati* foi feito de acordo com o método ágar *plug* aplicado à Cromatografia de Camada Delgada (CCD). A análise de OTA nos grãos sadios e grãos brocados foi realizada passando pela etapa de limpeza e extração em coluna de imunoafinidade para OTA. A detecção e quantificação foi feita por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), com detector de fluorescência. Foram isolados um total de 590 e 1.013 fungos potencialmente produtores de OTA, nos grãos sadios e grãos brocados, respectivamente. A maioria das amostras 58 (72,5%) apresentou maior infecção nas frações de grãos brocados. Em apenas 22 (27,5%) amostras os grãos sadios tiveram maior infecção que os grãos brocados ou infecção similar. As espécies potencialmente ocratoxigênicas predominantes foram: *A. section Nigri* no café *C. canephora* (robusta) e *A. section Circumdati* no café *C. arabica* (arábica). Nos grãos sadios, de todos os isolados de *A. section Nigri* (169) e *A. section Circumdati* (413) testados, 8 (4,7%) e 278 (67,3%) foram produtores de OTA, respectivamente. Nos grãos brocados, dos 261 isolados de *A. section Nigri* e 728 de *A. section Circumdati* testados, 6 (2,3%) e 522 (70,1%) foram produtoras de OTA, respectivamente. A média de concentração de OTA foi superior nas frações de grãos brocados comparado aos grãos sadios, nas amostras do Cerrado Mineiro, São Paulo, Bahia e Espírito Santo.

Palavras-chave: Café; broca-do-café; *Hypotenemus hampei*; fungos ocratoxigênicos; ocratoxina A.

ABSTRACT

The aim of this study was to compare the mycobiota of sound beans (without coffee borer beans) and coffee borer beans (without other defective beans) of *Coffea arabica* and *C. canephora* from the main Brazilian producing regions; to identify the major ochratoxigenic fungi at the level of section or species; to optimize the methodology of ochratoxin A (OTA) analysis in sound and borer coffee beans in order to determine the presence and to compare the levels of OTA in sound and borer coffee beans; to determine the water activity and moisture content of the samples. The separation of sound and borer beans was performed manually. For mycological analysis, each fraction was surface disinfected and plated directly onto Dichloran 18% Glycerol Agar (DG18) medium. For OTA production test in *A.* section *Nigri* and *A.* section *Circumdati* isolates, the agar plug technique was used and applied onto thin layer chromatography (TLC) plates. OTA of sound and borer coffee beans was analyzed using an immunoaffinity column for OTA. The detection and quantification was performed using a High Performance Liquid Chromatography with a fluorescence detector. A total of 590 and 1,013 fungi with potential for OTA production were isolated from sound and borer coffee beans, respectively. Most of the samples 58 (72.5%) showed higher infection in the borer bean fractions. In only 22 (27.5%) had sound beans a higher infection than borer beans or similar infection. The predominant ochratoxigenic species were *A.* section *Nigri* in *Coffea canephora* (robusta) and *A.* section *Circumdati* in *C. arabica* (arabica). In sound beans, out of 169 isolates of *A.* section *Nigri* and 413 of *A.* section *Circumdati*, 8 isolates (4.7%) and 278 (67.3%) were OTA producers, respectively. In the borer beans, out of 261 strains of *A.* section *Nigri* and 728 of *A.* section *Circumdati*, 6 (2.3%) isolates and 522 (70.1%) were OTA producers, respectively. The mean OTA concentration was higher in borer beans compared to sound beans in the region of Cerrado Mineiro, São Paulo, Bahia and Espírito Santo.

Keywords:

Coffee; coffee berry borer; *Hypothenemus hampei*; ochratoxigenic fungi; ochratoxin A.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. OBJETIVOS	3
2.1 Objetivos gerais.....	3
2.2 Objetivos específicos.....	3
CAPÍTULO 1: Qualidade do café versus defeitos: broca-do-café (<i>Hypotenemus hampei</i>), fungos e ocratoxina A.....	4
RESUMO.....	5
ABSTRACT	5
1 Introdução	6
1.1 Aspectos gerais do café	7
1.2 Processamento do café.....	10
1.3 Defeitos no café	14
1.4 Broca-do-café.....	15
1.5 Fungos ocratoxigênicos no café.....	18
1.6 Ocratoxina A no café.....	19
1.7 Ocorrência de fungos e ocratoxina A em grãos de café brocados	20
CAPÍTULO 2: Micobiota de grãos de café (<i>C. arabica</i> e <i>C. canephora</i>) sadios e brocados de regiões cafeeiras do Brasil.....	33
RESUMO.....	34
1. INTRODUÇÃO	35
2. OBJETIVOS	36
3. MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1 Amostras de café.....	36
3.2 Determinação da atividade de água e umidade	37
3.3 Análise da micobiota	37

3.4 Identificação dos fungos.....	38
4. RESULTADOS	38
5. DISCUSSÃO	39
6. CONCLUSÕES	40
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
CAPÍTULO 2: Micobiota de grãos de café (<i>C. arabica</i> e <i>C. canephora</i>) sadios e brocados de regiões cafeeiras do Brasil (Tabelas e Figuras).....	45
CAPÍTULO 3: Comparação da incidência de fungos ocratoxigênicos e ocratoxina A em grãos de cafés sadios e brocados.....	56
RESUMO.....	57
1. INTRODUÇÃO	59
2. OBJETIVOS	61
3. MATERIAL E MÉTODOS	61
3.1 Amostras de café.....	61
3.2 Atividade de água.....	62
3.3 Umidade do café	62
3.4 Plaqueamento direto das amostras.....	63
3.5 Isolamento e identificação das espécies com potencial ocratoxigênicos ...	63
3.6 Teste de produção de ocratoxina A.....	63
3.7 Determinação de ocratoxina A em café sadio e brocado	64
3.7.1 Extração da ocratoxina A	64
3.7.2 Detecção e quantificação de ocratoxina A por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	64
3.7.3 Otimização do método.....	65
3.8 Análise estatística.....	65
4. RESULTADOS	65
4. 1 Atividade de água e umidade do café	65

4.2 Fungos ocratoxigênicos no café sadio e café brocado.....	66
5. DISCUSSÃO	68
6. CONCLUSÃO.....	69
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
CAPÍTULO 3: Comparação da incidência de fungos ocratoxigênicos e ocratoxina A em grãos de cafés sadios e brocados (Tabelas e Figuras).....	75
CAPÍTULO 4: CONCLUSÃO GERAL E TRABALHOS A SEREM PUBLICADOS	86
1. CONCLUSÃO GERAL.....	87
2. TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSO.....	88
3. TRABALHOS A SEREM enviados para publicação	88

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
a_w	Atividade de água
B.U.	Base úmida
BPA	Boas Práticas Agrícolas
CCD	Cromatografia de Camada Delgada
CAC	Codex Alimentarius Commission
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CREA	Creatine Sucrose Agar
CYA	Czapek Yeast Extract Agar
DG18	Ágar Dicloran 18% Glicerol
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
FO	Frequência de ocorrência
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IARC	International Agency for Research on Cancer
ICO	International Coffee Organization
JECFA	The Joint WHO/FAO Expert Committee on Food Additives
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MEA	Malt Extract Agar
MI	Média de infecção
OTA	Ocratoxina A, ochratoxin A
SCAA	Speciality Coffee Association of America
USDA	United State Department of Agriculture
VI	Variação de infecção
YESA	Yeast Extrat Sucrose Agar

1. INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil lidera o ranking mundial na produção e exportação de café desde o século 19. A produção de café no Brasil concentra-se principalmente nos estados de Minas Gerais, com mais de 50% da produção nacional, Espírito Santo (19%) e São Paulo (9,6%) (BRASIL, 2017a). Além das características sensoriais, o café apresenta efeitos estimulantes e propriedades funcionais o que torna o café uma das bebidas mais apreciadas no mundo.

A qualidade do café está relacionada com a ausência de defeitos como grãos verdes, grãos pretos, preto-verdes, ardidos, brocados entre outros. Estes defeitos são originários de falhas durante na colheita, pós-colheita e também pela infestação de insetos ainda na lavoura. O defeito brocado, é causado pela broca-do-café, *Hypotenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae), este inseto se alimenta da semente do café ainda no cafezal, e causa a perda de peso, alteração na classificação por tipo, queda de frutos no solo e ainda facilita a entrada de fungos (CARRION; BONET, 2004; INFANTE, 2018; GAMA *et al.*, 2005; GAMA *et al.*, 2006; PÉREZ *et al.* 2003).

Até o ano de 2013, o principal agente químico de controle deste inseto foi o Endosulfan. Este inseticida e acaricida foi considerado um dos produtos mais tóxicos utilizados nas lavouras de café e em outras culturas como algodão, cacau, cana-de-açúcar e soja (BRASIL, 2009). A partir de 2013, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária banuiu o seu uso no mercado nacional, por ser considerado tóxico para humanos e animais (BRASIL, 2010). Esta proibição fez com que os produtores ficassem sem alternativas de produtos químicos eficientes para controlar esta praga.

Alguns estudos têm demonstrado que os grãos com defeitos estão relacionados com uma maior ocorrência de fungos produtores de toxinas, como *Aspergillus carbonarius*, *A. niger*, *A. westerdijkiae* e *A. ochraceus* (TANIWAKI *et al.*, 2014). As micotoxinas são toxinas originárias do metabolismo secundário produzido por algumas espécies de fungos filamentosos, e podem causar danos à saúde humana e animal. Estas micotoxinas podem causar efeitos agudos, que podem levar o indivíduo ou animal à morte, dependendo do nível de contaminação do alimento; ou efeitos crônicos, quando ocorre a exposição à micotoxina por longo período. As principais micotoxinas conhecidas nos alimentos são: aflatoxinas, zearalenona, fumonisinas, tricotecenos e ocratoxina A (OTA) (PITT, 2000).

Existem trabalhos ainda não conclusivos de que a broca-do-café (*Hypotenemus hampei*) pode facilitar a entrada de fungos no interior do fruto e atuar como vetor no transporte de esporos de fungos produtores de toxinas (VELMOUROUGANE; RAJEEV; THIRUKONDA, 2010). Contudo, faltam estudos mais detalhados que relacionem os fungos ocratoxigênicos e a ocratoxina A com a broca do café. Nestas condições um estudo comparando a microbiota dos grãos sadios com grãos brocados são necessários, bem como os níveis de OTA nestes grãos.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

- Comparar a incidência dos fungos ocratoxigênicos e ocratoxina A nos grãos de café grãos sadios (e sem broca) com os grãos brocados (e sem outros defeitos), obtidos da etapa de armazenamento.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar a micobiota dos grãos de café sadios (e sem broca) com os grãos brocados (e sem outros defeitos) de amostras de café cru, das principais regiões produtoras de *Coffea arabica* e *C. canephora* do Brasil;

- Identificar os principais grupos fúngicos à nível de gênero ou espécie;

- Otimizar a metodologia de análise de ocratoxina A em cafés sadios e brocados;

- Comparar os níveis de ocratoxina A nos grãos sadios e brocados;

- Determinar a atividade de água e umidade das amostras de café.

**CAPÍTULO 1: Qualidade do café versus defeitos: broca-do-café
(*Hypotenemus hampei*), fungos e ocratoxina A**

Artigo de revisão enviado para a revista Brazilian Journal of Food
Technology no dia 08 de maio de 2018.

RESUMO

O café é uma das bebidas mais consumidas em todo o mundo. Estudos sobre a qualidade do café é de grande importância, visto que, a ocorrência de grãos defeituosos, pode afetar tanto a sua qualidade microbiológica quanto a sensorial. O inseto *Hypotenemus hampei* ao perfurar os frutos na lavoura, causa o defeito brocado nos grãos, reduz o peso do café, e ainda pode favorecer a entrada de fungos, muitos deles toxigênicos, que em condições ideais de crescimento são capazes de produzir toxinas. O presente artigo é uma revisão sobre os aspectos gerais do café, os defeitos, a broca-do-café e a possível correlação com os fungos ocratoxigênicos, e a presença ocratoxina A no café.

Palavras-chave: Café, Broca-do-café, *Hypotenemus hampei*, Fungos, Ocratoxina A, Micotoxinas.

ABSTRACT

Coffee is one of the most consumed beverages in the world. Studies on coffee quality are important, because the occurrence of defective grains can affect its microbiological and sensorial quality. The insect *Hypotenemus hampei*, when perforating the fruits in the crop, causes the coffee berry borer defects in the grains reduces weight, and can also favor the entry of fungi, some of them toxigenic, that under ideal growth conditions are capable of producing toxins. The present article is a review of the general aspects of coffee, its defects, the coffee berry borer and the possible relationship with ochratoxigenic fungi and ochratoxin A production in coffee.

Keywords: Coffee, Coffee berry borer, *Hypotenemus hampei*, Fungi, Ochratoxin A, Mycotoxins.

1 Introdução

O hábito de consumir o café faz parte da rotina de milhões de pessoas em todo o mundo. Os Estados Unidos é o maior mercado consumidor de café do mundo, seguido do Brasil. Em 2017 o consumo pelos brasileiros foi estimado em 21,5 milhões de sacas de 60 kg de café beneficiado, com expectativas de liderar o ranking mundial até 2021 de acordo com a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA, 2017).

Os aspectos sensoriais da bebida estão relacionados, principalmente com a ausência de defeitos, que além de prejudicar a qualidade da bebida, podem também causar perdas quantitativas ao produtor e afetar a qualidade microbiológica do café. A broca-do-café, *Hypotenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae), é uma das principais pragas das lavouras de café, que causa danos nos frutos, em vários países produtores. O principal agente químico de controle deste inseto no café, até o ano de 2012, era o Endosulfan. A partir de 2013, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) banuiu o seu uso, por ser considerado tóxico para humanos e animais (BRASIL, 2010). Esta proibição fez com que os cafeicultores ficassem sem alternativas imediatas de produtos químicos eficientes para controlar esta praga.

Estudos tem mostrado que a broca-do-café pode facilitar a entrada de fungos no interior do fruto e atuar como vetor no transporte de esporos de fungos produtores de toxinas (VELMOUROUGANE *et al.*, 2010).

Havendo boas condições para o crescimento fúngico, o café pode ser um bom substrato, e alguns fungos são capazes de produzir micotoxinas, como a ocratoxina A (OTA). Estudos tem demonstrado que os grãos de cafés defeituosos como preto e ardido, podem estar relacionados com a incidência de fungos toxigênicos como *Aspergillus carbonarius*, *A. niger*, *A. westerdijkiae* e *A. ochraceus*. Estes grãos (preto e ardido) apresentaram os maiores níveis de OTA, comparados aos grãos sadios e demais defeitos como verde e preto-verde (TANIWAKI *et al.*, 2014).

Como são poucos os trabalhos que relacionam os grãos brocados com a incidência de fungos toxigênicos e micotoxinas no café, os objetivos desta revisão foram: tratar os aspectos gerais do café, seu processamento, defeitos nos grãos e verificar se existe uma correlação entre a broca-do-café, os fungos ocratoxigênicos, e a presença de ocratoxina A no café.

1.1 Aspectos gerais do café

O café, geralmente, é preparado através da infusão de grãos processados, torrados e moídos das duas principais espécies botânicas comercializadas: *Coffea arabica* L. e *C. canephora* Pierre ex. Devido a importância destas espécies em todo o mundo, o café é considerado a segunda mercadoria mais valiosa do mundo, após o petróleo (PARRAS *et al.*, 2007).

O fruto do cafeeiro é constituído por duas sementes (endosperma), envolto pela película prateada (perisperma), pergaminho (endocarpo), mucilagem (mesocarpo) e casca (exocarpo) (MESQUITA *et al.*, 2016). A estrutura do fruto está representada na Figura 1.1.

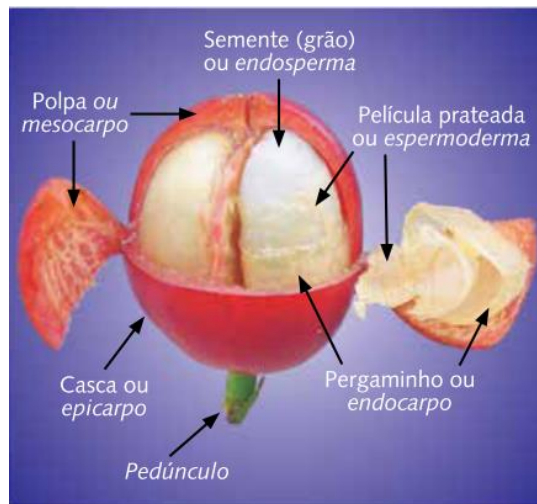


Figura 1.1. Estrutura do fruto de café. (MESQUITA *et al.*, 2016)

As espécies de cafeeiros são agrupadas em dois gêneros de acordo, basicamente, com a sua capacidade de florescência: *Coffea* e *Psilanthus* (BRIDSON, 1987). Os frutos pertencentes ao gênero *Coffea* apresentam cerca de 80 espécies e mais de 100 variedades de café distribuídos nas regiões tropicais e subtropicais (HAMDOUCHE *et al.*, 2016).

O Brasil encontra-se como o maior produtor e exportador de café do mundo. Na safra de 2016/17 a produção total foi estimada em 49,64 milhões de sacas beneficiadas, enquanto que na safra de 2017 a produção foi de cerca de 44,77 milhões. Além da bienalidade negativa, a queda da produtividade também foi decorrente à períodos de seca durante o período de enchimento dos grãos (janeiro a março), resultando em grãos menores (CONAB, 2017).

A Figura 1.2 apresenta os maiores produtores de café na safra 2016/17.

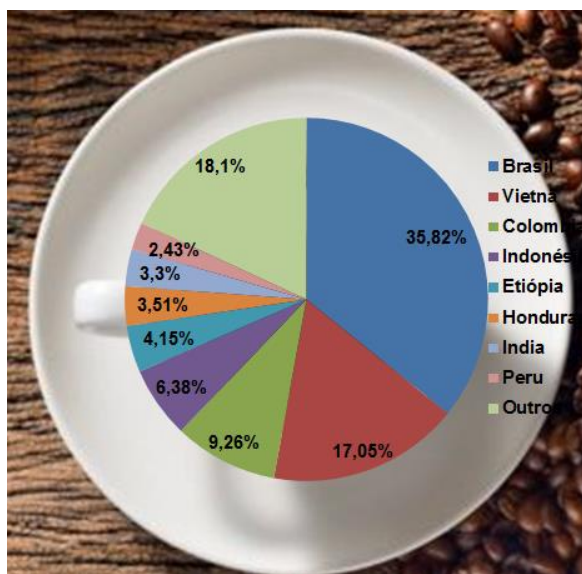


Figura 1.2. Produção mundial de café em 2016/2017 (USDA, 2017).

Dentre as dezenas de espécies pertencentes ao gênero *Coffea*, apenas duas delas são destaques no mercado mundial, representadas por *C. arabica* e *C. canephora*, também conhecidas como café arábica e café robusta, respectivamente. Todas as espécies do gênero *Coffea*, provavelmente, são originárias das florestas intertropicais da África e Madagascar (COUTURON *et al.*, 1998).

No Brasil, a espécie arábica é responsável por cerca de 77% da produção total (CONAB, 2016). O café arábica é cultivado em altitudes de 600 a 2100 metros, e é o mais comercializado devido aos seus atributos de sabor e aroma que torna os grãos mais agradáveis ao paladar. Já o café robusta pode ser cultivado em baixas altitudes (100 a 1000 metros) e de clima quente e úmido, sendo utilizado em *blends* com café arábica e principalmente na indústria de café solúvel (LIMA, 2015; ILLY; VIANI, 2005).

A Figura 1.3 apresenta a estrutura do cafeeiro (*C. arabica* e *C. canephora*).



Figura 1.3. i) *C. arabica* cultivar Catuaí amarelo (Nova Resende, Minas Gerais);
ii) *C. canephora* (São Mateus, Espírito Santo) (Fonte: BUENO & TANIWAKI, 2018).

1.2 Processamento do café

No Brasil a colheita do café ocorre durante os meses de maio a setembro. A colheita por derrça, que é a mais comum, deve se iniciar quando mais de 80% dos frutos estiverem maduros, com o objetivo de se obter um café de boa qualidade (MESQUITA *et al.*, 2016).

A colheita pode ser feita manualmente (coleta seletiva ou derrça), semi-manual ou por meio de máquinas. Em lavouras jovens, predomina-se a colheita manual e a partir da segunda safra a colheita pode ocorrer de forma mecanizada, de acordo com a declividade do solo (SANTINATO *et al.*, 2015).

Alguns cafeicultores ainda utilizam os frutos que caem no solo após a colheita na planta. Esse processo é chamado de varreção, e não é recomendável sob o ponto de vista de sanidade por favorecer o crescimento de fungos

ochratoxigênicos presentes no solo, e por prejudicar a qualidade da bebida (TANIWAKI *et al.*, 2014).

Após a colheita, o café pode passar por um dos métodos de processamento: via seca ou via úmida. A escolha do método depende de investimentos em infraestrutura, condições climáticas, mercado consumidor entre outros (BORÉM, 2008).

No processamento por via seca (Figura 1.4), o café sai da lavoura, segue ou não para o lavador-separador de densidade de frutos, onde será abanado a fim de eliminar paus e sujidades estranhas. A separação é feita em porções de frutos mais densos (verdes e maduros) e menos densos (frutos muito maduros ou passas, secos, chochos e mal granados entre outros). Após este processo, o café com casca é espalhado em camadas finas em terreiros de concreto, asfalto, suspenso ou terra (este último não é recomendado) para que ocorra a secagem natural. Durante a etapa de secagem é importante o revolvimento periódico dos frutos (BORÉM, 2008).

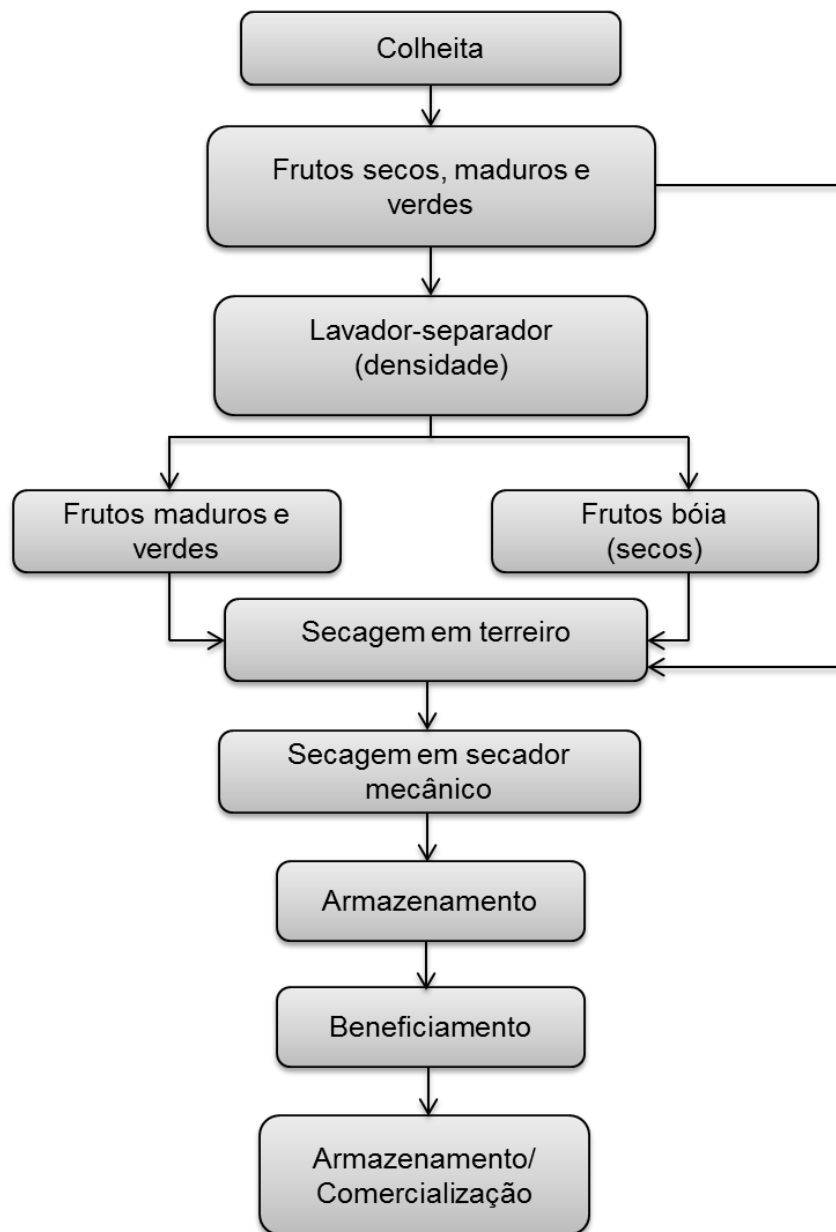


Figura 1.4. Etapas do processamento por via-seca. (Fonte: Adaptado do CAC, 2009).

No processamento por via úmida (Figura 1.5), o café colhido passa pelo lavador-separador, os frutos maduros e verdes, seguem para o descascador, seguido ou não pelo desmucilador (retirada da mucilagem) e secagem. Ou ainda, os frutos maduros e verdes saem do descascador e permanecem em tanques de fermentação com a ação das leveduras, a fim de se obter uma hidrólise da

mucilagem. Após esta etapa, os grãos com pergaminho, seguem para a secagem em terreiros e ainda pode-se completar a secagem em secadores mecânicos (BORÉM, 2008).

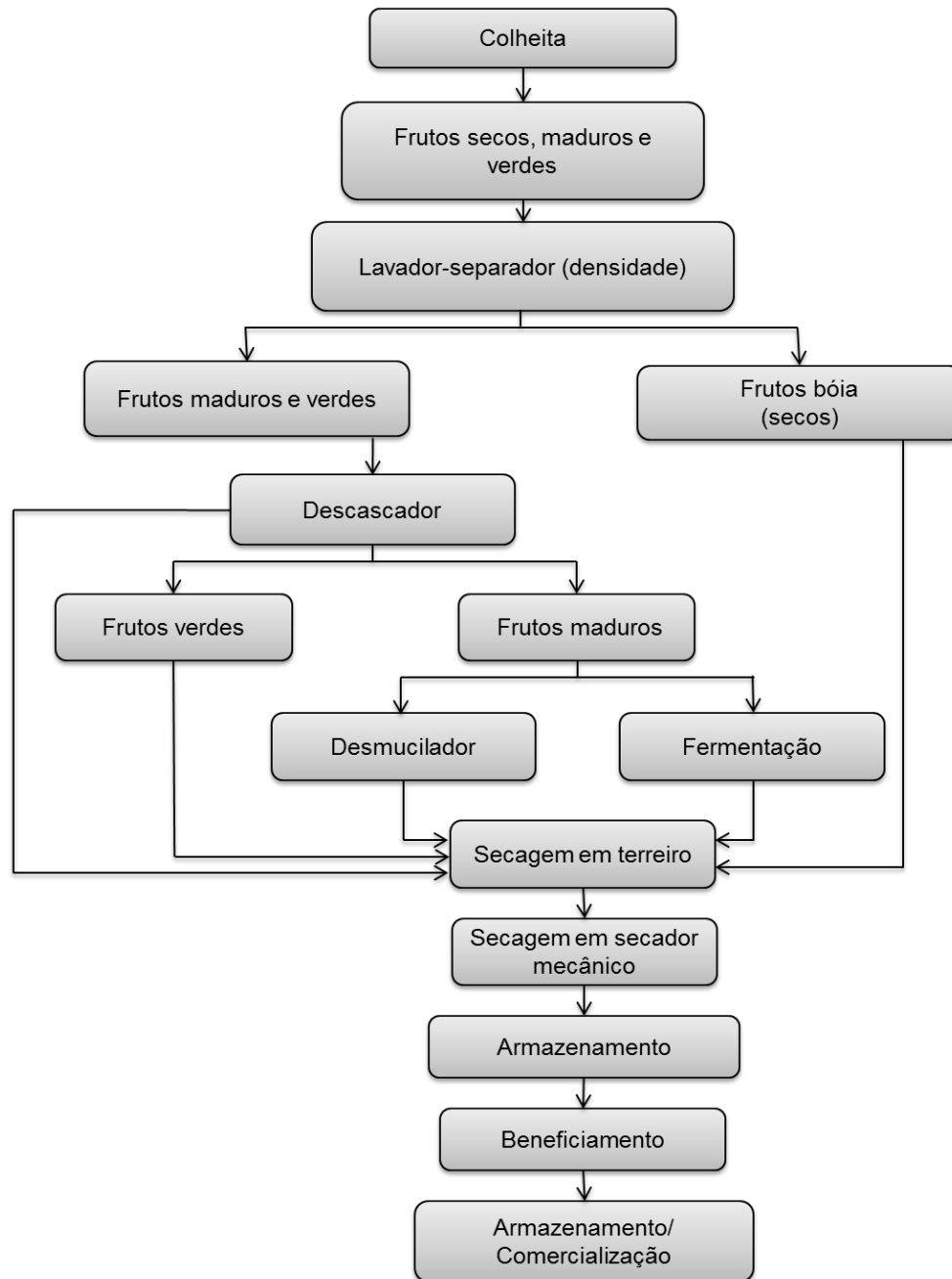


Figura 1.5. Etapas do processamento por via-úmida (Fonte: Adaptado do CAC, 2009).

Após atingir o teor de umidade requerido pela secagem, o café com pergaminho poderá ser armazenado e depois ser beneficiado, ou seguir direto para o beneficiamento após a secagem.

Quando os grãos de café são armazenados antes do beneficiamento, é mais recomendado deixar os grãos com pergaminho do que com casca, preservando assim a sua qualidade (SELMAR *et al.*, 2008).

No Brasil, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), recomenda o teor máximo de umidade de 12% base úmida (B.U.), para o café beneficiado que será armazenado (BRASIL, 2011a). Com relação a atividade de água, a Associação de Cafés Especiais da América, sugere um valor seguro de no máximo 0,7 para o armazenamento de grãos beneficiados (SCAA, 2016).

1.3 Defeitos no café

Os defeitos do café são provenientes de fatores genéticos, fisiológicos ou falhas durante o processamento, denominados fatores intrínsecos. Já as frações estranhas aos grãos, são os fatores extrínsecos (BRASIL, 2003).

Os defeitos de natureza extrínsecas são as cascas, paus e pedras, enquanto que dos de natureza intrínsecas são os grãos verdes, pretos, preto verdes, ardidos e brocados. A presença destes defeitos, influenciam na classificação do café por tipo, uma vez que, podem ser responsáveis por alterar o sabor da bebida e causar prejuízos ao produtor.

Dentre estes defeitos, os grãos brocados são originários da infestação da broca-do-café (*Hypotenemus hampei*) que ao perfurar os frutos na lavoura, permite que os frutos caiam no solo, podendo ocorrer perdas em longa escala (TEIXEIRA *et al.*, 2006).

1.4 Broca-do-café

A broca-do-café, *H. hampei* (Ferrari) (Curculionidae: Scolytinae), é um besouro que infesta o endosperma dos frutos na lavoura do café causando o defeito brocado. Os cafeicultores apontam como uma das principais pragas que atacam o fruto, causando prejuízos quantitativos e qualitativos na maioria das lavouras produtoras de café no mundo (AMÉZQUETA *et al.*, 2012).

A fêmea do inseto é capaz de perfurar o fruto do café em todas as formas de maturação, desde chumbinhos até passas, geralmente na região da coroa. Dentro do fruto, o inseto forma galerias onde deposita seus ovos. Depois de adultas, as fêmeas são fortemente atraídas por outros frutos devido à percepção de odores, assim, elas deixam um fruto e vão perfurar outros frutos mais atrativos (DAMON, 2000; RODRÍGUEZ *et al.*, 2017). A Figura 1.6 apresenta a entrada e infestação da broca-do-café.

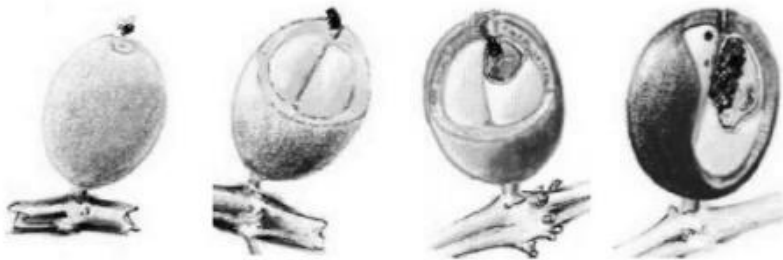


Figura 1.6. Broca-do-café atacando o fruto do café (AGEGNEHU *et al.*, 2015).

Neste período de perfuração e formação das galerias, a broca pode depositar mais de cem ovos e estes, seguem para o estágio de pré-pupa, pupa e inseto adulto no período de um mês ou mais, variando de acordo com as condições climáticas, ou seja, o besouro tolera uma faixa de 15 a 32°C, com

crescimento rápido entre 27 e 30°C (MARIÑO *et al.*, 2016; JARAMILLO *et al.*, 2009).

A perfuração causada pela broca pode facilitar a entrada de bactérias e fungos no interior do fruto. A coloração esverdeada (Figura 1.7) nos grãos pode ser devida a ação mecânica da perfuração e oxidação, assim como, a presença de fungos e bactérias (CARRION; BONET, 2004).

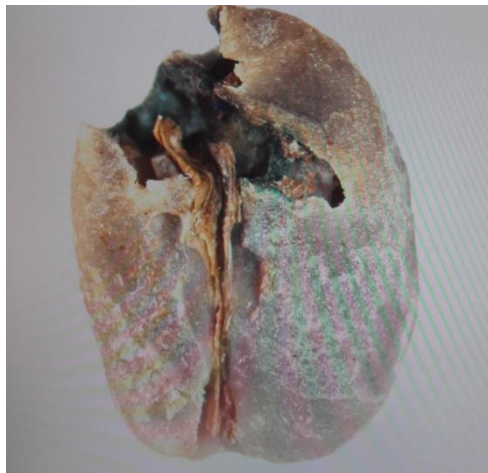


Figura 1.7. Grão infestado pela broca-do-café. (Fonte: BUENO; TANIWAKI, 2018).

MARIÑO *et al.* (2016) estudaram a relação entre cafezais sombreados e expostos ao sol, concluindo que a infestação pela broca é maior em frutos de regiões sombreadas do que em frutos expostos ao sol. A broca passa a maior parte do seu ciclo de vida dentro do fruto, o que dificulta a ação de inseticidas (DAMON, 2000).

O Endosulfan (6, 7, 8, 9, 10,10-hexachloro-1, 5,5a, 6,9,9a-hexahydro-6,9 methano-2,4,3-benzodioxathiepin-3-oxide) é um inseticida de ação seletiva mais utilizado no combate a broca-do-café e foi introduzido inicialmente nos Estados Unidos em 1954 (MAIER-BODE,1968). O Endosulfan foi o inseticida mais utilizado pelos produtores de café e outras culturas em todas as partes do mundo.

Sua ação é de contato e ingestão, causando a morte dos insetos e sua aplicação ocorre nas partes aéreas da planta (INGRAM, 1968).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) classificou o Endosulfan na Classe II, isto é, de risco moderado à saúde humana (WHO, 2010) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), como Classe toxicológica I, extremamente tóxico (BRASIL, 2010). A partir de 2013, o seu uso foi banido, pois foi considerado tóxico para humanos (BRASIL, 2010). A proibição da comercialização do Endosulfan, fez com que os cafeicultores não tivessem outra alternativa imediata de combate químico à broca. Dentre as medidas de controle cultural desta praga, a completa remoção dos frutos da planta durante a safra, quanto dos que caem no solo, permitem eliminar os focos de infestação da broca, além de melhorar a qualidade sensorial e microbiológica do café. Porém, esta prática não é muito comum entre os cafeicultores, pois encarece o processo causando uma perda de café (CURE *et al.*, 1998).

Fabricantes de produtos químicos para a agricultura tem lançado produtos que combatem a broca de diferentes princípios ativos e modos de ação, alguns deles já com registro no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) como: Verismo (Metaflimizona), Spindle (Espinosade), Curinga (clorpirifós), Curbix (Etiprole), Voliam Targo (clorantraniliprole abamectina), Benevia (Ciantraniliprole) (BRASIL, 2017b).

1.5 Fungos ocratoxigênicos no café

No café, as principais espécies de fungos produtores de ocratoxina A são: *A. westerdijkiae*, *A. ochraceus*, *A. carbonarius* e *A. niger* (MAGNANI *et al.*, 2005; NOONIM *et al.*, 2008; TANIWAKI *et al.*, 2003).

A presença de fungos potencialmente produtores de toxinas não significa que o mesmo será capaz de produzir a toxina no alimento, uma vez que, a sua produção depende da disponibilidade de nutrientes no substrato, as condições ambientais e o atendimento às boas práticas (PITT, 2000).

O café é susceptível a infecção de fungos ocratoxigênicos, principalmente, devido as falhas durante o processo de pós-colheita. Longos períodos em que o café fica dentro de sacos após a colheita até seguir para a secagem (BRANDO, 2004), períodos de chuvas durante a etapa de secagem em terreiros, falta de revolvimento dos grãos no terreiro e armazenamento inadequado, são fatores fundamentais para o crescimento de fungos potencialmente produtores de ocratoxina A (URBANO *et al.*, 2001).

TANIWAKI *et al.* (2003), analisaram um total de 408 amostras de café coletadas em diferentes estádios de processamento como: no pé-de-café (cereja e passa), passas do solo, na secagem em terreiro e no armazenamento. Neste trabalho foi constatado que os cafés deixados no solo, as condições inadequadas de secagem e armazenamento, contribuíram para uma maior infecção por fungos ocratoxigênicos. Foi verificado também que o café cereja coletado no pé-de-café possuía uma baixa infecção de fungos ocratoxigênicos.

URBANO *et al.* (2001) estudaram amostras de cafés em diferentes estádios de maturação e de processamento, verificando altos níveis de

contaminação por *A. ochraceus* e *A. niger*, produtores de ocratoxina A em amostras coletadas em terreiros e armazenamento.

GEREMEW *et al.* (2016) fizeram um estudo da micobiota do café estocados na Etiópia e verificaram que as cepas de *A. westerdijkiae* apresentaram maior potencial de produção de ocratoxina A do que *A. ochraceus*.

1.6 Ocratoxina A no café

A ocratoxina A (OTA) é um metabólito secundário produzido por certas espécies de fungos filamentosos como *Aspergillus*, principalmente *A. ochraceus*, *A. westerdijkiae*, *A. carbonarius* e *Penicillium*, como o *P. verrucosum* e *P. nordicum* (PITT; HOCKING, 2009). Em climas temperados a ocorrência de alimentos contaminados com OTA é geralmente, decorrente da infecção por *P. verrucosum* e *P. nordicum*. Já em climas tropicais e sub tropicais predominam as espécies do gênero *Aspergillus* capazes de produzir esta toxina (PITT, 2000).

A OTA é considerada nefrotóxica, possivelmente carcinogênica e teratogênica em células animais (GALVANO *et al.*, 2005). A Agência Internacional de Pesquisa do Câncer (IARC) classificou a ocratoxina A no Grupo 2B, considerada potencialmente carcinogênica em humanos (IARC, 1993).

A presença de ocratoxina A em café cru tem sido relatada em várias partes do mundo. PARDO *et al.* (2004) analisaram amostras de café cru arábica e robusta de diferentes países produtores, encontrando níveis de 1,3 a 31,5 µg/kg sem diferenças significativas entre as duas espécies de café. BATISTA *et al.* (2009) fizeram um estudo com diferentes frações de café durante os processamento via-seca e via-úmida. Foi verificado que em frutos verdes, cerejas,

passas, cereja descascado e cereja despulpado houve baixa presença de OTA enquanto que nos frutos de varreção, os níveis foram superiores a 100 µg/kg.

No Brasil, a ANVISA estabelece o limite máximo de ocratoxina A em café torrado (moído e em grão) e café solúvel de 10 µg/kg (BRASIL, 2011b), enquanto que na União Européia, o limite máximo de ocratoxina A em café torrado é de 5 µg/kg e para café solúvel de 10 µg/kg (COMISSÃO EUROPÉIA, 2006). Estudos demonstram que após a torração do café, a redução da ocratoxina A pode ser de 13 a 93% (PÉREZ DE OBANOS *et al.*, 2005). Ferraz *et al.* (2010), verificaram uma redução de ocratoxina A no café de 53 a 99% durante o processo de torra na temperatura de 180 a 240°C sendo que esta redução depende do ponto de torra.

1.7 Ocorrência de fungos e ocratoxina A em grãos de café brocados

Poucos trabalhos têm relacionado a presença de fungos ocratoxigênicos com a broca-do-café. PÉREZ *et al.* (2003) analisando a micobiota associada a broca-do-café e as galerias formadas nos grãos, de três lavouras no México, encontraram os gêneros *Fusarium sp.*, *Penicillium sp.*, e *Aspergillus sp.* Foram isolados 187 cepas de fungos no corpo dos insetos, enquanto que nas galerias foram isoladas apenas 25 cepas de quatro gêneros diferentes. Segundo os autores, as condições climáticas da região afetaram a micobiota presente no inseto e nas galerias.

Um estudo realizado em Veracruz, México, entre 1999 e 2002, identificou várias espécies de fungos na broca-do-café, nos frutos brocados e nas galerias, sendo as principais espécies: *A. niger*, *A. flavus*, *Penicillium sp.*, *Cladosporium sp.* e *Fusarium solani* (CARRION; BONET, 2004).

Ao comparar frutos brocados do solo e as partes aéreas de *C. canephora*, GAMA *et al.* (2005) isolaram 110 e 91 cepas de fungos dos grãos brocados que caíram no solo e os que estavam na planta, respectivamente, representados pelos gêneros *Fusarium*, *Geotrichum*, *Penicillium* e *Aspergillus*. Mais tarde, a micobiota dos grãos brocados foi determinada em grãos de *C. canephora* e partes da broca como cutícula, aparelho bucal, protórax, tubo digestivo e fezes. Neste estudo, um total de 201 fungos filamentosos foram isolados, com destaque para os gêneros *Fusarium*, *Penicillium*, *Geotrichum* e *Aspergillus*, tanto nas estruturas da broca quanto nas galerias (GAMA *et al.*, 2006).

VEGA *et al.* (1999) verificaram que as fêmeas da broca-do-café emergentes de frutos de diversas regiões produtoras, são vetores de esporos de *A. ochraceus*, *A. flavus*, *A. niger* entre outros. Num estudo sobre a micobiota da broca adulta emergida dos frutos, realizado em dois países da África (Uganda e Benin), foi encontrado que em Uganda, 5,3% dos insetos estavam infectados por *A. ochraceus* e em Benin, 17,4%. As cepas de *A. ochraceus* foram potencialmente produtoras de ocratoxina A (VEGA; MERCADIER, 1998). Entretanto, esses autores (VEGA; MERCADIER, 1998; VEGA *et al.*, 1999) não analisaram o conteúdo de ocratoxina A nessas amostras de café.

Na Índia, VELMOUROUGANE *et al.* (2010) compararam a contaminação de ocratoxina A em grãos de café arábica e robusta infestados pela broca-do-café e grãos sadios no período de três anos. Foram coletados frutos brocados do solo, deixados nas plantas, recém colhidos e grãos não brocados. Foi observado uma média de contaminação, referente aos três anos, de 8,80 µg/kg de OTA em grãos brocados que tiveram contato com o solo, seguido dos grãos brocados que

permaneceram nas plantas (4,35 µg/kg de OTA) e frutos brocados recém colhidos (2,35 µg/kg de OTA) nos cafés arábica e robusta.

VARGAS *et al.* (2004) estudaram a influência do processamento e defeitos do café na ocorrência de ocratoxina A. Neste estudo, foram coletadas 762 amostras em sua maioria de café arábica beneficiado de diferentes regiões do Brasil. Foi observado que 66,7% das amostras continham pelo menos nove tipos de defeitos. Os defeitos: ardido, brocado azulado, brocado, preto e mal formado foram os que mais contribuíram para a ocorrência e níveis de OTA no café. Contudo estes autores (VARGAS *et al.*, 2004) não estudaram o nível de infecção por fungos ocratoxigênicos nestas amostras.

2 Conclusão

É importante considerar que a infestação causada pela broca-do-café nas lavouras, além de causar perdas quantitativas aos produtores, pode também reduzir a qualidade dos grãos. Além disso, a presença de broca-do-café somada as falhas no processamento ao longo da cadeia, pode levar ao desenvolvimento de fungos e produção de toxinas, como a OTA. A redução da infestação da broca-do-café pode ser minimizada com a adoção de Boas Práticas Agrícolas nas lavouras, e as Boas Práticas durante o processamento de toda a cadeia são medidas que auxiliam na prevenção da presença de fungos e toxinas no café, melhorando a sanidade e qualidade da bebida.

3 Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Desenvolvimento da Pesquisa do Agronegócio (FUNDEPAG) pela bolsa concedida a J.B. e ao Conselho Nacional

de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida a M.H.T (Processo 305649/2014-0).

4 Referências bibliográficas

AMÉZQUETA, S.; SCHORR-GALINDO, S.; MURILLO-ARBIZU, M.; GONZÁLEZ-PEÑAS, E.; CERAIN, A. L.; GUIRAUD, J. P. OTA-producing fungi in foodstuffs: A review. **Food Control**, v. 26, p. 259–268, 2012.

BATISTA, R. L.; MARIA, S.; FERREIRA, C.; CIRILLO, M.; AZEVEDO, E.; FREITAS, R. Ochratoxin A in coffee beans (*Coffea arabica* L.) processed by dry and wet methods. **Food Control**, v. 20, n. 9, p. 784–790, 2009.

BORÉM, F. M. **Pós-colheita do café**. 1. ed. Lavras: Editora UFLA, 2008.

BRANDO, C. H. J. Harvesting and green coffee processing. In: Wintgens, J.N. (Ed.), **Coffee: Growing, Processing, Sustainable Production. A Guidebook for Growers, Processors, Traders and Researchers**, p. 610-723, 2004.

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários (AGROFIT). Brasília, DF, 2017b. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 08 de maio de 2018.

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Relatório Consolidado de Produtos Formulados. Brasil: Departamento de Defesa e Inspeção Vegetal/ Coordenação de Fiscalização de Agrotóxicos, 2009.

Disponível em: <
http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em:
12 jan. 2018.

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). Instrução normativa nº 8, de 11 de junho de 2003. Aprova o regulamento técnico da identidade e de qualidade para a classificação de café beneficiado grão cru. **Diário Oficial da União**. 10 p., 2003.

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA), Instrução normativa nº 29, de 8 de junho de 2011. Requisitos técnicos obrigatórios ou recomendados para certificação de unidades armazenadoras em ambiente natural. 19 p., 2011a. Disponível em:
<<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=visualizarAtoPortalMapa&chave=677165707>> Acesso em 04 jun. 2018.

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). Projeções do agronegócio: Brasil 2016/17 a 2026/27. Brasília, DF, 2017a. Disponível em:< <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/politica-agricola/todas-publicacoes-de-politica-agricola/projecoes-do-agronegocio/projecoes-2017-finalizado.pdf>> Acesso em: 01 jan. 2018.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consulta pública nº 61, de 3 de setembro de 2009. Disponível em:<<http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP%5B27695-1-0%5D.PDF>>
Acesso: 08 maio 2018.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada - Resolução - RDC n. 28, de 29 de agosto de 2010. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 14 jul. 2010. Disponível em: <http://www.adapar.pr.gov.br/arquivos/File/GSV/Agrotoxicos/lf_6_resolucao_RDC_28_de_2010.pdf>. Acesso em: 10 jan. 2018.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 7, de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 22 fev. 2011b. Seção 1, p. 72.

BRIDSON, D. M. Nomenclatural Notes on *Psilanthus*, Including *Coffea* sect. *Paracoffea* (Rubiaceae Tribe Coffeae). **Kew Bulletin**, v. 42, n. 2, p. 453–460, 1987.

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

COMISSÃO EUROPÉIA. Regulamento (UE) N. 1881/2006 de 19 de dezembro de 2006, Fixa os teores máximos para certos contaminantes nos gêneros alimentícios. **Jornal Oficial Da União Européia**, Bruxelas, 20 dez. 2006. Legislação 364/5. Disponível em: <<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:364:0005:0024:PT:PDF>>. Acesso em: 10 jan. 2018.

COUTURON, E.; LASHERMES, P.; CHARRIER, A. First intergeneric hybrids (*Psilanthus ebracteolatus* Hiern × *Coffea arabica* L.) in coffee trees. **Canadian Journal of Botany**, v. 76, p. 542–546, 1998.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira: café. **Monitoramento Agrícola- Safra 2016**, v.3, n. 2, p. 1-103, 2016.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira: café. **Monitoramento Agrícola- Safra 2017**, v. 4, n. 1, p. 1–98, 2017.

CURE, J. R.; SANTOS, R. H. S.; MORAES, J. C.; VILELA, E. F.; GUTIERREZ, A. P. Fenologia e dinâmica populacional da broca do café *Hypothenemus hampei* (Ferr.) relacionadas às fases de desenvolvimento do fruto. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 27, n. 3, p. 325–335, 1998.

DAMON, A. A review of the biology and control of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). **Bulletin of Entomological Research**, v. 90, p. 453–465, 2000.

EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA, 2017. Tendências do mercado de cafés em 2017. Disponível em:< http://consorciopesquisacafe.com.br/arquivos/consorcio/consumo/tendencias_do_mercado_cafe_2017.pdf>. Acesso em: 02 maio 2018.

FERRAZ, M. B. M.; FARAH, A.; IAMANAKA, B. T.; PERRONE, D.; COPETTI, M. V.; MARQUES, V. X.; VITALI, A. A.; TANIWAKI, M. H. Kinetics of ochratoxin A destruction during coffee roasting. **Food Control**, v. 21, p. 872-877, 2010.

GALVANO, F.; RITIENI, A.; PIVA, G.; PIETRI, A. Mycotoxins in the human food chain. **The mycotoxin blue book**, v. 1, p. 187–224, 2005.

GAMA, F. D. C.; TEIXEIRA, C. A. D.; GARCIA, A.; COSTA M., J. N.; LIMA, D. K. S. Influência do ambiente na diversidade de fungos associados a *Hypothenemus hampei* (Ferrari)(Coleoptera, Scolytidae) e frutos de *Coffea canephora*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, p. 359–364, 2005.

GAMA, F. C.; TEIXEIRA, C. A. D.; GARCIA, A.; COSTA J. N. M.; LIMA, D. K. S. Diversidade de fungos filamentosos associados a *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae) e suas galerias em frutos de *Coffea canephora* (Pierre). **Neotropical Entomology**, v. 35, n. 5, p. 573–578, 2006.

GEREMEW, T. ABATE, D.; LANDSCHOOT, S.; HAESAERT, G.; AUDENAERT, K. Occurrence of toxigenic fungi and ochratoxin A in Ethiopian coffee for local consumption. **Food Control**, v. 69, p. 65–73, 2016.

HAMDOUCHE, Y.; MEILE, J. C.; NGANOU, D. N.; DURAND, N.; TEYSSIER, C.; MONTET, D. Discrimination of post-harvest coffee processing methods by microbial ecology analyses. **Food Control**, v. 65, p. 112–120, 2016.

IARC, INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. In: **Monograph 56**. Lyon: World Health Organization,

1993.

INFANTE, F. Pest Management Strategies Against the Coffee Berry Borer (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, p. 24, 2018.

INGRAM, W. R. Observations on Control of Coffee Berry Borer *Hypothenemus Hampei* (Ferr) With Endosulfan in Uganda. **Bulletin of Entomological Research**, v. 57, n. 4, p. 539-547, 1968.

ILLY, A; VIANI, R. **Espresso coffee: The Science of the quality**. 2 ed. Academic Press, 2005.

JARAMILLO, J.; CHABI-OLAYE, A.; KAMONJO, C.; JARAMILLO, A.; VEGA, F. E.; POEHLING, H. M.; BORGEMEISTER, C. Thermal tolerance of the coffee berry borer *Hypothenemus hampei*: Predictions of climate change impact on a tropical insect pest. **PLoS ONE**, v. 4, n. 8, p. 1–11, 2009.

LIMA, E. A. L. **Resistência múltipla de *Coffea Canephora* Conilon A *Meloidogyne* spp: mecanismos e genes candidatos**. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Departamento de Fitopatologia, Universidade de Brasília, Brasília, 2015.

MAGNANI, M.; FERNANDES, T.; PRETE, C. E. C; HOMECHIM, M.; ONO, E. Y. S.; VILAS-BOAS, L. A.; SARTORI, D.; FURLANETO, M. C.; FUNGARO, M. H. P. Molecular identification of *Aspergillus* spp. isolated from coffee beans. **Scientia Agricola**, v. 62, n. 1, p. 45–49, 2005.

MAIER-BODE, H. Properties, effect, residues and analytics of the insecticide

endosulfan. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 22., 1968.

MARIÑO, Y. A.; PÉREZ, M. E.; GALLARDO, F.; TRIFILIO, M.; CRUZ, M.; BAYMAN, P. Sun vs. shade affects infestation, total population and sex ratio of the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*) in Puerto Rico. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 222, p. 258–266, 2016.

MESQUITA, C. M.; REZENDE, J. E.; CARVALHO, J. S.; JUNIOR, M. A. F.; MORAES, N. C.; DIAS, P. T.; CARVALHO, R. M.; ARAÚJO, W. G. **Manual do Café: Colheita e Preparo (Coffea arabica L.)**. Belo Horizonte: EMATER-MG, 2016.

NOONIM, P.; MAHAKARNCHANAKUL, W.; NIELSEN, K. F.; FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. Isolation, identification and toxigenic potential of ochratoxin A-producing *Aspergillus* species from coffee beans grown in two regions of Thailand. **International Journal of Food Microbiology**, v. 128, n. 2, p. 197–202, 2008.

PARDO, E.; MARIN, S.; RAMOS, A. J.; SANCHIS, V. Occurrence of Ochratoxigenic Fungi and Ochratoxin A in Green Coffee from Different Origins. **Food Science and Technology International**, v. 10, n. 1, p. 45–49, 2004.

PARRAS, P.; MARTÍNEZ-TOMÉ, M.; JIMÉNEZ, A. M.; MURCIA, M. A. Antioxidant capacity of coffees of several origins brewed following three different procedures. **Food Chemistry**, v. 102, n. 3, p. 582–592, 2007.

PÉREZ DE OBANOS, A.; GONZÁLEZ-PEÑAS, E.; LÓPEZ DE CERAIN, A. Influence of roasting and brew preparation on the ochratoxin A content in coffee infusion. **Food Additives and Contaminants**, v. 22, n. 5, p. 463–471, 2005.

PÉREZ, J.; INFANTE, F.; VEGA, F. E.; HOLGUÍN, F.; MACÍAS, J.; VALLE, J.; NIETO, G.; PETERSON, S. W.; KURTZMAN, C. P.; O'DONNELL, K. Mycobiota associated with the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*) in Mexico. **Mycological Research**, v. 107, n. 7, p. 879–887, 2003.

PITT, J. I. Toxigenic fungi and mycotoxins. **British Medical Bulletin**, v. 56, n.1, p. 184–192, 2000.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. New York: Springer Science Business Media, 2009.

RODRÍGUEZ, D.; CURE, J. R.; GUTIERREZ, A. P.; COTES, J. M. A coffee agroecosystem model: III. Parasitoids of the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*). **Ecological Modelling**, v. 363, p. 96–110, 2017.

SANTINATO, F.; DA SILVA, C. D.; DA SILVA, R. P.; RUAS, R. A. A.; FERNANDES, A. L. T.; SANTINATO, R. Colheita mecanizada do café em lavouras de primeira safra. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 19, n. 12, p. 1215–1219, 2015.

SCAA. SPECIALTY COFFEE ASSOCIATION OF AMÉRICA. Water Activity SCAA Standard, 2016. Disponível em: <<http://www.scaa.org/PDF/resources/scaa-water-activity-standard.pdf>>. Acesso em: 01 jan. 2018.

SELMAR, D.; BYTOF, G.; KNOPP, S. E. The storage of green coffee (*Coffea*

arabica): Decrease of viability and changes of potential aroma precursors. **Annals of Botany**, v. 101, n. 1, p. 31–38, 2008.

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**, v. 82, n. 2, p. 173–179, 2003.

TANIWAKI, M. H.; TEIXEIRA, A. A.; TEIXEIRA, A. R. R.; COPETTI, M. V.; IAMANAKA, B. T. Ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in defective coffee beans. **Food Research International**, v. 61, p. 161–166, 2014.

TEIXEIRA, C. A. D.; DE SOUZA, O.; COSTA, J. N. M. Frutos de Café “Conilon” brocados por *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae): Qual a importância de sua queda no decorrer da fase de frutificação?. **Neotropical Entomology**, n. June, p. 390–394, 2006.

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

VARGAS, E. A.; SILVA, F. B.; SANTOS, E. A.; SOUZA, S. M. C.; SOUZA, S. E.; CORRÊA, T. B. S.; FRANÇA, R. C. A.; AMORIM, S. S.; PFENNING, L. H.; BATISTA, L. R.; PEREIRA, R. T. G.; NOGUEIRA, M. D.; NACIF, A. P.; CESAR JUNIOR, P. Influence of coffee processing and defects on the incidence and occurrence of ochratoxin A. In: Park DL, Pohland A, Egmond PHV, Krska R, Quilliam M, Scussel V, Trujillo S, Njapau H, editors. **XI International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins**, May 17–21; Bethesda, MA, USA.

p. 84–85, 2004.

VEGA, F. E.; MERCADIER, G. Insects, Coffee and Ochratoxin A. **The Florida Entomologist**, v. 81, n. 4, p. 543–544, 1998.

VEGA, F. E.; MERCADIER, G.; DOWD, P. F. Fungi associated with the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae). **18th International Scientific Colloquium on Coffee (ASIC)**, Helsinki, p. 229-238, 1999.

VELMOUROUGANE, K.; BHAT. R.; GOPINANDHAN, T. N. Coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*) - A vector for toxigenic molds and ochratoxin a contamination in coffee beans. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 7, n. 10, p. 1279–1284, 2010.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. The who recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification 2009. **World Health Organization**, p. 1–60, 2010.

**CAPÍTULO 2: Micobiota de grãos de café (*C. arabica* e *C. canephora*) sadios
e brocados de regiões cafeeiras do Brasil**

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi comparar a micobiota dos grãos de café (*Coffea arabica* e *C. canephora*) nas frações dos grãos sadios (e sem broca) com os grãos brocados (e sem outros defeitos); determinar a atividade de água e a umidade, obtidos na etapa de armazenamento das principais regiões cafeeiras do Brasil. Foram analisadas um total de 80 amostras de café coletadas em diferentes locais de armazenamento. Inicialmente foram separados manualmente as frações de grãos sadios (e sem broca) dos grãos brocados (e sem outros defeitos) de cada amostra. Foi feito o plaqueamento direto de 30 grãos no meio de cultura Ágar Dichloran Glicerol 18% (DG18) e incubado a 25°C. A leitura foi feita após 7 dias de incubação e as espécies isoladas nos meios de cultura específicos em diferentes temperaturas. Todas as amostras de café analisadas (sadios e brocados) apresentaram infecção fúngica, variando de 3 a 100%. Nas frações de grãos sadios (e sem broca) foram mais presentes os fungos *Aspergillus* section *Circumdati* (73,4%), *Fusarium* sp (77,2%), *Penicillium brevicompactum* (46,8%) e *A.* section *Nigri* (40,5%), enquanto que nas frações de grãos brocados (e sem outros defeitos) foram observados, *Aspergillus* section *Circumdati* (85%), *Fusarium* sp (78,7%), *A.* section *Nigri* (53,7%) e *P. brevicompactum* (52,5%).

Palavras-chave: Café, café brocado, fungos, *Aspergillus*.

1. INTRODUÇÃO

O consumo mundial do café vem aumentando nos últimos anos, como mostram os dados da Organização Internacional do Café (ICO). No ano de 2014 o consumo foi de cerca de 151 milhões de sacas de 60kg e no ano seguinte, foi de mais de 155 milhões (ICO, 2017).

Com este aumento, os produtores e a indústria de café têm adotado estratégias a fim de oferecer um produto de melhor qualidade para concorrer neste mercado tão competitivo.

Existem diversas pragas que afetam o fruto e a lavoura do café e que podem afetar a sua produtividade e qualidade. Dentre estas, a broca-do-café (*Hypothenemus hampei* - Coleoptera: Scolitidae) é uma das principais pragas responsáveis por perdas qualitativas e quantitativas em lavouras de todo o mundo. A broca é um inseto capaz de perfurar os frutos na lavoura, formar galerias e desenvolver seu ciclo de vida no interior da semente (VEGA *et al.*, 2009).

Ao perfurar os frutos, a broca pode favorecer uma colonização interna de fungos. Na literatura existem estudos que associam alguns fungos a grãos brocados (CARRION; BONET, 2004; PÉREZ *et al.*, 2003; VEGA; MERCADIER; DOWD, 1999a; VELMOUROUGANE; BHAT; GOPINANDHAN, 2010).

A microbiota dos grãos de café pode ser influenciada desde a colheita até o armazenamento, devido as condições de alta umidade e armazenamento inadequado. Estes fatores podem colocar em risco a saúde do consumidor, devido a contaminação por fungos produtores de toxinas (LEMESSA *et al.*, 2015).

No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), estabeleceu uma tolerância máxima de 12% no teor de umidade (BRASIL, 2006). Porém estes limites nem sempre são respeitados pelos produtores, o que pode levar à contaminação por fungos e toxinas (URBANO *et al.*, 2001).

Falhas na pós colheita e injúrias nos frutos no pé de café, como a infestação da broca-do-café, podem estar ligados com a contaminação por fungos. No Brasil, existem poucos estudos que relacionam grãos brocados e infecção fúngica (GAMA *et al.*, 2005, 2006). Além disso, estes estudos são anteriores a 2013, quando o principal inseticida, Endosulfan, utilizado no combate

à praga foi banido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) fazendo com os produtores ficassem sem alternativas eficientes no controle (BRASIL, 2010).

Desta forma, o conhecimento da micobiota do café com broca e sem broca é importante, tendo em vista o aumento da infestação da broca-do-café devido a falta de controles químicos eficazes.

2. OBJETIVOS

Os objetivos foram comparar a micobiota dos grãos sadios (e sem broca) dos grãos brocados (e sem outros defeitos), de grãos de café arábica (*C. arabica*) e robusta (*C. canephora*), obtidos da etapa de armazenamento das principais regiões cafeeiras do Brasil.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAS DE CAFÉ

Um total de 80 amostras de café cru, de cerca de 2 kg cada, foram obtidas de produtores e cooperativas das seguintes regiões cafeeiras do Brasil: Sul de Minas (n=27), Cerrado Mineiro (n=21), Espírito Santo (n=12), São Paulo (n=17) e Bahia (n=3). Destas, 62 amostras foram de café arábica e 18 amostras de café robusta. As amostras foram correspondentes as safras de 2016 e 2017.

A Tabela 2.1 apresenta a quantidade de amostras de café e as regiões fornecedoras nas duas safras.

Os grãos sadios (e sem broca) e grãos brocados (e sem outros defeitos) foram separados manualmente e analisados separadamente.

As análises das amostras foram feitas no Laboratório de Microbiologia do Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos (CCQA) do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), em Campinas (SP).

3.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE ÁGUA E UMIDADE

A determinação da atividade de água das amostras de café foi feita utilizando o equipamento Aqualab Series 3TE instrument (Decagon, USA) em triplicata a 25°C±1.

A determinação da umidade nas amostras de café foi feita utilizando a metodologia descrita pela ISO 6673 (ISO, 2003). O método consistiu na utilização de cadinhos e tampas de alumínio que foram acondicionados na estufa com ventilação forçada (Marconi 035 Campinas, SP, Brasil) a 105°C por uma hora. Após este tempo, os cadinhos e tampas ficaram em dessecadores até atingirem temperatura ambiente. Na sequência, foram pesados os cadinhos com as tampas, e em seguida as amostras foram pesadas. As amostras seguiram para a estufa onde permaneceram a 105°C por 13h (±0,5h). Após este período, as amostras foram pesadas e o cálculo da umidade foi feito por meio da equação:

$$\omega = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_0}$$

Onde:

m₀= massa (g) do cadinho e tampa;

m₁= massa (g) do cadinho, tampa e amostras antes de secar;

m₂= massa (g) do cadinho, tampa e amostras depois de secar.

A umidade foi expressada em % de base úmida (b.u.)

3.3 ANÁLISE DA MICBIOTA

Cada amostra foi separada, manualmente em sub-amostras de frações de grãos sadios (e sem broca) e grãos brocados (e sem outros defeitos). Em seguida, cada sub-amostra foi desinfetada em solução de hipoclorito de sódio 0,4% com agitação por 2 minutos (PITT; HOCKING, 2009). Um total de 30 grãos, foi distribuído em 6 placas (5 grãos por placa) contendo Ágar Dicloran 18% Glicerol (DG18), conforme HOCKING; PITT (1980). As placas foram incubadas a 25°C por 7 dias. Depois de incubadas, as placas foram examinadas visualmente

com o auxílio de um estereoscópio quanto ao crescimento das colônias. Todas as espécies de fungos foram isoladas em placas de Petri contendo ágar Czapek Extrato de Levedura (CYA) a fim de serem identificadas à nível de espécie ou gênero (PITT; HOCKING, 2009).

3.4 IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS

O gênero *Aspergillus* foi isolado e inoculado em três pontos no meio ágar Czapek Extrato de Levedura (CYA) incubados a 25°C por 7 dias e o gênero *Eurotium* no meio Czapek Extrato de Levedura Ágar 20% Sacarose incubados a 25°C por 14 dias e identificados de acordo com KLICH; PITT (1988).

O gênero *Penicillium* foi inoculado em meio CYA a 25°C por 7 dias e a 37°C por 7 dias, em Ágar Extrato de Malte (MEA) e Ágar Sacarose Creatina (CREA) a 25°C por 7 dias segundo PITT (1988).

Os demais fungos foram identificados segundo a metodologia de PITT; HOCKING (2009) e SAMSON *et al.* (2010).

4. RESULTADOS

A média e variação da atividade de água (a_w) e da umidade das amostras coletadas nas safras de 2016 e 2017 pode ser visualizada na Tabela 2.2.

Houve uma variação da atividade de água de 0,419 a 0,742, sendo que apenas 4 amostras excederam o limite de 0,7 recomendado pela Associação de Cafés Especiais da América (SCAA, 2016).

A variação da umidade foi de 8,53 a 12,64 % (B.U). Sendo que 8 amostras apresentaram umidade acima de 11% (B.U.), sendo estas do Espírito Santo (2), Sul de Minas (2), Bahia (3), e São Paulo (1).

Um total de 966 fungos foram isolados das 79 sub-amostras de grãos sadios. Dos grãos brocados, das 80 sub-amostras analisadas, um total de 1.554 fungos foram isolados.

Todas as amostras de café (sadios e brocados) apresentaram infecção fúngica, variando de 3 a 100%. A média da infecção total (%) por cada região de coleta pode ser visualizada na Figura 2.1.

A maioria das amostras 58 (72,5%) apresentou maior infecção nas frações de grãos brocados. Apenas 22 (27,5%) amostras tiveram maior infecção ou infecção similar aos grãos brocados. Destas, 14 amostras são da espécie robusta cultivadas nos estados da Bahia (3), Espírito Santo (10) e São Paulo (1). O tipo de processamento pós-colheita empregado para café robusta, principalmente, no estado do Espírito Santo, difere do processamento do café arábica. No Espírito Santo o café é colhido e seco em secadores mecânicos, sem passar pela etapa de secagem no terreiro, isto explica a baixa infecção por fungos.

As frações de grãos brocados apresentaram maior infecção, com média de 76,6%, enquanto que nos sadios a média foi de 54,1%.

A micobiota dos grãos sadios e brocados apresentaram predominância dos seguintes fungos: *A. section Circumdati* em 73,4% e 85%; *Fusarium sp* em 77,2% e 78,7%; *A. section Nigri* em 40,5% e 53,7% e *P. brevicompactum* em 46,8% e 52,5%, respectivamente. Os principais gêneros e espécies de fungos isolados estão apresentados na Figura 2.2 A micobiota dos grãos de café sadios e brocados estão apresentados nas Tabelas 2.3 e 2.4, respectivamente.

As Tabelas 2.5 a 2.9 apresentam a micobiota das amostras de café sadios e brocados do Sul de Minas, Cerrado Mineiro, São Paulo, Espírito Santo e Bahia, respectivamente.

5. DISCUSSÃO

Os valores da atividade de água das amostras de café (0,419 a 0,742) foram semelhantes aos encontrados por TANIWAKI *et al.* (2014). A baixa atividade de água das amostras propiciou o crescimento de fungos xerofílicos como *A. westerdijkiae*, *A. ochraceus*, *A. niger* e *Eurotium sp.*

Das amostras analisadas 8 delas excederem 11% de umidade, nestas a média da atividade de água variou de 0,70 a 0,74 (Espírito Santo), 0,60 a 0,63 (Sul de Minas), 0,73 a 0,74 (Bahia) e 0,64 (São Paulo). O teor de umidade do café superior a 11% é um dos fatores que podem contribuir para o crescimento de fungos (SILVA; BATISTA; SCHWAN, 2008). A secagem adequada dos grãos por

parte dos produtores, pode evitar a infecção dos grãos por fungos, muitos deles, toxigênicos.

Fungos como *A. westerdijkiae* e *A. niger* foram frequentes na maioria das amostras, representando 45,29% e 17,01%, respectivamente, do total de amostras. Na Etiópia, os principais fungos isolados do café corresponderam a 79% do gênero *Aspergillus* sp, 8% de *Fusarium* sp, e 5% de *Penicillium* sp (GEREMEW *et al.*, 2016). Nas Filipinas, das 57 amostras de café analisadas, cerca de 59% e 19% das amostras estavam contaminadas com os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, respectivamente (ALVINDIA; DE GUZMAN, 2016).

Os resultados foram semelhantes aos encontrados por IAMANAKA *et al.* (2014), que analisaram amostras de café de diferentes estádios de produção: frutos imaturos, frutos maduros, café de varreção (caídos no solo), café bóia (secos na planta) e cafés de armazenamento. Os principais fungos encontrados por estes autores foram *Penicillium brevicompactum*, *Penicillium* sp. nov., *A. section Nigri*, *A. westerdijkiae* e *Fusarium lateritium*. Sendo o gênero *Aspergillus* os mais comuns nos cafés de armazenamento.

VELMOUROUGANE; BHAT; GOPINANDHAN, (2010) analisaram a infestação da broca-do-café em lavouras de café arábica e robusta na Índia e verificaram um nível de infecção de 42 a 62,5% de *A. niger* e 2 a 4% de *A. ochraceus* isolados de insetos emergentes do fruto. Já nos grãos brocados a infecção foi de 7 a 12% de *A. ochraceus* e 87,5 a 87,7% de *A. niger*.

A maioria dos fungos encontrados nos grãos sadios, também foram encontrados nos grãos brocados, porém com maior incidência nestes últimos. Isto demonstra que a broca-do-café pode transportar fungos para o interior dos frutos no campo, assim como, com a formação de galerias podendo facilitar a entrada de fungos para dentro dos frutos e propiciar um ambiente adequado para o crescimento dos mesmos. Por outro lado, as condições inadequadas de secagem e armazenamento podem favorecer o crescimento de fungos, mesmo nos grãos sadios.

6. CONCLUSÕES

Com este estudo foi verificado que os grãos de cafés brocados

apresentaram maior infecção fúngica comparado aos grãos sadios. Com destaque para *A. westerdijkiae*, *A. ochraceus*, *A. section Nigri*, *P. brevicompactum*, *Fusarium sp.*, *Penicillium sp nov* e *Eurotium sp.*

As Boas Práticas Agrícolas são essenciais para reduzir a incidência da broca-do-café e grãos brocados assim como a ocorrência de fungos. A secagem em nível seguro além de melhorar a qualidade e sanidade do café, contribui para um maior período de armazenamento do café.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVINDIA, D. G.; DE GUZMAN, M. F. Survey of Philippine coffee beans for the presence of ochratoxigenic fungi. **Mycotoxin Research**, v. 32, n. 2, p. 61-67, 2016.

ANVISA, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução - RDC n. 28, de 29 de agosto de 2010. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF. Disponível em: <http://www.adapar.pr.gov.br/arquivos/File/GSV/Agrotoxicos/lf_6_resolucao_RDC_28_de_2010.pdf>. Acesso em: 10 jan. 2018.

BRASIL. Ministério Da Agricultura, Pecuária E Abastecimento (MAPA), Portaria n. 8, de 26 de outubro de 2006. Requisitos técnicos obrigatórios ou recomendados para certificação de unidades armazenadoras em ambiente natural, 2006.

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

ICO - INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION. **Coffee prices climb to a 4-month high but subsequently fall in view of a well-supplied market**, 2017.

Disponível em:< <http://www.ico.org/documents/cy2016-17/cmr-0817-e.pdf>>

Acesso em: 08 maio 2018.

GAMA, F. C.; TEIXEIRA, C. A. D.; GARCIA, A.; COSTA, J. M. N.; LIMA, D. K. S. Influência do ambiente na diversidade de fungos associados a *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera, Scolytidae) e frutos de *Coffea canephora*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, n.3, p. 359-364, 2005.

GAMA, F. C.; TEIXEIRA, C. A. D.; GARCIA, A.; COSTA, J. M. N.; LIMA, D. K. S. Diversidade de Fungos Filamentosos Associados a *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae) e suas Galerias em Frutos de *Coffea canephora* (Pierre). **Neotropical Entomology**, v. 35, n. 5, p. 573-578, 2006.

GEREMEW, T. ABATE, D.; LANDSCHOOT, S.; HAESAERT, G.; AUDENAERT, K. Occurrence of toxigenic fungi and ochratoxin A in Ethiopian coffee for local consumption. **Food Control**, v. 69, p. 65-73, 2016.

HOCKING, A. D.; PITT, J. I. Dichloran-glycerol medium for enumeration of xerophilic fungi from low-moisture foods. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 488-492, 1980.

IAMANAKA, B. T.; TEIXEIRA, A. A.; TEIXEIRA, A.R. R.; COPETTI, M. V.; BRAGAGNOLO, N.; TANIWAKI, M. H. The mycobiota of coffee beans and its influence on the coffee beverage. **Food Research International**, v. 61, p. 33-38, 2014.

ISO, INTERNATIONAL STANDARD. Green coffee: determination of loss in mass at 105 °C: **ISO 6673:2003**. Geneva, Switzerland, 2003.

KLICH, M. A.; PITT, J. I. **A laboratory guide to the common Aspergillus species and their teleomorphs**. Commonweal ed. North Ryde, NSW, Australia, 1988.

LEMESSA, F.; ABERA, A.; ADUNGA, G.; GAREDEW, W. Association of

mycoflora with coffee (*Coffea arabica* L.) beans at limmu coffee plantation, southwestern Ethiopia. **Plant Pathology Journal**, v. 14, n. 3, p. 136-141, 2015.

PÉREZ, J.; INFANTE, F.; VEGA, F. E.; HOLGUÍN, F.; MACÍAS, J.; VALLE, J.; NIETO, G.; PETERSON, S. W.; KURTZMAN, C. P.; O'DONNELL, K. Mycobiota associated with the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*) in Mexico. **Mycological Research**, v. 107, n. 7, p. 879-887, 2003.

PITT, J. I. **A Laboratory Guide to Common *Penicillium* Species**. 2nd edn. North Ryde, N.S.W.: CSIRO Division of Food Research, 1988.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and Food Spoilage**. Springer Science Business Media: New York, 2009.

SAMSON, R. A., HOEKSTRA, E. S., THRANE, U., FRISVAD, J. C., & ANDERSEN, B. **Food and indoor fungi**. Utrecht, the Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2010.

SCAA, SPECIALTY COFFEE ASSOCIATION OF AMÉRICA. Water Activity SCAA Standard, 2016. Disponível em: <<http://www.scaa.org/PDF/resources/scaa-water-activity-standard.pdf>>. Acesso em: 01 jan. 2018.

SILVA, C. F.; BATISTA, L. R.; SCHWAN, R. F. Incidence and distribution of filamentous fungi during fermentation, drying and storage of coffee (*Coffea arabica* L.) beans. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 521-526, 2008.

TANIWAKI, M. H.; TEIXEIRA, A. A.; TEIXEIRA, A. R. R.; COPETTI, M. V.; IAMANAKA, B. T. Ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in defective coffee beans. **Food Research International**, v. 61, p. 161-166, 2014.

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

VEGA, F. E.; INFANTE, F.; CASTILLO, A.; JARAMILLO, J. The coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae): a short review, with recent findings and future research directions. **Terrest. Arthropod Rev.**, v. 2, p. 129-147, 2009.

VELMOUROUGANE, K.; BHAT. R.; GOPINANDHAN, T. N. Coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*) - A vector for toxigenic molds and ochratoxin a contamination in coffee beans. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 7, n. 10, p. 1279-1284, 2010.

CAPÍTULO 2: Micobiota de grãos de café (*C. arabica* e *C. canephora*) sadios e brocados de regiões cafeeiras do Brasil (Tabelas e Figuras)

Tabela 2.1 Número de amostras de café coletadas nas safras de 2016 e 2017 e as regiões fornecedoras.

Região	Número de amostras /Ano	
	2016	2017
Sul de Minas	14	13
Cerrado Mineiro	10	11
Espírito Santo	11	1
Bahia	3	0
São Paulo	14	3
Total	52	28

Tabela 2.2 Média e variação da atividade de água (a_w) e da umidade das amostras de café coletadas em diferentes regiões.

Região	Média a_w	Variação a_w	Média umidade (% B.U.)	Variação umidade (% B.U.)
Sul de Minas (n=27)	0,55	0,50 -0,64	9,84	9,35 - 11,80
Espírito Santo (n=12)	0,67	0,54 - 0,74	10,25	8,47 - 12,53
Cerrado Mineiro (n=21)	0,52	0,45 - 0,57	9,44	8,53 - 10,17
Bahia (n=3)	0,73	0,73-0,74	12,24	11,76 - 12,64
São Paulo (n=17)	0,56	0,43 - 0,65	9,92	7,54 - 11,26

Tabela 2.3 Frequência de ocorrência (%), média de infecção (%) e variação de infecção (%) dos isolados em 79 amostras de café sadios.

Cafés sadios (n=79)			
Fungos	FO (%)	MI (%)	VI (%)
<i>A. ochraceus</i>	16,46	1,24	0,00 - 26,64
<i>A. section Flavi</i>	2,53	0,08	0,00 - 3,33
<i>A. section Nigri</i>	40,51	6,60	0,00 - 56,61
<i>A. tamaritii</i>	5,06	0,21	0,00 - 6,67
<i>A. westerdijkiae</i>	73,42	15,38	0,00 - 100,00
<i>Absidia sp</i>	1,27	0,04	0,00 - 3,33
<i>A. versicolor</i>	1,27	0,04	0,00 - 3,33
<i>Chaetomium sp.</i>	1,27	0,04	0,00 - 3,33
<i>Cladosporium sp</i>	36,71	3,07	0,00 - 54,00
<i>E. amstelodami</i>	2,53	0,38	0,00 - 20,00
<i>E. chevalierii</i>	20,25	5,40	0,00 - 96,54
<i>E. herbariorum</i>	2,53	0,42	0,00 - 23,30
<i>E. repens</i>	1,27	0,37	0,00 - 29,97
<i>E. rubrum</i>	10,13	1,53	0,00 - 69,90
<i>Endomyces fibuliger</i>	18,99	2,02	0,00 - 29,97
<i>Eurotium sp.</i>	2,53	0,35	0,00 - 19,98
<i>Fusarium sp</i>	77,22	15,87	0,00 - 56,61
<i>Levedura</i>	6,33	0,31	0,00 - 6,67
<i>P. brevicompactum</i>	46,84	6,61	0,00 - 56,66
<i>P. citrinum</i>	3,80	0,13	0,00 - 3,33
<i>Penicillium sp</i>	12,66	1,55	0,00 - 36,60
<i>Penicillium sp. nov.</i>	15,19	1,27	0,00 - 19,98
<i>Ryzopus sp</i>	1,27	0,04	0,00 - 3,33
<i>Syncephalastrum sp</i>	1,27	0,04	0,00 - 3,33
<i>Zigomicetos</i>	6,33	0,34	0,00 - 9,99

FO (Frequência de Ocorrência) = Número de amostras infectadas/número total de amostras analisadas.

MI (Média de infecção)= Soma dos valores de infecção das amostras/ número total de amostras analisadas.

VI (Variação de infecção)= Variação da infecção de cada isolado.

Tabela 2.4 Frequência de ocorrência (%), média de infecção (%) e variação de infecção (%) de cada isolado em 80 amostras de cafés brocados.

Cafés Brocados (n=80)							
Fungos	FO (%)	MI (%)	VI(%)	Fungos	FO (%)	MI (%)	VI (%)
<i>A. candidus</i>	1,25	0,04	0,00 - 3,33	<i>Endomyces fibuliger</i>	21,25	3,54	0,00 - - 26,66
<i>A. ochraceus</i>	22,50	1,72	0,00 - 26,64	<i>Eurotium sp.</i>	3,75	0,37	0,00 - 24,00
<i>A. penicilioides</i>	1,25	0,08	0,00 - 6,67	Fungos dematiáceos	2,50	0,08	0,00 - 6,67
<i>A. section Flavi</i>	3,75	0,17	0,00 - 6,67	<i>Fusarium sp</i>	78,80	27,12	0,00 - 73,26
<i>A. section Nigri</i>	53,75	10,10	0,00 - 76,66	Levedura	6,25	0,29	0,00 - 6,67
<i>A. sydowii</i>	2,50	0,08	0,00 - 3,33	<i>P. atramentosum</i>	1,25	0,04	0,00 - 3,32
<i>A. tamaritii</i>	12,50	0,70	0,00 - 13,32	<i>P. brevicompactum</i>	52,50	12,15	0,00 - 73,26
<i>A. westerdijkae</i>	85,00	28,51	0,00 - 96,67	<i>P. citrinum</i>	3,75	0,19	0,00 - 9,99
<i>Absidia sp</i>	3,75	0,12	0,00 - 3,33	<i>P. thymicola</i>	1,25	0,04	0,00 - 3,33
<i>Cladosporium sp</i>	51,25	5,94	0,00 - 29,97	<i>Penicillium sp</i>	11,25	1,22	0,00 - 29,97
<i>E. amstelodami</i>	3,75	0,17	0,00 - 3,33	<i>Penicillium sp. nov.</i>	20,00	2,17	0,00 - 43,3
<i>E. chevalieri</i>	23,75	4,08	0,00 - 49,95	<i>Phoma sp</i>	1,25	0,04	0,00 - 3,33
<i>E. herbariorum</i>	6,25	1,16	0,00 - 29,97	<i>Ryzopus sp</i>	6,25	0,22	0,00 - 4,46
<i>E. repens</i>	2,50	0,15	0,00 - 8,00	Zigomicetos	6,25	0,40	0,00 - 9,99
<i>E. rubrum</i>	10,00	0,79	0,00 - 23,33				

FO (Frequência de Ocorrência) = Número de amostras infectadas/número total de amostras analisadas.

MI (Média de infecção)= Soma dos valores de infecção das amostras/ número total de amostras analisadas.

VI (Variação de infecção)= Variação da infecção de cada isolado.

Tabela 2.5 Micobiota associada dos grãos de café sadios e brocados do Sul de Minas.

Região	Sul de Minas (n=27)			Sul de Minas (n=27)			
	Tipo do grão	Grãos sadios			Grãos Brocados		
		Isolado	FO (%)	MI (%)	VI (%)	FO (%)	MI (%)
	<i>A. ochraceus</i>	7,41	0,30	0,00 - 4,46	7,41	0,22	0,00 - 4,46
	<i>A. penicilioides</i>	0,00	0,00	0,00	3,70	0,22	0,00 - 6,67
	<i>A. section Flavi</i>	0,00	0,00	0,00	7,41	0,37	0,00 - 13,33
	<i>A. section Nigri</i>	25,93	2,39	0,00 - 38,00	48,15	3,16	0,00 - 13,33
	<i>A. sydowii</i>	92,59	21,19	0,00	96,30	39,86	0,00 - 3,33
	<i>A. westerdijkiae</i>	0,00	0,00	0,00 - 90,00	3,70	0,12	0,00 - 96,57
	<i>Chaetomium sp.</i>	3,70	0,12	0,00 - 3,33	0,00	0,00	0,00
	<i>Cladosporium sp.</i>	37,04	5,18	0,00 - 54,00	59,26	6,88	0,00 - 23,31
	<i>E. amstelodami</i>	0,00	0,00	0,00	3,70	0,12	0,00 - 3,33
	<i>E. chevalieri</i>	3,70	0,07	0,00 - 2,00	0,00	0,00	0,00
	<i>E. herbariorum</i>	0,00	0,00	0,00	3,70	0,59	0,00 - 16,65
	<i>E. repens</i>	3,70	0,22	0,00 - 6,67	3,70	0,30	0,00 - 8,00
	<i>E. rubrum</i>	11,11	0,44	0,00 - 6,67	7,41	0,25	0,00 - 3,33
	<i>Endomyces fibuliger</i>	33,33	3,70	0,00 - 29,97	25,93	4,69	0,00 - 26,67
	<i>Eurotium sp.</i>	0,00	0,00	0,00	3,70	0,89	0,00 - 24,00
	<i>Fusarium sp.</i>	88,89	17,74	0,00 - 33,33	96,30	36,58	0,00 - 73,26
	<i>Levedura</i>	11,11	0,28	0,00 - 3,33	7,41	0,37	0,00 - 6,67
	<i>P. brevicompactum</i>	85,19	16,38	0,00 - 53,28	81,48	25,51	0,00 - 73,26
	<i>P. citrinum</i>	0,00	0,00	0,00	3,70	0,07	0,00 - 2,00
	<i>Penicillium sp.</i>	0,00	0,00	0,00	18,52	2,76	0,00 - 29,97
	<i>Penicillium sp. nov.</i>	37,04	2,74	0,00 - 13,33	0,00	0,00	0,00
	<i>Phoma sp.</i>	0,00	0,00	0,00	3,70	0,12	0,00 - 3,33
	<i>Ryzopus sp.</i>	0,00	0,00	0,00	7,41	0,25	0,00 - 3,33

FO (Frequência de Ocorrência) = Número de amostras infectadas/número total de amostras analisadas.

MI (Média de infecção)= Soma dos valores de infecção das amostras/ número total de amostras analisadas.

VI (Variação de infecção)= Variação da infecção de cada isolado.

Tabela 2.6 Micobiota associada dos grãos de café sadios e brocados do Cerrado Mineiro.

Região	Cerrado Mineiro (n=21)			Cerrado Mineiro (n=21)		
	Grãos sadios			Grãos brocados		
Tipo de grãos	FO (%)	MI (%)	VI (%)	FO (%)	MI (%)	VI (%)
<i>A. section Nigri</i>	9,52	0,32	0,00 - 3,33	9,52	0,32	0,00 - 3,33
<i>A. westerdijkiae</i>	85,71	18,55	0,00 - 29,97	100,00	78,73	6,67 - 59,94
<i>Cladosporium sp.</i>	61,90	4,17	0,00 - 13,32	80,95	10,62	0,00 - 26,64
<i>E. amstelodami</i>	0,00	0,00	0,00	4,76	0,16	0,00 - 3,33
<i>Endomyces fibuliger</i>	28,57	2,85	0,00 - 19,98	42,86	7,29	0,00 - 26,64
<i>Eurotium sp.</i>	0,00	0,00	0,00	4,76	0,16	0,00 - 3,33
<i>Fusarium sp.</i>	100,00	25,37	3,33 - 56,61	100,00	38,85	19,98 - 69,93
<i>Levedura</i>	19,05	0,79	0,00	9,52	0,48	0,00 - 6,67
<i>Levedura</i>	0,00	0,00	0,00 - 6,67	4,76	0,16	0,00
<i>P. atramentosum</i>	42,86	2,06	0,00	38,10	3,17	0,00 - 3,33
<i>P. brevicompactum</i>	9,52	0,32	0,0 - 9,99	9,52	0,63	0,00 - 20,00
<i>P. citrinum</i>	0,00	0,00	0,00 - 3,33	4,76	0,16	0,00 - 9,99
<i>P. thymicola</i>	4,76	0,32	0,00	4,76	0,16	0,00 - 3,33
<i>Penicillium sp.</i>	85,71	18,55	0,00 - 6,67	100,00	78,73	0,00 - 3,33

FO (Frequência de Ocorrência) = Número de amostras infectadas/número total de amostras analisadas.

MI (Média de infecção)= Soma dos valores de infecção das amostras/ número total de amostras analisadas.

VI (Variação de infecção)= Variação da infecção de cada isolado.

Tabela 2.7 Micobiota associada aos grãos sadios e brocados do Espírito Santo.

Região	Espírito Santo (n=12)			Espírito Santo (n=12)		
	Tipo de grãos	Grãos sadios			Grãos brocados	
Isolado	FO (%)	MI (%)	VI (%)	FO (%)	MI (%)	VI (%)
<i>A. ochraceus</i>	25,00	1,11	0,00 - 6,77	41,67	1,83	0,00 - 6,67
<i>A. section Flavi</i>	8,33	0,28	0,00 - 3,33	8,33	0,28	0,00 - 3,33
<i>A. section Nigri</i>	91,67	22,26	0,00 - 56,61	91,67	25,51	0,00 - 73,2
<i>A. tamaritii</i>	0,00	0,00	0,00	8,33	0,28	0,00 - 3,33
<i>A. westerdijkiae</i>	25,00	1,39	0,00 - 9,99	25,00	1,28	0,00 - 6,67
<i>Absidia sp</i>	0,00	0,00	0,00	16,67	0,56	0,00 - 3,33
<i>A. sydowii</i>	0,00	0,00	0,00	8,33	0,28	0,00 - 3,33
<i>Cladosporium sp.</i>	8,33	0,17	0,00 - 2,00	0,00	0,00	0,00
<i>E. amstelodami</i>	8,33	1,67	0,00 - 19,98	16,67	0,56	0,00 - 3,33
<i>E. chevalieri</i>	75,0	15,43	0,00 - 96,57	58,33	4,42	0,00 - 26,64
<i>E. repens</i>	0,00	0,00	0,00	8,33	0,28	0,00 - 4,00
<i>Eurotium sp.</i>	8,33	0,67	0,00 - 8,00	8,33	0,17	0,00 - 2,00
Fungos dematiáceos	0,00	0,00	0,00	8,33	0,56	0,00 - 6,67
<i>Fusarium sp.</i>	25,00	1,94	0,00 - 13,32	16,67	3,55	0,00 - 36,63
<i>P. brevicompactum</i>	8,33	0,56	0,00 - 6,67	0,00	0,00	0,00
<i>Penicillium sp.</i>	8,33	0,33	0,00 - 3,33	8,33	1,11	0,00 - 13,32
<i>Penicillium sp. nov.</i>	8,33	0,67	0,00 - 6,67	8,33	1,11	0,00 - 13,32
Zigomiceto	33,33	1,94	0,00 - 9,99	25,00	1,39	0,00 - 9,99

FO (Frequência de Ocorrência) = Número de amostras infectadas/número total de amostras analisadas.

MI (Média de infecção)= Soma dos valores de infecção das amostras/ número total de amostras analisadas.

VI (Variação de infecção)= Variação da infecção de cada isolado.

Tabela 2.8 Micobiota associada dos grãos de café sadios e brocados de São Paulo.

Região	São Paulo (n=16)			São Paulo (n=17)		
Tipo de grãos	Grãos sadios			Grãos brocados		
Isolado	FO (%)	MI (%)	VI (%)	FO (%)	MI (%)	VI (%)
<i>A. ochraceus</i>	37,50	3,95	0,00 - 26,6	47,06	5,88	0,00 - 26,64
<i>A. section Nigri</i>	56,25	9,99	0,00 - 36,6	76,47	22,33	0,00 - 76,59
<i>A. tamaritii</i>	25,00	1,04	0,00 - 6,7	41,18	2,74	0,00 - 13,32
<i>A. versicolor</i>	6,25	0,21	0,00 - 3,3	0,00	0,00	0,00
<i>A. westerdijkiae</i>	62,50	14,36	0,00 - 66,6	94,12	24,49	0,00 - 63,27
<i>Absidia sp</i>	6,25	0,21	0,00 - 3,3	5,88	0,20	0,00 - 3,33
<i>Cladosporium sp.</i>	25,00	0,83	0,00 - 3,3	47,06	3,92	0,00 - 13,33
<i>E. amstelodami</i>	6,25	0,62	0,00 - 10	0,00	0,00	0,00
<i>E. chevalieri</i>	18,75	3,12	0,00 - 26,6	52,94	8,03	0,00 - 43,29
<i>E. herbariorum</i>	6,25	0,62	0,00 - 10	11,76	0,78	0,00 - 6,67
<i>E. rubrum</i>	25,00	6,04	0,00 - 70	35,29	3,33	0,00 - 23,31
<i>Endomyces fibuliger</i>	0,00	0,00	0,00	5,88	0,20	0,00 - 3,33
<i>Eurotium sp.</i>	6,25	1,25	0,00 - 20	0,00	0,00	0,00
<i>Fusarium sp.</i>	68,75	13,32	0,00 - 46,6	76,47	19,00	0,00 - 66,67
Levedura	0,00	0,00	0,00	5,88	0,20	0,00 - 3,33
<i>P. brevicompactum</i>	18,75	1,67	0,00 - 20	52,94	8,42	0,00 - 36,63
<i>P. citrinum</i>	6,25	0,21	0,00 - 3,3	0,00	0,00	0,00
<i>Penicillium sp.</i>	6,25	0,21	0,00 - 3,3	11,76	0,39	0,00 - 3,33
<i>Penicillium sp. nov.</i>	6,25	1,25	0,00 - 20	0,00	0,00	0,00
<i>Ryzopus sp.</i>	6,25	0,21	0,00 - 3,3	17,65	0,67	0,00 - 4,66
<i>Syncephalastrum sp</i>	6,25	0,21	0,00 - 3,3	0,00	0,00	0,00

FO (Frequência de Ocorrência) = Número de amostras infectadas/número total de amostras analisadas.

MI (Média de infecção)= Soma dos valores de infecção das amostras/ número total de amostras analisadas.

VI (Variação de infecção)= Variação da infecção de cada isolado.

Tabela 2.9 Micobiota associada dos grãos de café sadios e brocados da Bahia.

Região	Bahia (n=3)			Bahia (n=3)		
	Grãos sadios			Grãos brocados		
Tipo dos grãos	FO (%)	MI (%)	VI (%)	FO (%)	MI (%)	VI (%)
<i>A. candidus</i>	0,00	0,00	0,00	33,33	1,11	0,00 - 3,33
<i>A. ochraceus</i>	66,67	4,44	0,00 - 9,99	66,67	3,33	0,00 - 6,67
<i>A. section Flavi</i>	33,33	1,11	0,00- 3,33	0,00	0,00	0,0
<i>A. section Nigri</i>	100,00	7,77	3,33 - 13,32	100,00	10,00	6,66 - 13,32
<i>A. westerdijkae</i>	66,67	2,22	0,00 - 3,33	0,00	0,00	0,00
<i>E. chevalieri</i>	100,00	63,27	43,3 - 83,25	100,00	45,51	26,6 - 59,94
<i>E. herbariorum</i>	33,33	7,77	0,00 - 23,31	66,67	21,09	0,00 - 33,33
<i>E. repens</i>	33,33	7,77	0,00 - 23,31	0,00	0,00	0,00
<i>Fusarium sp</i>	33,33	1,11	0,00 - 3,33	0,00	0,00	0,00
<i>P. brevicompactum</i>	33,33	1,11	0,00 - 3,33	66,67	24,42	0,00 - 49,95
Zigomicetos	33,33	1,11	0,00 - 3,33	66,67	2,22	0,00 - 3,33

FO (Frequência de Ocorrência) = Número de amostras infectadas/número total de amostras analisadas.

MI (Média de infecção)= Soma dos valores de infecção das amostras/ número total de amostras analisadas.

VI (Variação de infecção)= Variação da infecção de cada isolado.

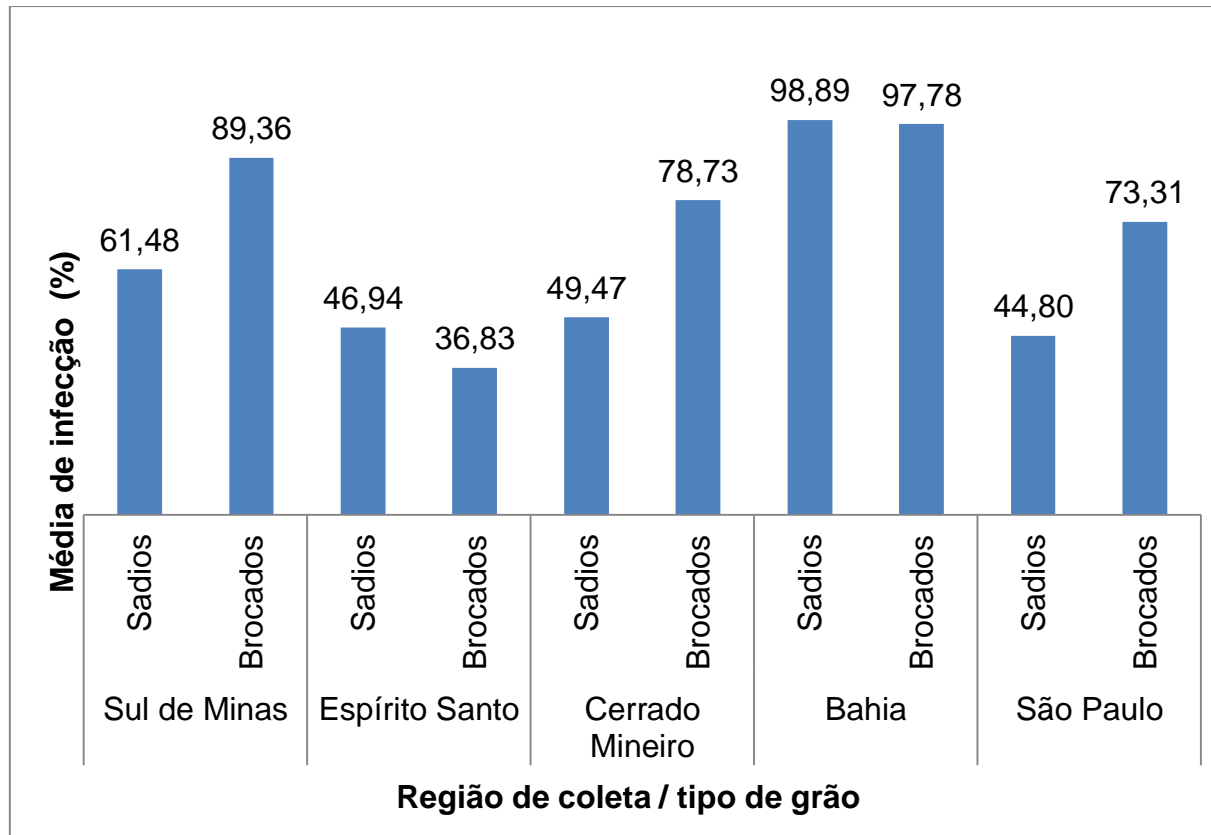


Figura 2.1. Média de infecção dos grãos sadios e brocados por região analisada.

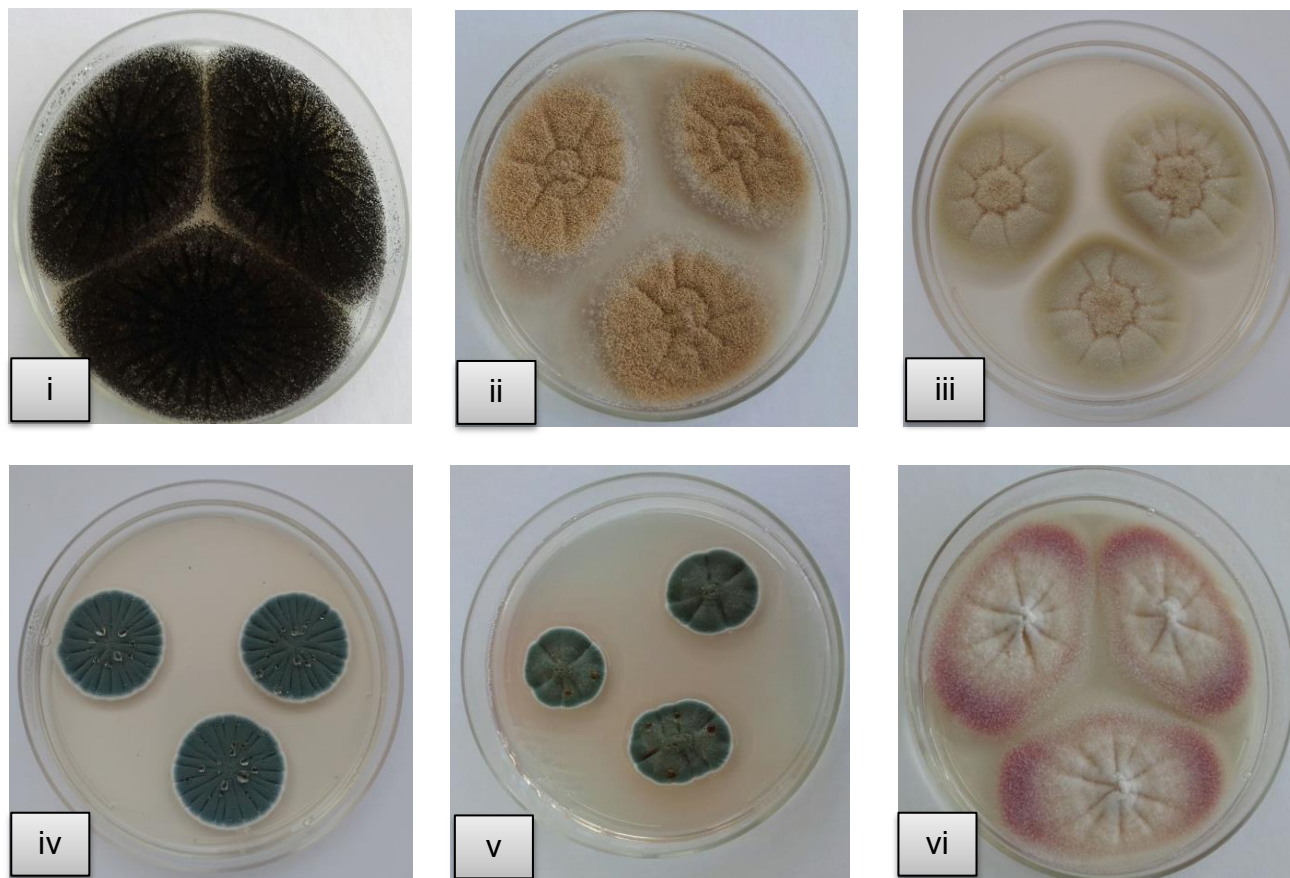


Figura 2.2 Colônias de fungos isoladas nas amostras de café sadio e brocado em meio CYA incubados a 25°C.

i: *A. section Nigri*; ii: *A. ochraceus*; iii: *A. westerdijkiae*; iv: *Penicillium sp. nov.*; v: *P. brevicompactum*; vi: *Fusarium sp.*

CAPÍTULO 3: Comparação da incidência de fungos ocratoxigênicos e ocratoxina A em grãos de cafés sadios e brocados

RESUMO

O presente estudo teve como objetivos: (i) comparar a incidência de fungos ocratoxigênicos e ocratoxina A em grãos sadios (e sem broca) e grãos brocados (e sem outros defeitos) de café. (ii) isolar e identificar os fungos potencialmente produtores de ocratoxina A (OTA); (iii) testar a produção de ocratoxina A nas cepas potencialmente ocratoxigênicas e (iv) determinar a atividade de água e umidade das amostras de café; e (v) determinar o nível de contaminação por ocratoxina A nas frações de grãos sadios (e sem broca) e grãos brocados (e sem outros defeitos) nas amostras de café, coletadas em diferentes regiões brasileiras. Um total de 82 amostras de café cru foram separados manualmente, entre os grãos brocados e os grãos sadios. Inicialmente foi feita a desinfecção superficial dos grãos sadios e dos grãos brocados e plaqueados diretamente no meio de cultura Ágar Dicloran 18% Glicerol (DG18). Após o período de incubação, as colônias foram isoladas e inoculadas em meios de cultura específico para identificação. *Aspergillus* section *Nigri* e *A. section Circumdati* foram inoculadas no meio de cultura Yeast Extrat Sucrose Agar (YESA) a fim de testar a produção de ocratoxina A, pela técnica de ágar *plug* associada à Cromatografia de Camada Delgada (CCD). Os níveis de concentração de OTA nos grãos sadios e grãos brocados, foram determinados pela extração com solvente orgânico e limpeza em coluna de imunoafinidade. A quantificação e detecção de OTA foi realizada em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com detector de fluorescência. Nas amostras de grãos sadios e brocados, observou-se uma alta incidência de fungos potencialmente ocratoxigênicos representados por *A. section Nigri* e *A. section Circumdati*. Nos grãos sadios, dentre os 169 isolados de *A. section Nigri* e 413 de *A. section Circumdati*, 8 (4,7%) e 278 (67,3%), respectivamente, foram produtores de OTA. Nos grãos brocados, dos 261 isolados de *A. section Nigri* e 728 de *A. section Circumdati*, 6 (2,3%) e 522 (70,1%), respectivamente, foram produtores de OTA. A contaminação de OTA foi superior nas frações de grãos brocados (e sem outros defeitos) comparado aos grãos sadios (e sem broca), nas amostras do Cerrado Mineiro, São Paulo, Bahia e Espírito Santo. A contaminação das amostras de grãos sadios e brocados nas regiões do Sul de Minas, Cerrado

Mineiro, São Paulo e Bahia diferiram significativamente ao nível de 5% de probabilidade, de acordo com o Teste-F.

Palavras-chave: Café, broca-do-café, fungos ocratoxigênicos, ocratoxina A.

1. INTRODUÇÃO

Dentre as espécies botânicas do gênero *Coffea*, as mais cultivadas e comercializadas no mundo são: *Coffea arabica* (arábica) e *Coffea canephora* (robusta). Essas duas espécies apresentam diferentes formas de cultivo, manejo, além de serem diferentes na análise sensorial.

O café arábica apresenta qualidade superior ao robusta, pois geralmente é cultivado em altitudes superiores a 800 metros, sendo que cafés sem a presença de defeitos e cultivados em altitudes superiores a 920 metros apresentam maior qualidade sensorial comparado a altitudes inferiores (SILVA *et al.*, 2004). O café arábica também apresenta maior preço de mercado.

O café robusta pode ser cultivado ao nível do mar, é geralmente utilizado na formação de blends com o café arábica e pode apresentar até o dobro da quantidade de cafeína encontrada no café arábica (BICHO *et al.*, 2013). Essas duas espécies também apresentam diferença no processamento pós-colheita, em que o café robusta em grande parte de sua produção é preparada por via-seca.

O método mais simples de processar os frutos recém colhidos é por via-seca. Nesta técnica, o café recém colhido é direcionado para um lavador-separador onde serão separados por diferença de densidade dos grãos. A parte que flutua, isto é, com menor densidade, é chamada de “bóia”, composta pelo café seco na árvore, frutos mal granados, brocados e outros. A parte que submerge é constituída pelos grãos mais densos: verdes e maduros (BORÉM, 2008). Em seguida os grãos são esparramados no terreiro para serem secos, naturalmente, ao sol.

Já o método por via-úmida pode ser conduzido por três formas: retirando-se a casca em um descascador mecânico e a mucilagem através da fermentação em tanques com água, resultando num café despulpado; removendo-se a casca e parte da mucilagem de forma mecânica, sendo este chamado de cereja descascado (CD); ou removendo-se mecanicamente a casca e a mucilagem, produzindo o café desmucilado (BORÉM, 2008). O resultado são grãos com pergaminho. Este processo ajuda na homogeneidade dos grãos e também no processo de secagem em terreiro (HAMDOUCHE *et al.*, 2016).

O cuidado em cada etapa do processo é importante para assegurar a qualidade microbiológica do café que chega ao consumidor (AMÉZQUETA *et al.*, 2012). Durante a etapa de secagem em terreiros, o café natural ou descascado apresenta elevada umidade, sendo necessário o revolvimento constante dos frutos até atingir uma umidade segura (BORÉM, 2008), a fim de manter a qualidade do café. Além disso, é importante prevenir a ocorrência de fungos ocratoxigênicos e a produção de ocratoxina A (OTA) durante a etapa de pós-colheita (PATERSON; LIMA; TANIWAKI *et al.*, 2014)

No café, os principais fungos ocratoxigênicos são do grupo *Aspergillus* section *Circumdati*, representados por *A. ochraceus*, *A. westerdijkiae*, *A. steynii*, *A. melleus* e a do grupo *A. section Nigri*, como *A. niger* e *A. carbonarius* (BATISTA *et al.*, 2009; FRISVAD *et al.*, 2004; TANIWAKI *et al.*, 2003; NOONIM *et al.*, 2008; URBANO *et al.*, 2001).

A ocratoxina A (OTA) é o resultado do metabolismo secundário de algumas espécies de fungos filamentosos. Esta toxina é considerada nefrotóxica, teratogênica e possivelmente carcinogênica em humanos, sendo classificada pela Agência Internacional de Pesquisa do Câncer (IARC) no grupo 2B (IARC, 1993). Devido à exposição humana e estudos toxicológicos em animais, o Comitê Permanente da União Européia, estabeleceu o limite máximo de ocratoxina A em 5µg/kg para café torrado e café torrado e moído, e 10µg/kg para café solúvel (COMISSÃO EUROPÉIA, 2005). Estes limites a serem atingidos após os processos de torração são considerados baixos para alguns países produtores, o que dificulta a exportação para os países europeus.

No Brasil, a RDC nº 7 de fevereiro de 2011, estabeleceu o limite máximo de 10 µg/kg para ocratoxina A em café torrado, café torrado e moído e café solúvel (BRASIL, 2011).

A presença de certos defeitos no café, principalmente os defeitos pretos e ardidos mostraram as maiores concentrações de OTA, comparados aos grãos sadios (TANIWAKI *et al.*, 2014).

O inseto *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae), é responsável por causar o defeito “brocado” nos frutos ainda na lavoura. A broca é capaz de perfurar os frutos, e se alimentar dos mesmos, gerando prejuízos aos

agricultores e à indústria do café em todas as partes do mundo (INFANTE; PÉREZ; VEGA, 2014).

VELMOUROUGANE; RAJEEV; THIRUKONDA (2010) estudaram a ocorrência da ocratoxina A em *Hypothenemus hampei* na Índia, afirmando que este inseto pode ser carreador de esporos de fungos ocratoxigênicos para o interior do café, aumentando assim a contaminação por OTA nos grãos brocados.

No Brasil, faltam estudos sobre a incidência de fungos ocratoxigênicos em grãos de cafés brocados e sua relação com a produção de ocratoxina A. Em 2013, o endosulfan, principal agente químico para combater a broca no campo foi banido, por ser considerado altamente tóxico. Este fato fez com que os produtores de café ficassem sem alternativas químicas no combate à praga, gerando uma grande perda de café. Além disso, a Resolução nº 14 de 2014 da Anvisa (BRASIL, 2014), dispõe sobre os limites de tolerância de matérias estranhas para alimentos e bebidas, incluindo o café torrado e moído, em 60 fragmentos de insetos por 25g de café. Esta Resolução foi aprovada apenas um ano após o Endosulfan ser banido do mercado.

2. OBJETIVOS

Nestas condições, os objetivos deste estudo foram isolar e identificar os fungos potencialmente produtores de ocratoxina A; testar a produção da toxina das cepas; determinar o nível de contaminação por OTA nas frações grãos sadios (e sem broca) e grãos brocados (e sem outros defeitos); e determinar a atividade de água e umidade das amostras de café.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAS DE CAFÉ

Um total de 82 amostras de café beneficiado (contendo 300g a 2 kg) foram obtidas de produtores, cooperativas e comércios das seguintes regiões: Sul de Minas (n=32), Cerrado Mineiro (n=27), Bahia (n=3), Espírito Santo (n=2), Goiás

(n=2), São Paulo (n=17). Estas amostras continham grãos sadios (sem a presença de defeitos) e grãos brocados.

Os grãos sadios (e sem broca) e grãos brocados (e sem outros defeitos) foram separados manualmente e analisados separadamente. As análises das amostras foram feitas no Laboratório de Microbiologia do Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos (CCQA) do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), em Campinas (SP).

3.2 ATIVIDADE DE ÁGUA

A determinação da atividade de água das amostras de café foi feita com os grãos sadios e brocados juntos, utilizando o equipamento Aqualab Series 3TE instrument (Decagon, EUA) em triplicata a 25°C±1.

3.3 UMIDADE DO CAFÉ

A determinação da umidade nas amostras de café foi feita utilizando a metodologia descrita pela ISO 6673 (ISO, 2003). O método consistiu na utilização de cadinhos e tampas de alumínio que foram tarados na estufa com ventilação forçada (Marconi 035 Campinas, SP, Brasil) a 105°C por uma hora. Após este tempo, os cadinhos e tampas ficaram em dessecadores até atingirem temperatura ambiente. Na sequência, foram pesados os cadinhos com as tampas, e em seguida as amostras foram pesadas. As amostras seguiram para a estufa onde permaneceram a 105°C por 13h (±0,5h). Após este período, as amostras foram pesadas e o cálculo da umidade foi feito por meio da equação:

$$\omega = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_0}$$

m₀= massa (g) do cadinho e tampa;

m₁= massa (g) do cadinho, tampa e amostras antes de secar;

m₂= massa (g) do cadinho, tampa e amostras depois de secar.

A umidade foi expressada em % de base úmida (b.u.)

3.4 PLAQUEAMENTO DIRETO DAS AMOSTRAS

Trinta grãos sadios e trinta grãos brocados foram analisados separadamente, para isto, foram desinfectados superficialmente em solução de hipoclorito de sódio (0,4%), com agitação por 2 minutos (PITT; HOCKING, 2009). Em seguida foram plaqueados em 6 placas (5 grãos por placa) contendo Ágar Dicloran 18% Glicerol (DG18), conforme HOCKING; PITT (1980). As placas foram incubadas a 25°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) por 7 dias. Os resultados foram expressos em % de infecção fúngica.

3.5 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES COM POTENCIAL OCRATOXIGÊNICOS

Os fungos potencialmente produtores de OTA foram isolados e inoculados em 3 três pontos no meio CYA (Czapek Yeast Extract) e incubados a 25°C por 7 dias (PITT; HOCKING, 2009). Após este período, os isolados de *A. section Circumdati* e *A. section Nigri* foram inoculados no meio CYA a 37°C por 7 dias e MEA (Malt Extract Agar) a 25°C por 7 dias.

3.6 TESTE DE PRODUÇÃO DE OCRATOXINA A

As cepas de *A. section Circumdati* e *A. section Nigri* com potencial de produção de OTA foram inoculadas em meio YESA (Yeast Extrat Sucrose Agar) e incubadas a 25°C por 7 dias.

Após a incubação, foi feito um *plug* de cada isolado na placa e a extração da toxina foi feita com a solução de metanol/clorofórmio (1:1) e aplicado a uma placa de sílica gel de Cromatografia de Camada Delgada (CCD), conforme a metodologia de FILTENBORG *et al.* (1983). O padrão de OTA foi adicionado junto, antes da corrida cromatográfica. A placa foi desenvolvida com fase móvel contendo tolueno/acetato de etila/ácido fórmico/clorofórmio (7:5:2:5, v/v/v/v). A leitura dos cromatogramas foi realizada com o auxílio de um Cromatovisor, com

lâmpada ultravioleta de comprimento de onda de 365 nm e 254 nm, e a comparação da fluorescência no mesmo fator de retenção do padrão de OTA.

3.7 DETERMINAÇÃO DE OCRATOXINA A EM CAFÉ SADIO E BROCADO

A determinação de OTA nas amostras foi feita de acordo com VARGAS; DOS SANTOS; PITTET (2005).

3.7.1 EXTRAÇÃO DA OCRATOXINA A

As frações de grãos sadios e grãos brocados foram triturados, separadamente, em moinho IKA (IKA A11 basic, Campinas, SP, Brazil) e peneirados numa peneira com abertura de 1mm. Em seguida, foi feita a extração da toxina para cada uma das frações de café.

Nesta etapa, foi tomada uma alíquota de 12,5g de grãos de café, extraído com 100 ml de solução de metanol bicarbonato (3%) (1:1, v/v) com agitação no shaker por 30 minutos. Em seguida foi feita a filtração em filtro de papel qualitativo (Nalgon, Alemanha) e fibra de vidro (Vicom, EUA). Foi coletado 4 ml do filtrado e adicionado 96 ml de PBS e num balão volumétrico. Na sequência, este volume foi passado pela coluna de imunoafinidade Ochratest WB (Vicom, EUA) num fluxo de 1-2 gotas por segundo. Após lavar a coluna com 30 ml de água destilada, a toxina foi eluída com 4 mL de metanol grau HPLC. O extrato foi seco numa chapa aquecida com ação de nitrogênio e ressuspendido com 300µL de fase móvel.

3.7.2 DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE OCRATOXINA A POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

A detecção e quantificação de ocratoxina A no café sadio e brocado foi feita por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) utilizando um equipamento com injetor automático, com detector de fluorescência de 333 nm de excitação e 477 nm de detecção (Agilent1260 Infinity, EUA). Foi injetado um volume de 20µL e a separação cromatográfica ocorreu numa coluna C18 fase

reversa a 40°C. A fase móvel utilizada foi Acetonitrila: Metanol: Água: Ácido acético (30:30:39:01,v/v/v/v) com fluxo de 0,8 mL/min. Foi utilizado um padrão de OTA a fim de determinar a massa da toxina (ng) e o tempo de corrida (minutos).

3.7.3 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO

A verificação de recuperação da OTA foi feita em todos os dias de análise, através da adição do padrão de OTA numa amostra de café. Foi realizado o limite de detecção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ) por meio da contaminação com 0,79µg/kg de OTA em 8 repetições (10g) numa amostra de café que não apresentou contaminação natural. A otimização da metodologia seguiu as recomendações propostas pela EURACHEM GUIDES (2014).

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Na análise estatística foi utilizada o Teste-F, que avalia se existem diferenças significativas entre as variâncias de duas populações (LAPPONI, 2005). A significância estatística foi de 5% de probabilidade. Neste teste foi verificado se existem diferenças na concentração de OTA em grãos de café sadios e brocados de acordo com a região de origem de cada amostra.

4. RESULTADOS

4.1 ATIVIDADE DE ÁGUA E UMIDADE DO CAFÉ

Nas amostras de café analisadas (82 sub-amostras de café sadio e 82 sub-amostras de café brocado), a média da atividade de água das amostras variou de 0,52 a 0,74, e o teor de umidade foi de 8,46 a 12,64 de acordo com a metodologia ISSO 6673 (ISSO, 2003). A Tabela 3.1 apresenta os valores médios da atividade de água e umidade, bem como a variação nas regiões coletadas.

4.2 FUNGOS OCRATOXIGÊNICOS NO CAFÉ SADIO E CAFÉ BROCADO

Das amostras de grãos sadios (e sem broca) e grãos brocados (e sem outros defeitos), observou-se uma alta incidência de fungos potencialmente ocratoxigênicos representados por *A. section Nigri* e *A. section Circumdati*. Estes foram caracterizados pela morfologia das colônias e crescimento a 37°C, como *A. ochraceus* (com crescimento a 37°C) e *A. westerdijkiae* (sem crescimento a 37°C).

Nos grãos sadios foram isolados 169 (17,5%) cepas de *A. section Nigri* e 421 (43,6%) cepas de *A. section Circumdati*. Nos grãos brocados foram isolados 269 (17,3%) cepas de *A. section Nigri* e 744 (47,9%) cepas de *A. section Circumdati*.

Nos grãos sadios (e sem broca), de todos os isolados de *A. section Nigri* (169) testados, 8 cepas (4,7%) foram produtoras de OTA. Das 413 cepas de *A. section Circumdati* testadas, 278 (67,3%) foram produtoras de OTA, destas todas foram identificadas como *A. westerdijkiae*.

Nos grãos brocados (e sem outros defeitos), das 261 cepas de *A. section Nigri* testadas, apenas 6 (2,3%) isolados foram produtoras de OTA. Já para *A. section Circumdati* um total de 728 cepas testadas 522 (70,1%) foram produtoras de OTA, destes apenas uma cepa foi identificada como *A. ochraceus*.

As Tabelas 3.2 e 3.3 apresentam a incidência de fungos ocratoxigênicos por região. As amostras do Espírito Santo apresentaram a maior ocorrência de *A. section Nigri*, enquanto que as amostras do Sul de Minas apresentaram a maior ocorrência de *A. section Circumdati*, seguida pela região do Cerrado Mineiro. Nos grãos brocados, a infecção por *A. section Circumdati* produtores de OTA foi maior nas amostras do Sul de Minas, Cerrado Mineiro, São Paulo e Espírito Santo. Em relação a *A. section Nigri* produtores de OTA a incidência nos grãos sadios das amostras de São Paulo foram próximas, e no Espírito Santo a ocorrência nos grãos brocados foi menor que nos sadios.

Os grãos *Coffea arabica* tiveram maior predominância de *A. westerdijkiae* (50,6%), enquanto que nos grãos de *C. canephora*, as espécies de *A. section Nigri* (53,5%) e *A. ochraceus* (12,4%) foram mais incidentes.

Na Tabela 3.4 estão apresentadas a Infecção de fungos ocratoxigênicos nos grãos de cafés sadios e brocados das espécies *C. arabica* e *C. canephora*

das regiões do Sul de Minas, Cerrado Mineiro e São Paulo e; na Tabela 3.5 as regiões do Espírito Santo e Bahia.

4.3 OCRATOXINA A NOS GRÃOS SADIOS E BROCADOS

A presença de ocratoxina A nas amostras de grãos sadios e de grãos brocados e os níveis de contaminação podem ser visualizados na Tabela 3.6. O limite de detecção (LOD) para ocratoxina A foi de $0,11\mu\text{g}/\text{kg}$ e o limite de quantificação (LOQ) foi de $0,37\mu\text{g}/\text{kg}$.

Um total de 57 sub-amostras de grãos sadios apresentaram níveis de contaminação por OTA superior ao LOD. Para os grãos brocados, 71 sub-amostras tiveram níveis superiores ao LOD.

A média de concentração de OTA foi superior nas frações de grãos brocados comparado a contaminação dos grãos sadios nas amostras do Cerrado Mineiro, São Paulo, Bahia e Espírito Santo.

Os cromatogramas referentes a análise de contaminação por OTA dos grãos sadios e brocados podem ser visualizados nas Figuras 3.1 e 3.2, respectivamente.

Nas Tabelas 3.7 e 3.8, estão apresentados os resultados do Teste F dos grãos de café sadios e brocados por região. A análise do Teste F nas amostras de grãos brocados e sadios permitiu verificar que a média de contaminação por OTA nos grãos brocados nas regiões do Sul de Minas, Cerrado Mineiro, Espírito Santo, São Paulo e Bahia foram superiores aos grãos sadios. Apenas nas duas amostras da região de Goiás, a média de contaminação nos grãos sadios ($0,3\mu\text{g}/\text{kg}$) foram superiores aos grãos brocados ($0,2\mu\text{g}/\text{kg}$).

A contaminação das amostras de grãos sadios e brocados nas regiões do Sul de Minas, Cerrado Mineiro, São Paulo e Bahia diferiram significativamente ao nível de 5% de probabilidade (F calculado maior que o F tabelado). Enquanto que nas amostras do Espírito Santo e Goiás, não houve diferença significativa entre a contaminação de grãos sadios e brocados (F calculado menor que o F tabelado).

5. DISCUSSÃO

O grão de café é um substrato susceptível à infecção por fungos quando existem boas condições de temperatura e umidade, em particular aos fungos potencialmente produtores de OTA. KOUADIO *et al.* (2012) analisaram a presença de fungos e produção de OTA nas amostras de café robusta, e verificaram que de 2,4 a 3,8% de *A. niger* foram produtores de OTA. Por outro lado, 100% das cepas de *A. ochraceus* (e espécies pertencentes a *A. section Circumdati*) foram produtoras de OTA. MORELLO *et al.* (2007) fizeram uma comparação genética das espécies de *A. ochraceus* e *A. westerdijkiae* isoladas de café do Brasil, demonstrando que a maioria dos isolados antes identificados como *A. ochraceus*, eram na verdade *A. westerdijkiae*.

Na literatura, poucos trabalhos tem relacionado a presença de fungos potencialmente produtores de OTA com a broca-do-café. VEGA; MERCADIER; DOWD (1999) verificaram que 5,3% e 17,4% dos insetos (*H. hampei*) estavam infectados com *A. ochraceus* em Uganda e Benin, respectivamente. Os autores sugeriram que o inseto pode ser um vetor deste fungo, porém, neste trabalho não foi realizado o teste de produção de OTA. Outros trabalhos têm mencionado apenas a micobiota nos grãos infestados e no inseto (CARRION; BONET, 2004; GAMA *et al.*, 2006; PÉREZ *et al.*, 2003; VEGA; MERCADIER; DOWD, 1999).

A infecção por fungos no café é influenciada pelo manejo na pré e pós-colheita. Falhas durante a secagem e condições inadequadas (temperatura e umidade) de armazenamento e transporte podem contribuir para o desenvolvimento de fungos ocratoxigênicos e OTA (PALACIOS-CABRERA *et al.*, 2007; PATERSON; LIMA; TANIWAKI *et al.*, 2014). BATISTA *et al.* (2009) verificaram que no processamento por via-seca a incidência de fungos como *A. section Nigri* e *A. section Circumdati* foi maior, devido a não remoção da casca durante a etapa de secagem.

No presente estudo, o Teste F de estatística, mostrou que a concentração de OTA nos grãos brocados diferiu estatisticamente dos grãos sadios a 5% de probabilidade, isto é, os grãos brocados apresentaram maior contaminação por OTA do que os grãos sadios.

Nos estudos de VELMOUROUGANE; RAJEEV; THIRUKONDA (2010) na Índia, com grãos de café arábica e robusta brocados e não brocados do solo, do pé-de-café, recém colhidos, foi revelado que nos grãos sem infestação da broca, os níveis de OTA foram baixos ou sem contaminação.

A broca pode ser um vetor para fungos ocratoxigênicos por facilitar a entrada dos mesmos no café. Entretanto, o presente trabalho demonstrou que mesmo os grãos sadios (sem broca), podem ser contaminados por OTA, dependendo dos processos de pós-colheita de secagem e armazenagem. Desta forma as Boas Práticas Agrícolas podem ajudar a controlar a broca-do-café além de evitar a contaminação por fungos ocratoxigênicos e ocratoxina A, melhorando a qualidade da bebida.

6. CONCLUSÃO

Este trabalho permitiu comparar a incidência de fungos ocratoxigênicos e ocratoxina A no café infestado pela broca (e sem outros defeitos) e nos grãos sadios (e sem broca). A broca-do-café pode ser um vetor de fungos ocratoxigênicos e ainda permitir que os fungos cresçam no interior dos grãos e produzam a OTA. No entanto, a adoção das Boas Práticas Agrícolas em toda a cadeia produtiva do café pode reduzir a incidência de OTA, reduzir os grãos brocados e melhorar a qualidade da bebida.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMÉZQUETA, S.; SCHORR-GALINDO, S.; MURILLO-ARBIZU, M.; GONZÁLEZ-PEÑAS, E.; CERAIN, A. L.; GUIRAUD, J. P. OTA-producing fungi in foodstuffs: A review. **Food Control**, v. 26, p. 259-268, 2012.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. Resolução n. 7, de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 22 fev. 2011a. Seção 1, p. 72.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. Resolução n. 14, de 28 de março de 2014. Dispõe sobre matérias estranhas macroscópicas e microscópicas em alimentos e bebidas, seus limites de tolerância e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 28 mar. 2014. Seção 1, p. 58.

BATISTA, R. L.; MARIA, S.; FERREIRA, C.; CIRILLO, M.; AZEVEDO, E.; FREITAS, R. Ochratoxin A in coffee beans (*Coffea arabica* L.) processed by dry and wet methods. **Food Control**, v. 20, n. 9, p. 784-790, 2009.

BICHO, N. C.; LIDON, F. C.; RAMALHO, J. C.; LEITÃO, A. E. Quality assessment of Arabica and Robusta green and roasted coffees - A review. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, v. 25, n. 12, p. 945-950, 2013.

BORÉM, F. M. Pós-colheita do café. 1. ed. Lavras: Editora UFLA, 2008.

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

EURACHEM GUIDES. The fitness for purpose of analytical methods. **A laboratory guide to method validation and related topics**. LGC, Teddington,

2nd ed., 2014.

COMISSÃO EUROPÉIA. Regulamento (UE) n. 123/2005 de 26 de janeiro de 2005. Altera o regulamento (UE) n. 466/2001 relativo a ocratoxina A. **Official Journal of the European Union**, L 25, p. 3-5, 2005.

FILTENBORG, O.; FRISVAD, J. C.; SVENDSEN, J. A. Simple screening method for molds producing intracellular mycotoxins in pure cultures. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 581-585, 1983.

FRISVAD, J. C.; FRANK, J. M.; P.; HOUBRAKEN J. A. M.; KUIJPERS, A. F. A.; SAMSON, R. A. New ochratoxin A producing species of *Aspergillus* section *Circumdati*. **Studies in Mycology**, v. 50, n. May 2014, p. 23-43, 2004.

GAMA, F. C.; TEIXEIRA, C. A. D.; GARCIA, A.; COSTA, M., J.N. & LIMA, D. K. Diversidade de Fungos Filamentosos Associados a *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae) e suas Galerias em Frutos de *Coffea canephora* (Pierre). **Neotropical Entomology**, v. 35, n. 5, p. 573-578, 2006.

HAMDOUCHE, Y.; MEILE, J. C.; NGANOU, D. N.; DURAND, N.; TEYSSIER, C.; MONTET, D. Discrimination of post-harvest coffee processing methods by microbial ecology analyses. **Food Control**, v. 65, p. 112-120, 2016.

HOCKING, A. D.; PITT, J. I. Dichloran-glycerol medium for enumeration of xerophilic fungi from low-moisture foods. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 488-492, 1980.

IARC, INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. **Monograph 56**. Lyon: World Health Organization, 1993.

INFANTE, F.; PÉREZ, J.; VEGA, F. E. The coffee berry borer: the centenary of a biological invasion in Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 74, n. 3 suppl 1, p.

s125-s126, ago. 2014.

ISO, INTERNATIONAL STANDARD. Green coffee: determination of loss in mass at 105 °C: **ISO 6673:2003**. Geneva, Switzerland, 2003.

KOUADIO, I. A.; KOFFI, L. B.; NEMLIN, J. G.; DOSSO, M. B. Effect of Robusta (*Coffea canephora* P.) coffee cherries quantity put out for sun drying on contamination by fungi and Ochratoxin A (OTA) under tropical humid zone (Côte d'Ivoire). **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 6, p. 1969-1979, 2012.

LAPPONI, J.C. **Estatística usando Excel**. Rio de Janeiro: 4 ed. Editora Campus, 2005.

MORELLO, L. G.; SARTORI, D.; MARTINEZ, A. L. O.; VIEIRA, M. L. C.; TANIWAKI, M. H.; FUNGARO, M. H. P. Detection and quantification of *Aspergillus westerdijkiae* in coffee beans based on selective amplification of β -tubulin gene by using real-time PCR. **International Journal of Food Microbiology**, v. 119, n. 3, p. 270-276, 2007.

NOONIM, P.; MAHAKARNCHANAKUL, W.; NIELSEN, K. F.; FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. Isolation, identification and toxigenic potential of ochratoxin A-producing *Aspergillus* species from coffee beans grown in two regions of Thailand. **International Journal of Food Microbiology**, v. 128, n. 2, p. 197-202, 2008.

PALACIOS-CABRERA, H.; TANIWAKI, M. H.; MENEZES, H. C.; IAMANAKA, B. T.L. Effect of temperature and relative humidity during transportation on green coffee bean moisture content and ochratoxin A production. **Journal of Food Protection**, v. 70, n. 1, p. 164-71, 2007.

PATERSON, R. R. M.; LIMA, N.; TANIWAKI, M. H. Coffee, mycotoxins and climate change. **Food Research International**, v. 61, p. 1-15, 2014.

PÉREZ, J.; INFANTE, F.; VEGA, F. E.; HOLGUÍN, F.; MACÍAS, J.; VALLE, J.;

NIETO, G.; PETERSON, S. W.; KURTZMAN, C. P.; O'DONNELL, K. Mycobiota associated with the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*) in Mexico. **Mycological Research**, v. 107, n. 7, p. 879-887, 2003.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. Fungi and Food Spoilage. **Springer Science Business Media**: New York, 2009.

SILVA, R. F.; PEREIRA, R. G. F. A.; BORÉM, F. M.; MUNIZ, J. A. Qualidade do café-cereja descascado produzido na região sul de Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 28, n. 6, p. 1367-1375, 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**, v. 82, n. 2, p. 173-179, 2003.

TANIWAKI, M. H.; TEIXEIRA, A. A.; TEIXEIRA, A. R. R.; COPETTI, M. V.; IAMANAKA, B. T. Ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in defective coffee beans. **Food Research International**, v. 61, p. 161-166, 2014.

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

VARGAS, E. A.; DOS SANTOS, E. A.; PITTET, A. Determination of ochratoxin A in green coffee by immunoaffinity column cleanup and liquid chromatography: Collaborative study. **Journal of AOAC International**, v. 88, n. 3, p. 773-779, 2005.

VEGA, F.; MERCADIER, G.; DOWD, P. Fungi associated with the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae). International Scientific Colloquium on Coffee, August 1999, Helsinki. Association Scientifique Internationale du Café (ASIC). p. 229-238, 1999.

VELMOUROUGANE, K.; RAJEEV, B.; THIRUKONDA, G. N. Coffee Berry Borer (*Hypothenemus hampei*) - A vector for toxigenic molds and ochratoxin A contamination in coffee beans. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 7, n. 10, p. 1279-1284, 2010.

CAPÍTULO 3: Comparação da incidência de fungos ocratoxigênicos e ocratoxina A em grãos de cafés sadios e brocados (Tabelas e Figuras)

Tabela 3.1 Média e variação da atividade de água (a_w) e umidade das amostras de café em diferentes regiões produtoras.

Região	Média a_w	Variação a_w	Média da umidade (% B.U.)	Variação umidade (% B.U.)
Bahia	0,74	0,74 - 0,74	11,41	10,12 - 12,64
Cerrado	0,52	0,45 - 0,56	9,44	8,53 - 10,17
Espírito Santo	0,58	0,54 - 0,62	10,25	8,47 - 12,53
Goiás	0,55	0,54 - 0,55	10,16	10,12 - 10,21
São Paulo	0,57	0,43 - 0,65	9,92	7,54 - 11,26
Sul de Minas	0,54	0,50 - 0,64	9,78	9,13 - 11,80

Tabela 3.2 Ocorrência de *A. section Nigri* nas amostras, grãos sadios e brocados por região analisada.

Região (n)	Isolados <i>A. section Nigri</i> (% de produtores)	
	Cafés sadio	Cafés brocados
Bahia (3)	7 (0%)	9 (0%)
Cerrado Mineiro (21)	2 (0%)	2 (0%)
Espírito Santo (12)	190 (2,6%)	105 (0,9%)
São Paulo (17)	48 (8,3%)	122 (4,1%)
Sul de Minas (27)	27 (0%)	31 (0%)

n= Número de amostras de café analisadas.

Tabela 3.3 Ocorrência de *A. section Circumdati* nas amostras, grãos sadios e brocados por região analisada.

Região (n)	Isolados <i>A. section Circumdati</i> (% de produtores)	
	Cafés sadio	Cafés brocados
Bahia (3)	7(25,6%)	3 (0%)
Cerrado Mineiro (21)	116 (58,6%)	233 (54,5)
Espírito Santo (12)	9 (22,2%)	10 (30%)
São Paulo (17)	89 (70,8%)	160 (64,4%)
Sul de Minas (27)	200 (72%)	338 (85,5%)

n= Número de amostras de café analisadas.

Tabela 3.4. Infecção por fungos ocratoxigênicos nos grãos sadios e brocados das amostras de café das regiões do Sul de Minas, Cerrado Mineiro e São Paulo.

Região	Espécie	Isolado	FO (%)		MI (%)		VI (%)	
			Sadios	Brocados	Sadios	Brocados	Sadios	Brocados
Sul de Minas	<i>C. arabica</i> (n=27)	<i>A. westerdijkae</i>	92,59	96,30	21,19	39,86	0,00 - 96,57	0,00 - 96,57
		<i>A. ochraceus</i>	7,41	7,41	0,30	0,22	0,00 - 4,00	0,00 - 4,00
		<i>A. section Nigri</i>	25,93	48,15	2,39	3,16	0,00 - 38,00	0,00 - 13,33
Cerrado Mineiro	<i>C. arabica</i> (n=21)	<i>A. westerdijkae</i>	85,71	100,00	18,55	78,73	0,00 - 29,97	6,67 - 59,94
		<i>A. ochraceus</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
		<i>A. section Nigri</i>	9,52	9,52	0,32	0,32	0,00 - 3,33	0,00 - 3,33
São Paulo	<i>C. arabica</i> (n=13)	<i>A. westerdijkae</i>	50,00	92,31	9,25	22,03	0,00 - 66,66	0,00 - 43,33
		<i>A. ochraceus</i>	16,70	30,77	0,55	1,02	0,00 - 3,33	0,00 - 3,33
		<i>A. section Nigri</i>	41,70	69,23	3,05	8,71	0,00 - 36,66	0,00 - 36,63
São Paulo	<i>C. canephora</i> (n=4)	<i>A. westerdijkae</i>	100,00	100,00	30,80	32,47	6,6 - 43,33	13,3 - 43,33
		<i>A. ochraceus</i>	100,00	100,00	14,15	21,65	3,3 - 26,66	10 - 26,66
		<i>A. section Nigri</i>	100,00	100,00	26,64	66,60	10 - 36,63	53,3 - 76,67

FO (Frequência de Ocorrência) = Número de amostras infectadas/número total de amostras analisadas. MI (Média de Infecção) = Soma dos valores de infecção das amostras/ número total de amostras analisadas. VI (Variação de Infecção) = variação de grãos infectados numa amostra.

Tabela 3.5 Infecção por fungos ocratoxigênicos nos grãos de café sadios e brocados das amostras das regiões do Espírito Santo e Bahia.

Região	Espécie	Isolado	FO (%)		MI (%)		VI (%)	
			Sadios	Brocados	Sadios	Brocados	Sadios	Brocados
Espírito Santo	<i>C. arabica</i> (n=1)	A. <i>westerdijkae</i>	100,00	100,00	9,99	6,66	9,99	6,66
		<i>A. ochraceus</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
		<i>A. section Nigri</i>	100,00	100,00	36,63	60,00	36,63	60,00
Espírito Santo	<i>C. canephora</i> (n=11)	A. <i>westerdijkae</i>	18,18	27,27	0,61	0,78	0,00 - 3,3	0,00 - 3,33
		<i>A. ochraceus</i>	27,3	45,5	1,2	2,0	0,00 - 6,7	0,00 - 6,77
		<i>A. section Nigri</i>	90,9	90,9	21,0	22,4	0,00 - 56,6	0,00 - 73,26
Bahia	<i>C. canephora</i> (n=3)	A. <i>westerdijkae</i>	66,67	0,00	1,39	0,00	0,00 - 3,33	0,00
		<i>A. ochraceus</i>	66,67	66,67	1,11	3,33	0,00 - 9,99	0,00- 6,67
		<i>A. section Nigri</i>	100,00	100,00	22,26	9,99	0,00- 13,33	6,66 - 13,33

FO (Frequência de Ocorrência) = Número de amostras infectadas/número total de amostras analisadas. MI (Média de Infecção) = Soma dos valores de infecção das amostras/ número total de amostras analisadas. VI (Variação de Infecção) = variação de grãos infectados numa amostra.

Tabela 3.6 Contaminação por ocratoxina A (OTA) nos grãos de café sadios e brocados nas regiões produtoras do Brasil.

Região	Tipo do grão/ número de amostras	OTA > LOD	OTA > 2 µg/kg	Média (µg/kg)	Varição (µg/kg)
Sul de Minas	Sadio (32)	24 (75%)	2 (6,25%)	1,05	0,00 - 20,36
	Brocado (32)	30 (93,75%)	11 (32,37%)	6,34	0,00 - 57,83
Cerrado Mineiro	Sadio (27)	22 (81,48%)	6 (22,22%)	4,92	0,00 - 53,29
	Brocado (27)	15 (55,55%)	14 (51,85%)	36,48	0,00 - 541,08
Espírito Santo	Sadio (2)	1 (50%)	-	0,15	0,00 - 0,3046
	Brocado (2)	2(100%)	-	0,91	0,83 - 0,99
São Paulo	Sadio (16)	7 (43,75%)	3 (18,75%)	0,55	0,00 - 2,58
	Brocado (16)	11 (68,75%)	7 (45,75%)	21,76	0,00 - 284,07
Bahia	Sadio (3)	2 (66,67%)	-	0,49	0,00 1,19
	Brocado (3)	3 (100%)	2 (66,67%)	21,92	0,11 - 63,36
Goiás	Sadio (2)	1 (50%)	-	0,30	0,10 - 0,50
	Brocado (2)	1 (50%)	-	0,17	0,00 - 0,25

LOD= Limite de detecção.

Tabela 3.7 Resultado do Teste F para as amostras de café sadios e brocados das regiões Sul de Minas, Cerrado Mineiro e São Paulo.

Dados	Sul de Minas		Cerrado Mineiro		São Paulo	
	Grãos Sadios	Grãos Brocados	Grãos Sadios	Grãos Brocados	Grãos Sadios	Grãos Brocados
Média (µg/Kg)	1,1	6,3	4,9	36,5	0,9	21,1
Variância	13,0	204,3	134,4	12296,6	5,0	4945,5
Número de amostras	32	32	27	27	16	16
GL	31	31	26	26	15	15
F calc	15,8		91,5		989,4	
P valor	0,0		0,0		0,0	
F tab	1,8		1,9		2,4	

Fcal = F calculado. $F_{cal} = \frac{Maior S1^2}{Menor S2^2}$

GL = Grau de liberdade (n-1); n= número de amostras analisadas.

F tab = F tabelado. Valor consultado na Tabela VI - Distribuição F ao nível de probabilidade de 5%. (Figura 3.3)

P valor= Probabilidade de significância

Tabela 3.8 Resultado do Teste F para as amostras de café sadios e brocados das regiões Espírito Santo, Bahia e Goiás.

Dados	Espírito Santo		Bahia		Goiás	
	Grãos Sadios	Grãos Brocados	Grãos Sadios	Grãos Brocados	Grãos Sadios	Grãos Brocados
Média (µg/Kg)	0,2	0,9	0,5	21,9	0,3	0,2
Variância	0,05	0,01	0,4	1289,0	0,08	0,01
Número de amostras	2	2	3	3	2	2
GL	1	1	2	2	1	1
F calc	3,6		3310,2		5,8	
P valor	0,3		0,0		0,3	
F tab	161,4		19,0		161,4	

Fcal = F calculado. $F_{cal} = \frac{Maior S1^2}{Menor S2^2}$

GL = Grau de liberdade (n-1); n= número de amostras analisadas.

F tab = F tabelado. Valor consultado na Tabela VI - Distribuição F ao nível de probabilidade de 5%. (Figura 3.3)

P valor= Probabilidade de significância

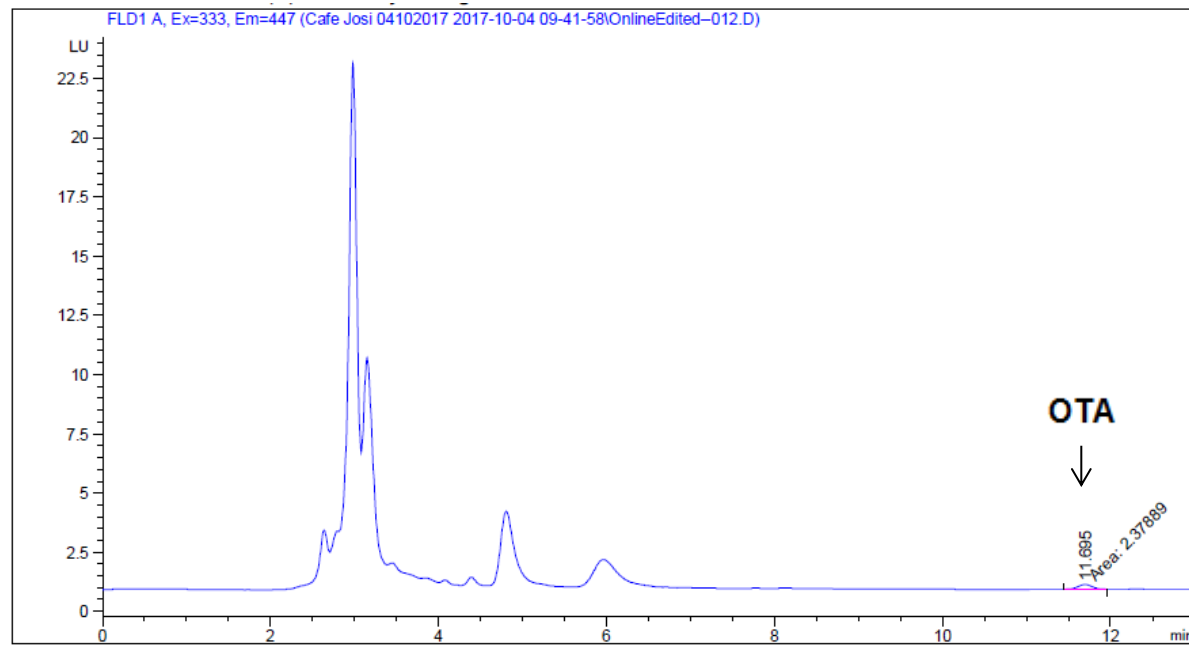


Figura 3.1 Cromatograma de uma amostra de café sadio naturalmente contaminada com 0,50 µg/kg de OTA.

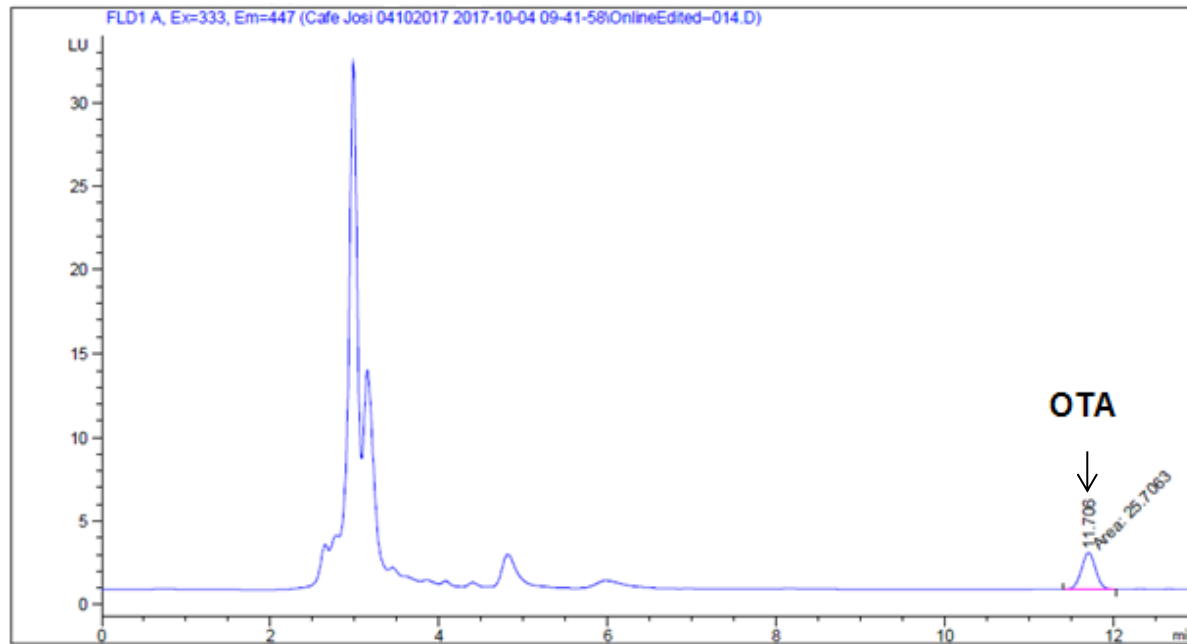


Figura 3.2 Cromatograma de uma amostra de café brocado naturalmente contaminado com 6,04 μ g/kg de OTA.

CAPÍTULO 4: CONCLUSÃO GERAL E TRABALHOS A SEREM PUBLICADOS

1. CONCLUSÃO GERAL

As seguintes conclusões puderam ser obtidas:

- Foi possível verificar que os fungos ocratoxigênicos e a ocratoxina A foram incidentes nas amostras de café coletadas de diferentes regiões do Brasil e nas duas espécies analisadas.

- Foi verificado que os grãos de cafés brocados (e sem outros defeitos) apresentaram maior infecção fúngica comparado aos grãos sadios (e sem broca) nas amostras de café do Sul de Minas, Cerrado Mineiro e São Paulo. No entanto, o processo de secagem em nível seguro e as boas condições de armazenagem podem garantir a qualidade e sanidade do café.

- A broca-do-café (*Hypotenemus hampei*) pode ser um vetor de fungos ocratoxigênicos ao perfurar os frutos na lavoura e ainda permitir que os fungos cresçam no interior dos grãos e produzam a OTA.

- Por meio do Teste-F foi possível verificar que a contaminação das amostras de grãos sadios (e sem broca) e grãos brocados (e sem outros defeitos) nas regiões do Sul de Minas, Cerrado Mineiro, São Paulo e Bahia diferiram significativamente ao nível de 5% de probabilidade (F calculado maior que o F tabelado).

- A adoção das Boas Práticas Agrícolas em toda a cadeia produtiva do café pode reduzir a incidência de OTA tanto nos grãos sadios quanto nos grãos brocados, assim como reduzir a presença de grãos brocados e melhorar a qualidade da bebida.

2. TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSO

Trabalho intitulado: “Comparação da incidência de fungos ocratoxigênicos e ocratoxina A em café com broca e sem broca” apresentado no 43º Congresso de Pesquisas Cafeeiras em Poços de Caldas - Minas Gerais, no período de 07 a 10 de novembro de 2017.

3. TRABALHOS A SEREM ENVIADOS PARA PUBLICAÇÃO

Bueno, J. & Taniwaki, M, H. 2018. Qualidade do café versus defeitos: broca-do-café (*Hypotenemus hampei*), fungos e ocratoxina A. Trabalho submetido ao Brazilian Journal of Food Technology no dia 08 de maio de 2018.

Bueno, J., Martins, L. M., Iamanaka, B. T., Taniwaki, M. H. Mycobiota associated with the coffee berry borer and sound beans in Brazilian coffee. Food Microbiology.

Bueno, J., Martins, L. M., Iamanaka, B. T., Taniwaki, M. H. Comparison between the incidence of Ochratoxigenic Fungi and Ochratoxin A in coffee berry borer and normal coffee berry. International Journal of Food Microbiology.