

**CARLOS EDUARDO KANIA**

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS ASSOCIADOS  
AO CAFÉ (*Coffea arabica* L.) PRODUZIDO POR SISTEMA  
ORGÂNICO E CONVENCIONAL DA VARIEDADE IAPAR 59**

Monografia apresentada para a obtenção  
do Título de Bacharel em Ciências  
Biológicas, no curso de Ciências  
Biológicas, Setor de Ciências Biológicas,  
Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ida Chapaval  
Pimentel

Ida  
Fuje  
m<sup>s</sup> aparecida (P170606

**CURITIBA**

**2004**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me dar saúde e capacidade para chegar até onde cheguei.

Agradeço à minha família, por todo incentivo que me foi dado durante toda a minha formação, não só acadêmica, mas também como cidadão.

À minha orientadora Professora Ida Chapaval Pimentel, por seu apoio, paciência e orientação.

Ao Professor Dalton Reynaud pelo material biológico, meios de cultura e revisões bibliográficas.

Ao Professor Juarez Gabardo, pela ajuda nas análises estatísticas.

Aos amigos de dentro e fora da Faculdade, que de alguma forma me ajudaram a chegar ao fim dessa caminhada.

E a todos que colaboraram de alguma maneira para a realização desse trabalho.

“O cientista não estuda a natureza porque ela é útil; ele a estuda porque se delicia com ela, e se delicia com ela porque ela é bela. Se a natureza não fosse bela, não valeria a pena conhecê-la e, se não valesse a pena conhecer a natureza, não valeria a pena viver”.

Henri Poincaré

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES</b> .....	vii
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	viii
<b>RESUMO</b> .....	ix
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	01
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	03
2.1 CAFÉ ( <i>Coffea arabica</i> L.).....	03
2.2 SISTEMAS DE PRODUÇÃO DE CAFÉ.....	03
2.2.1 Sistema de Produção Convencional.....	03
2.2.2 Sistema de Produção Orgânico.....	04
2.3 FUNGOS.....	05
2.3.1 <i>Aspergillus</i> sp.....	06
2.3.2 <i>Penicillium</i> sp.....	07
2.3.3 <i>Rhizopus</i> sp.....	08
2.3.4 <i>Mucor</i> sp.....	08
2.3.5 <i>Nigrospora</i> sp.....	09
2.3.6 <i>Trichoderma</i> sp.....	10
2.3.7 <i>Curvularia</i> sp.....	10
2.3.8 <i>Fusarium</i> sp.....	11
2.3.9 <i>Colletotrichum</i> sp.....	12
2.4 MICOTOXINAS.....	13
<b>3. JUSTIFICATIVA</b> .....	15
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	16
<b>5. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	16
5.1 MEIOS DE CULTURA.....	16
5.1.1 Meio Batata Ágar Dextrose (BDA).....	16
5.1.2 Meio Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar (DRBC).....	16
5.1.3 Meio Czapeck.....	17
5.1.4 Meio para isolamento de <i>Fusarium</i> .....	17
5.2 SOLUÇÕES.....	18
5.2.1 Solução de “Tween 80” 0,1%.....	18

5.3 CORANTE E CLAREADOR.....	18
5.3.1 Lactofenol Azul de Algodão (CRUZ, 1981).....	18
5.3.2 Lactofenol de Amann (CRUZ, 1981).....	18
5.4 MATERIAL BIOLÓGICO.....	19
5.5 ISOLAMENTO DOS FUNGOS.....	19
5.6 PURIFICAÇÃO DOS ISOLADOS.....	20
5.7 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS.....	20
5.7.1 Técnica do microcultivo (KERN & BLEVINS, 1999).....	22
5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	22
<b>6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>23</b>
6.1 ISOLAMENTO DOS FUNGOS ASSOCIADOS ÀS SEMENTES DE CAFÉ ORGÂNICO E CONVENCIONAL DA VARIEDADE IAPAR 59.....	23
6.2 DETERMINAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DE CADA GÊNERO ISOLADO DAS SEMENTES DE CAFÉ ORGÂNICO E CONVENCIONAL DA VARIEDADE IAPAR 59.....	25
6.3 DIFERENÇAS ENTRE OS SISTEMAS DE PRODUÇÃO DE CAFÉ ORGÂNICO E CONVENCIONAL DA VARIEDADE IAPAR 59.....	27
6.4 DETERMINAÇÃO DA EFICÁCIA DOS MEIOS DE CULTURA PARA O ISOLAMENTO DE FUNGOS DE SEMENTES DE CAFÉ ORGÂNICO E CONVENCIONAL DA VARIEDADE IAPAR 59.....	29
6.5 DIFERENÇAS ENTRE OS MEIOS DE CULTURA PARA O ISOLAMENTO DE FUNGOS DE SEMENTES DE CAFÉ ORGÂNICO E CONVENCIONAL DA VARIEDADE IAPAR 59.....	31
<b>7. CONCLUSÕES.....</b>	<b>32</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>33</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>40</b>

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 01 – ESQUEMA DO ISOLAMENTO DOS FUNGOS DAS SEMENTES DE CAFÉ ORGÂNICO E CONVENCIONAL.....	20
FIGURA 02 - ESQUEMA DO ISOLAMENTO DOS FUNGOS DAS SEMENTES DE CAFÉ ORGÂNICO E CONVENCIONAL NOS DIFERENTES MEIOS DE CULTURA.....	21
GRÁFICO 01 – NÚMERO TOTAL DE FUNGOS DO GÊNERO <i>ASPERGILLUS</i> ENCONTRADOS EM SEMENTES PROVENIENTES DE CULTIVO ORGÂNICO E CONVENCIONAL DA VARIEDADE IAPAR 59.....	26
GRÁFICO 02 - DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA DE FUNGOS DE SEMENTES PROVENIENTES DE CULTIVO ORGÂNICO E CONVENCIONAL QUE APRESENTARAM DIFERENÇA SIGNIFICATIVA.....	27

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – FUNGOS ISOLADOS DAS SEMENTES DE CAFÉ ORGÂNICO E CONVENCIONAL DA VARIEDADE IAPAR 59.....	23
TABELA 2 – FUNGOS ISOLADOS DAS SEMENTES DE CAFÉ ORGÂNICO E CONVENCIONAL DA VARIEDADE IAPAR 59 NOS DIFERENTES MEIOS DE CULTURA.....	24
TABELA 3 - NÚMERO TOTAL DE COLÔNIAS OBSERVADAS E FREQUÊNCIA RELATIVA EM PORCENTAGEM DO APARECIMENTO DE FUNGOS EM RELAÇÃO AO NÚMERO TOTAL DE SEMENTES DE CAFÉS PROVENIENTES DOS SISTEMAS ORGÂNICO E CONVENCIONAL.....	26
TABELA 4 – MÉDIA DA OCORRÊNCIA DOS FUNGOS ISOLADOS NOS DIFERENTES MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS PARA O ISOLAMENTO DE FUNGOS DE SEMENTES DE CAFÉ ORGÂNICO E CONVENCIONAL DA VARIEDADE IAPAR 59.....	30

## RESUMO

O trabalho foi realizado com o objetivo de isolar e identificar os fungos presentes em sementes de café orgânico e convencional da variedade IAPAR 59 de duas lavouras de Londrina, Paraná, Brasil, e também testar a eficácia de 4 meios de cultura (DRBC, BDA, Czapeck e meio para isolamento de *Fusarium*) para o isolamento de diferentes gêneros de fungos. Analisou-se 1600 sementes, subdivididas em 10 sementes por placa contendo meio Ágar Batata e Dextrose (BDA) + Tetraciclina (100µg/litro) para a caracterização dos fungos encontrados em sementes de produção orgânica e convencional e 640 sementes subdivididas em 8 sementes por placa, sendo utilizadas 20 placas para cada meio de cultura para o teste da eficácia de cada meio. A identificação dos fungos foi realizada através da técnica do microcultivo. Foi isolado um total de sete gêneros de fungos: *Aspergillus*, *Curvularia*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Nigrospora*, *Trichoderma*, *Colletotrichum*, *Penicillium*, *Fusarium* e outros fungos dematiáceos. Observou-se a predominância do gênero *Aspergillus* com um total de duas espécies identificadas e cinco morfotipos, com uma maior frequência em sementes orgânicas para *A. carbonarius*, um fungo com potencial micotoxigênico. A incidência dos fungos mostrou uma grande variação quanto a origem das sementes; em sementes de cultivo convencional foi observado uma maior incidência de isolados em relação ao cultivo orgânico para os gêneros *Mucor*, *Rhizopus*, *Nigrospora*, *Colletotrichum* e fungos dematiáceos. O presente trabalho comprovou que há diferença na diversidade de fungos nos dois sistemas de produção, com predominância do gênero *Aspergillus* nos dois tipos de café, com uma maior ocorrência nas sementes orgânicas. Também observou-se diferença significativa entre os meios de cultura para o isolamento de *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus flavus*, *Nigrospora*, *Trichoderma* e *Fusarium* sp<sub>2</sub>, sendo que os demais isolados se comportaram de maneira igual, não fazendo distinção entre os meios.

Palavras-chave: Café Orgânico, Café Convencional, fungos, Meios de Cultura



## 1. INTRODUÇÃO

O café é uma das bebidas mais populares do mundo, sendo um dos mais importantes produtos do agronegócio brasileiro, com um volume de exportação que resultou em cerca de 778,2 milhões de dólares em 2003 (ALICE, 2004). Só no Paraná a safra 2003 produziu 121 mil toneladas (IBGE, 2004) e a previsão para a safra 2004/05 é de 2.500 mil sacas beneficiadas (CONAB, 2004).

O aumento no consumo, preço e dificuldades em se obter quantidades de café com qualidade, levam a uma valorização dos produtos com características específicas de aroma e sabor, independente do local de origem, ou especiais como “*cafés gourmet*”. No Brasil este novo enfoque tem sido trabalhado intensamente, buscando tornar a cafeicultura competitiva no mercado internacional, com caracterização dos cafés de cada região (TED, 1996).

Do ponto de vista agrônômico, fatores como origem genética, ambiente, manejo de colheita e pós-colheita, contribuem diretamente na qualidade da bebida. Outros agentes interferem na qualidade do café, dentre eles os fungos são o objeto de interesse para esse trabalho, principalmente fungos potencialmente toxigênicos, os quais comprometem tanto a qualidade do café produzido quanto a saúde de quem consome.

Os trabalhos relacionados com a microbiota presente nos grãos com alterações na composição química do café e, conseqüentemente, produção de padrões inferiores de bebida, foram iniciados por KRUG (1940, 1945 e 1947) e BITANCOURT (1957). Pesquisas mais atuais como as de MEIRELLES (1990), ALVES (1998), confirmaram essa relação e justificam a qualidade inferior do café produzidos em algumas regiões do país pela ocorrência de condições ambientais favoráveis ao desenvolvimento de microrganismos e produção de metabólitos e micotoxinas nos frutos e grãos nas fases pré e pós colheita bem como no café preparado para consumo.

Essa demanda de uma bebida isenta de organismos que comprometam sua qualidade tem levado à novas técnicas de plantio e prevenção de doenças e pragas por meio do surgimento de novas variedades de café e do uso de agrotóxicos. O uso de tais defensivos, com o passar do tempo, causa a resistência de moléstias, sendo necessário o uso de produtos cada vez mais fortes e prejudiciais ao meio ambiente e à saúde.

A agricultura orgânica vem se mostrando uma alternativa eficaz para esse problema acarretado pelos agrotóxicos. Essa técnica, que se caracteriza por não utilizar defensivos

agrícolas, tem se tornado uma tendência mundial sendo valorizada como produto de exportação. Estudos da FAO revelam que até 2005 o mercado mundial de produtos orgânicos vai superar a cifra de 100 bilhões de dólares. A mesma fonte registra que mais de 100 países produzem “commodities” orgânicas certificadas, com expressiva participação dos países desenvolvidos (FAO, 2004).

Dentro desse contexto, foi realizado o isolamento e identificação de fungos de grãos provenientes de café orgânico e convencional.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 CAFÉ (*Coffea arabica* L.)

O café, *Coffea arabica* L., pertencente à família Rubiaceae, é tido como originário da Etiópia, onde ainda ocorre em estado nativo. Levado para a Arábia, entre os séculos XIII e XIV, seu cultivo dispersou-se por extensa área geográfica.

O cafeeiro foi introduzido no Brasil, trazido de Caiena, na Guiana Francesa, em 1727. Estabelecida a sua cultura, ocorrem as primeiras exportações a partir de 1731, que se tornaram expressivas a partir de 1802 (EMBRAPA, 2004), e atualmente é um dos mais importantes produtos do agronegócio brasileiro.

A fase de produção do café abrange desde o plantio da lavoura até a armazenagem do café verde. Nessa fase, a qualidade do café, relacionada às características dos grãos quanto à cor, aspecto, número de defeitos, aroma e sabor da bebida, depende de vários fatores, entre eles a composição química do grão, que é determinada por fatores genéticos, sistema de cultivo, época de colheita, preparo, armazenamento e torração dos grãos (AMORIN, 1978).

Com relação às doenças causadas por fungos, os cafés podem ter sua comercialização comprometida pela perda de qualidade sob três aspectos: aparência externa dos grãos de café, possibilidade de produção de micotoxinas, substâncias químicas altamente nocivas à saúde do homem, e produção de compostos prejudiciais ao sabor e aroma (PEREIRA *et al.*, 2001).

### 2.2 SISTEMAS DE PRODUÇÃO DE CAFÉ

#### 2.2.1 Sistema de Produção Convencional

O sistema de produção conduzido pela maior parte dos produtores agrícolas é conhecido como convencional, onde são utilizadas tecnologias disponíveis acrescentadas, ou não, de outras derivadas de experiências individuais geradas na região ou fora dela. Neste caso, cada produtor define como tais componentes irão se associar, sendo esta decisão dependente do treinamento, recursos financeiros e das condições “agroecológicas” da propriedade (VALBENEDITO-SANHUEZA, 2000).

O sistema convencional caracteriza-se principalmente pela utilização de substâncias agroquímicas para a manutenção dos cultivares, sendo tais substâncias geralmente nocivas à saúde e ao meio ambiente. Os fungicidas geralmente exercem efeito inibitório sobre a biomassa microbiana (ANDERSON *et al.*, 1981), enquanto os herbicidas tendem a exercer efeitos variáveis, geralmente com menor impacto ou intensidade, quando comparados com a variação espacial e temporal de biomassa microbiana.

Os impactos gerados pelo uso de agroquímicos causam efeitos locais sobre a microbiota das plantas. Não somente as populações podem ser afetadas pelos tratamentos culturais, mas também as interações entre os diversos microrganismos, como as ações antagonísticas, as infecções e a patogênese.

Deve-se salientar que a exposição a altas concentrações de substâncias agroquímicas pode promover alterações de natureza genética, fisiológica e comportamental nas espécies envolvidas, promovendo uma maior tolerância ou resistência ao produto, um enfraquecimento da atividade reprodutória, uma redução da atividade enzimática e redução ou inibição do crescimento (SCHNURER & ROSSWAL, 1987).

A aplicação dos agroquímicos por pulverização pode resultar na exposição significativa dos organismos não alvo, incluindo organismos selvagens, habitantes de áreas vizinhas aos campos tratados. Vários estudos demonstram que somente cerca de 50% dos pesticidas aplicados por via aérea atingem a área alvo (DAVIS & WILLIAMS, 1990).

### 2.2.2 Sistema de Produção Orgânico

O sistema de produção orgânico é definido como sendo um sistema sustentável em tempo e espaço, característico pela manutenção e proteção dos recursos naturais pela ausência do uso de substâncias químicas que, muitas vezes, são agressivas aos humanos e ao ambiente (BETTIOL *et al.*, 2002).

Tanto quanto possível, os sistemas agrícolas orgânicos dependem de rotações de culturas, restos de culturas, esterco animal, leguminosas, adubos verdes e resíduos orgânicos de fora das fazendas, bem como de cultivo mecânico, uso de minerais e

controle biológico de pragas, para manter a produtividade e a estrutura do solo, fornecer nutrientes para as plantas e controlar insetos, ervas invasoras e outros organismos daninhos (SIVAPALAN *et al.*, 2001).

A agricultura orgânica vem se tornando uma tendência mundial, sendo valorizada principalmente como produto de exportação. Segundo a Organização de Agricultura e Alimento das Nações Unidas, o mercado mundial de produtos orgânicos superou os 10 bilhões de dólares (SCIALABBA & HATTAM, 2002). A mesma fonte registra que mais de 100 países produzem “commodities” orgânicas certificadas, com expressiva participação dos países desenvolvidos. Só no Paraná, o volume de produção de produtos orgânicos chegou a 30.500 toneladas (EMATER, 2004).

### 2.3 FUNGOS

Os fungos são microrganismos eucarióticos quimiorganotróficos. Sua reprodução geralmente se dá através de esporos, com algumas exceções. Os fungos não têm clorofila, e em geral são formados por filamentos que apresentam paredes constituídas por quitina ou celulose (PELCZAR *et al.*, 1996).

O talo de um fungo é tipicamente composto por filamentos microscópicos, chamados hifas. O conjunto de hifas recebe a denominação de micélio (PELCZAR *et al.*, 1996).

As hifas que estão subdivididas em células individuais por paredes transversais ou septos são denominadas septadas; as que não possuem parede são denominadas não septadas. (KONEMAN & ROBERTS, 2001).

A porção do micélio que penetra no substrato e é responsável pela absorção de água e nutrientes é o micélio vegetativo; a porção projetada acima do substrato é o micélio aéreo, também denominado de micélio reprodutivo, pois a partir dessa porção são originados os corpos de frutificação portadores dos conídios (KONEMAN & ROBERTS, 2001).

Alimentos armazenados são um campo excelente para a proliferação de fungos (BATISTA, 2000), principalmente em países onde os princípios básicos de secagem adequada e armazenamento correto, ainda são desconhecidos ou desprezados.

Desenvolvendo-se sobre sementes podem causar perda do poder germinativo; podem afetar a qualidade por descoloração ou produzir aromas desagradáveis.

Os fungos têm notável capacidade de adaptação e crescimento sob condições extremamente variáveis como a umidade, temperatura, pH, taxa de oxigenação, período de armazenamento, condições físicas dos grãos e infecções por insetos entre outros (LAZZARI, 1997).

A temperatura é um dos fatores abióticos mais importantes para o desenvolvimento do ciclo biológico dos fungos (IGNOFFO *et al.*, 1976; SOSA GOMEZ, 1990). Muitos estudos têm demonstrado que os conídios podem germinar sob uma ampla faixa de temperatura (COLE & HOCH, 1991). Segundo FERRON (1978), a temperatura afeta o crescimento do micélio, enquanto outros autores relatam que a germinação dos conídios também é afetada (YENDOL, 1968; ALVES & NOGUEIRA, 1984).

Os fungos filamentosos são distribuídos em 4 classes: Zigomicetos, Ascomicetos, Basidiomicetos e Deuteromicetos (TRABULSI, 2002). Dentre os Zigomicetos dois gêneros são de importância para o café: *Mucor* e *Rhizopus*, nos Deuteromicetos, os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* e nos Ascomicetos o gênero *Fusarium*.

### 2.3.1 *Aspergillus* sp

O gênero *Aspergillus* constitui um grupo de fungos filamentosos hialinos de crescimento rápido que usualmente produzem infecções oportunistas em humanos. Das quase 700 espécies de *Aspergillus* descritas por Rapper e Fennel apenas 19 foram descritas como causadoras de infecções em humanos (KONEMAN & ROBERTS, 2001).

Os conídios são amplamente distribuídos no solo, vegetais em decomposição e em uma variedade de matérias orgânicas (KONEMAN & ROBERTS, 2001).

Dentre as características macroscópicas para a identificação das espécies de *Aspergillus* estão a taxa de crescimento, cor da colônia e termotolerância (COLLIER *et al.*, 1998; LARONE, 1995; ST-GERMAIN & SUMMERBELL, 1996). A textura das colônias vai de penugenta e pulverulenta. A coloração da superfície da colônia depende muito de espécie para espécie e o reverso pode variar de amarelo pálido até sem coloração na maioria das espécies.

Microscopicamente, produzem micélios septados e ramificados, com porções vegetativas submersas no nutriente (PELCZAR *et al.*, 1996). Os conidióforos são relativamente longos e terminam em vesículas, que são a formação típica do gênero *Aspergillus*. As vesículas são recobertas por uma fileira de fiálides, as quais podem estar conectadas diretamente ou estarem conectadas por uma célula suporte, a métula. Das fiálides partem longas cadeias de conídios esféricos ou ligeiramente ovais que tendem a curvar-se em direção ao eixo central (KONEMAN & ROBERTS, 2001). Esses conídios podem apresentar várias cores que são características da espécie; as cores mais comuns são o negro, o marrom e o verde (PELCZAR *et al.*, 1996).

As micotoxicoses causadas por *Aspergillus* sp. são as aflavotoxinas, ocratoxinas e esterigmatocistina.

### 2.3.2 *Penicillium* sp

Os membros desse grupo ocorrem amplamente na natureza. Algumas espécies causam apodrecimento ou deterioração de frutas, vegetais, conservas, grãos e pastos (PELCZAR *et al.*, 1996). A identificação no nível de espécie é baseada na morfologia da colônia e em características microscópicas (DE HOOG *et al.*, 2000).

As colônias de *Penicillium* têm crescimento rápido; sua textura pode ser filamentosa, cotonosa ou aveludada. As colônias são inicialmente brancas, e com o tempo se tornam verde azulado, verde acinzentado, cinza oliva, amarela ou rosa. O reverso freqüentemente vai de pálido a amarelado (DE HOOG *et al.*, 2000; SUTTON *et al.*, 1998; LARONE, 1995; ST-GERMAIN & SUMMERBELL, 1996).

Microscopicamente, fungos do gênero *Penicillium* apresentam hifas septadas, conidióforos simples ou ramificados, métulas, fiálides e conídios. Métulas são ramos secundários, os quais carregam as fiálides. A organização das fiálides na ponta dos conidióforos é típica do gênero, formando agrupamentos em escova, também chamados de “penicilli”. Os conídios são arredondados, unicelulares e partem do topo das fiálides como cadeias sem ramificação (LARONE, 1995; ST-GERMAIN & SUMMERBELL, 1996).

Representantes desse grupo são conhecidos por produzirem micotoxinas (PITT *et al.*, 2000); as micotoxicoses são: rubratoxina, patulina, citrina e citreoviridina.

### 2.3.3 *Rhizopus* sp

É um fungo encontrado no solo, esterco e matéria vegetal. Por ser um contaminante comum, pode causar infecções em humanos. Algumas espécies também são contaminantes de plantas (LARONE, 1995; SUTTON *et al.*, 1998; DE HOOG *et al.*, 2000; ST-GERMAIN & SUMMERBELL, 1996).

A diferenciação das diversas espécies de *Rhizopus* se dá pela observação do comprimento dos rizóides e esporangióforos, o diâmetro do esporângio, a forma da columela e o tamanho, formato dos esporangiósporos. A temperatura para o desenvolvimento das colônias também varia de uma espécie para outra (LARONE, 1995).

As colônias de *Rhizopus* crescem muito rapidamente, preenchendo totalmente a placa de Petri. A textura é tipicamente chamada de “algodão doce”. A coloração da colônia primeiramente é branca, se tornando de cinza a amarela escura com o tempo. O reverso da colônia é branco pálido.

Microscopicamente, as características distintivas são a presença de hifas largas não septadas (ocasionalmente podem ser observados septos em cultivos velhos), com produção de esporangiósporos no interior de esporângios. Os esporângios são originados na extremidade de esporangióforos que normalmente são únicos nas espécies de *Rhizopus*, terminando em uma estrutura chamada columela. Nas espécies de *Rhizopus*, as columelas normalmente colapsam quando maduras, adquirindo a forma de guarda-chuva curvado (KONEMAN & ROBERTS, 2001).

### 2.3.4 *Mucor* sp

É um fungo encontrado no solo e plantas, considerado um contaminante comum, causando assim infecções em vários animais, inclusive no homem (LARONE, 1995; SUTTON *et al.*, 1998; DE HOOG *et al.*, 2000; ST-GERMAIN & SUMMERBELL, 1996).

As colônias de *Mucor* crescem depressa de 25°C a 30°C, cobrindo rapidamente a superfície do ágar. Sua textura macia lembra algodão doce. A superfície superior é



inicialmente branca, tornando-se cinza escura com o tempo; o reverso tem coloração branca.

Uma visão microscópica revela hifas não septadas ou esparsamente septadas. Os esporangiósporos são curtos, eretos e se afinam no ápice, podendo formar ramos simpodiais curtos. A columela pode ser hialina ou dematiácea, sendo de difícil visualização se o esporângio não estiver rompido. Os esporângios são arredondados, tendo 50-300  $\mu\text{m}$  de diâmetro, tendo uma coloração que varia de cinza a negra. Em seu interior estão os esporangiósporos, arredondados ou levemente alongados, com diâmetro que varia de 4-8  $\mu\text{m}$ . Os zigósporos, se presentes, surgem do micélio (LARONE, 1995; SUTTON *et al.*, 1998; DE HOOG *et al.*, 2000).

A ramificação dos esporangióforos, a forma dos esporangiósporos, a temperatura máxima de crescimento, a presença de clamidósporos e análises moleculares auxiliam na identificação das espécies de *Mucor* (VOIGT *et al.*, 1999).

### 2.3.5 *Nigrospora* sp

*Nigrospora* é um fungo dematiáceo filamentosos, largamente distribuído no solo, plantas e sementes, sendo um contaminante comum. Embora tenha sido isolado de algumas amostras clínicas, sua patogenicidade ainda é incerta (LARONE, 1995; SUTTON *et al.*, 1998; DE HOOG *et al.*, 2000; ST-GERMAIN & SUMMERBELL, 1996).

*Nigrospora* cresce rapidamente, formando colônias com aspecto lanoso (como lã desfiada), que recobrem totalmente uma placa de BDA a 25°C, de 3 a 4 dias. Sua coloração é inicialmente branca, tornando-se cinza com áreas negras com o tempo. O reverso é negro. A esporulação pode levar mais de 3 semanas para algumas espécies (LARONE, 1995; SUTTON *et al.*, 1998; DE HOOG *et al.*, 2000; ST-GERMAIN & SUMMERBELL, 1996).

Microscopicamente, apresenta hifas septadas e hialinas, os conidióforos também são hialinos, ou levemente pigmentados. As células conidiogênicas nos conidióforos são infladas e com formato de ampola. Elas carregam um único conídio de 14-20  $\mu\text{m}$  de diâmetro em seu ápice. Os conídios são negros, unicelulares, levemente achatados

horizontalmente e com uma tênue fenda equatorial (LARONE, 1995; SUTTON *et al.*, 1998; DE HOOG *et al.*, 2000; ST-GERMAIN & SUMMERBELL, 1996).

### 2.3.6 *Trichoderma* sp

*Trichoderma* é um fungo filamentosos que está largamente distribuído no solo, material vegetal e madeira.

As colônias crescem rapidamente, e têm maturação em 5 dias. Repicadas em BDA e sob uma temperatura em torno de 25°C, as culturas apresentam uma textura macia, lembrando algodão, tornando-se compactas com o tempo. A sua coloração é inicialmente branca, e com o tempo, ao se formarem os conídios, áreas distintas verde azuladas ou verde amareladas tornam-se visíveis. Essas áreas podem formar anéis concêntricos, que são mais visíveis em BDA quando comparados com Sabouraud. O reverso é pálido, marrom amarelado ou amarelo (LARONE, 1995; SUTTON *et al.*, 1998; DE HOOG *et al.*, 2000; ST-GERMAIN & SUMMERBELL, 1996).

*Trichoderma* apresenta hifas hialinas e septadas, sendo fiálides, conidióforos e conídios também são observados. Os conidióforos são hialinos e ramificados, podendo ocasionalmente apresentar um arranjo piramidal. As fiálides também são hialinas, com formato de garrafa e com inchaço na base, podendo ser solitárias ou se apresentarem em grupos. Os conídios têm 3 µm de diâmetro, são unicelulares e com formato arredondado ou elipsóide, apresentando coloração esverdeada (LARONE, 1995; SUTTON *et al.*, 1998; DE HOOG *et al.*, 2000; ST-GERMAIN & SUMMERBELL, 1996).

### 2.3.7 *Curvularia* sp

*Curvularia* é um fungo filamentosos dematiáceo. A maioria das espécies de *Curvularia* são patógenas facultativas do solo, plantas e cereais, podendo causar infecções em humanos ou animais (LARONE, 1995; ST-GERMAIN & SUMMERBELL, 1996; KNUDTSON & KIRKBRIDE, 1992; PITT *et al.*, 1994).

Com um crescimento rápido, produz colônias lanosas em BDA a 25°C. Inicialmente o gênero apresenta uma coloração que varia de branca a cinza rosado,

tornando-se marrom oliva ou preta com o tempo. O reverso varia de marrom escuro a preto (LARONE, 1995; ST-GERMAIN & SUMMERBELL, 1996; SUTTON *et al.*, 1998; DE HOOG *et al.*, 2000).

*Curvularia* apresenta hifas escuras e septadas. Os conidióforos são simples ou ramificados, sendo curvados no ponto onde os conídios se originam. Esse padrão de curvatura se chama crescimento simpodial geniculado. Os conídios (8-14 x 21-35 µm), podem ser retos ou piriformes, são marrons e multiseptados. Os septos são transversais, dividindo os conídios em várias células, sendo a célula central mais escura e alargada que as demais células. Esse alargamento da célula central dá uma aparência curvada ao conídio (LARONE, 1995; ST-GERMAIN & SUMMERBELL, 1996; SUTTON *et al.*, 1998; DE HOOG *et al.*, 2000).

#### 2.3.8 *Fusarium* sp

*Fusarium* é um fungo filamentosamente largamente distribuído nas plantas e no solo. Ele é geralmente encontrado na micoflora de commodities como arroz, feijão, soja, café, etc (PITT *et al.*, 1994).

Fungos do gênero *Fusarium* produzem micotoxinas; a ingestão de grãos contaminados com essas micotoxinas pode desencadear reações alérgicas, ou ser carcinogênicas devido ao consumo prolongado. Fumonisinás e zearalenonas são micotoxinas produzidas por alguns gêneros de *Fusarium* (PITT, 2000; SCHAAFSMA *et al.*, 1998).

*Fusarium* cresce rapidamente em meio Sabouraud a 25°C e produz colônias lanosas a algodonosas e lisas. Na parte superior, a coloração da colônia pode ser branca, creme, marrom-amarelada, salmão, amarela, vermelha, violeta ou púrpura. O reverso pode ser sem cor, marrom-amarelada, vermelho, púrpura, ou marrom.

Apresenta hifas hialinas e septadas. Conidióforos, fiálides, macroconídios e microconídios são observados microscopicamente; sendo que algumas espécies podem produzir clamidósporos (LARONE, 1995; SUTTON *et al.*, 1998; DE HOOG *et al.*, 2000). As fiálides são cilíndricas, podendo ser solitárias ou fazer parte de um complexo sistema de ramificação. Macroconídios (3-8 x 11-70 µm) partem das fiálides, de conidióforos ramificados ou não. Eles têm 2 ou mais células, tem a parede fina e lisa,

são cilíndricos ou em forma de canoa. Já os microconídios (2-4 x 4-8 µm) são formados em conidióforos simples, apresentam uma única célula (ocasionalmente podem apresentar 2 ou 3 células), são lisos, hialinos, ovóides ou cilíndricos e arranjados em bolas (LARONE, 1995; SUTTON *et al.*, 1998; DE HOOG *et al.*, 2000).

### 2.3.9 *Colletotrichum* sp

*Colletotrichum* é um fungo filamentosamente largamente distribuído em vegetais e no solo. Ele infecta folhas e frutos, particularmente em clima quente e úmido, podendo também infectar raízes, causando várias lesões. Massas de esporos rosa-alaranjadas a marrons podem ser visualizadas em lesões mais velhas.

Esse gênero produz esporos dentro de uma estrutura chamada acérvulo. Conidióforos simples, curtos e hialinos produzem conídios em abundância, podendo ainda haver produção ou não de longos septos entre os conidióforos (BARNETT & HUNTER 1987).

Os conídios são hialinos quando vistos isolados, mas podem aparentar coloração rosa ou salmão quando vistos em massa. Os esporos são unicelulares e curtos, com formato variando de ovóide a cilíndrico. E, algumas espécies os conídios podem ser levemente curvados, podendo ser confundidos com esporos de *Fusarium* (BARNETT & HUNTER 1987).

## 2.4 MICOTOXINAS

Micotoxinas são metabólitos secundários tóxicos de algumas espécies de fungos, capazes de produzir efeitos tóxicos em animais e no homem, dependendo dos níveis de consumo (BULLERMAN, 1979). O termo é derivado da palavra grega "Mykes" que significa fungo e "Toxicum" que significa veneno ou toxina (BULLERMAN, 1979).

A ingestão de micotoxinas pode levar animais e o homem a quadros de intoxicação aguda ou crônica. A condição patológica resultante desta ingestão é chamada micotoxicose (SHARMA & SALUMKHE, 1991). A formação do metabólito secundário está sujeito ao controle fisiológico geral que responde a fatores ambientais. Há muitas evidências que o metabolismo secundário tem menor prioridade que o crescimento na hierarquia da regulação. Quando um meio de cultura é rico, com nutrientes balanceados, microorganismos tipo selvagem não realizam o metabolismo secundário ou seu potencial é reduzido (VINING, 1990).

A produção de micotoxinas está ligada ao crescimento do fungo; sem o crescimento geralmente a produção não ocorre. Entretanto, a presença do fungo produtor não indica a presença da micotoxina, especialmente se o crescimento não ocorrer. Portanto, o entendimento dos fatores que permitem o crescimento do fungo e a produção de micotoxinas é de grande importância para o desenvolvimento de métodos de controle (BULLERMAN *et al.*, 1984).

A contaminação de alimentos por micotoxinas pode ocorrer no campo, na colheita, no transporte, no armazenamento e/ou na manufatura dos produtos (SMITH & HENDERSON, 1991). Alguns fatores que influenciam a produção de micotoxinas, principalmente por espécies de *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* são: composição do substrato, temperatura, teor de água, umidade relativa do ar, atividade de água, pH, atmosfera, competição microbiana, danos causados por insetos, linhagem do fungo contaminante e estresse da planta (BULLERMAN *et al.*, 1984; COULOMBE, 1991; FRISVAD & SAMSON, 1992; SCUSSEL, 1998; WATSON, 1987), sendo que a temperatura, a umidade e o tipo de substrato são os mais importantes (MALLOZZI & CORRÊA, 1998).

Todo microrganismo, incluindo os fungos toxigênicos, possuem uma atividade de água e temperatura máxima, ótima e mínima para o crescimento, sendo estes valores normalmente diferentes para produção de toxina (BULLERMAN *et al.*, 1984). Por

exemplo, *Aspergillus flavus* requer uma atividade de água mínima entre 0,78 e 0,80 para o crescimento e 0,83 a 0,87 para produção de toxina (BULLERMAN *et al.*, 1984; MALLOZZI & CORRÊA, 1998), podendo crescer em faixa de temperatura entre 6°C a 45°C, mas com ótimo de 30 °C para produção de aflatoxina (HUSSEIN & BRASEL, 2001). Portanto, o simples isolamento e confirmação de fungos micotoxigênicos em alimentos não indicam a presença de micotoxinas (HUSSEIN & BRASEL, 2001), pois tanto o crescimento do fungo como a produção de micotoxinas são dependentes de vários fatores, sendo os limites para a produção normalmente mais estreitos que para o crescimento (FRISVAD & SANSON, 1992).

O homem e animais podem entrar em contato com micotoxinas diretamente através da ingestão de alimento contaminado, ou indiretamente através do consumo de produtos de origem animal, como por exemplo, leite, ovos e carnes (OGA, 1996). A relação entre micotoxinas e a saúde humana é difícil de ser determinada, pois não há evidências diretas do envolvimento, tais como experimentos controlados; há somente dados epidemiológicos e estudos em animais de experimentação (BULLERMAN, 1979).

Vários commodities podem ser contaminados por diferentes fungos produtores de micotoxinas e causar uma série de problemas para a saúde do homem e animais (GONÇALEZ *et al.*, 2001).

Não há dúvida sobre o perigo potencial da presença de micotoxinas em alimentos, entretanto, pela dificuldade de sua total eliminação da dieta, como primeiro passo é feita uma avaliação de risco e estimada uma média de consumo diário (MOSS, 1996).

### 3. JUSTIFICATIVA

A produção nacional de café corresponde a grande parte das exportações brasileiras. O mercado de café convencional vem enfrentando dificuldades como uma maior utilização de agrotóxicos para o controle de pragas, sendo que o uso excessivo de tais defensivos agrícolas, com o passar do tempo, causa a resistência de moléstias, sendo necessário o uso de produtos cada vez mais fortes e prejudiciais ao meio ambiente e à saúde.

Por outro lado, a agricultura orgânica que se caracteriza por não utilizar defensivos agrícolas tem se tornado uma tendência mundial, sendo valorizada como produto de exportação.

Porém, os cafés produzidos por esses dois sistemas de produção (convencional e orgânico) são acometidos por fungos que prejudicam em muito a qualidade da bebida, liberando metabólitos que muitas vezes podem ser prejudiciais à saúde do homem (micotoxinas), proporcionando uma bebida de “gosto ríto ou riada”,

Sendo assim, esse trabalho visou o isolamento, identificação e a frequência de ocorrência de fungos de café orgânico e convencional, com ênfase nos fungos com potencial micotoxigênico, o qual afeta diretamente na qualidade do produto. Foi realizada uma correlação da população fúngica encontrada nos dois tipos de café orgânico e convencional, para se determinar se há diferença entre os resultados encontrados. Por fim, foram utilizados diferentes meios de cultura, para se verificar qual meio é mais eficaz para o isolamento de determinado tipo de fungo.

Dentro deste contexto o isolamento de tais fungos contribuirá para o conhecimento da biodiversidade em populações de café produzidos pelos sistemas de cultivo convencional e orgânico, além de possibilitar a exploração destes agentes que alteram a qualidade da bebida.

#### 4. OBJETIVOS

- Isolar e identificar fungos associados ao café produzido por sistema de produção orgânica e convencional, com ênfase nos fungos com potencial micotoxigênico;
- Comparar a frequência dos fungos encontrados em cada sistema de produção;
- Testar a eficácia de diferentes meios de cultura para o isolamento de fungos associados ao café produzido por sistema de produção orgânico e convencional.

#### 5. MATERIAIS E MÉTODOS

##### 5.1 MEIOS DE CULTURA

###### 5.1.1 Meio Batata Dextrose Ágar (BDA)

BDA.....	39g
Água destilada.....	1L

O meio foi preparado conforme indicação do fabricante, sendo então esterilizado em autoclave a 121°C por 20 minutos.

###### 5.1.2 Meio Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar (DRBC)

Glicose.....	10,0g
Peptona Bacteriológica.....	5,0g
Fosfato de Potássio, monobásico.....	1,0g
Sulfato de Magnésio, heptahidratado.....	0,5g
Rosa Bengala (solução 5%, p/v).....	0,5mL
Dicloran (2,6-dicloro-4-nitroanilina) (solução 0,2%, p/v, em etanol).....	1,0mL
Cloranfenicol.....	0,1g
Água destilada.....	1000mL
Ágar.....	15g

PH final – 5,6



Os ingredientes foram misturados, o meio foi aquecido até dissolução do ágar, completando o volume para 1000mL e esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos.

#### 5.1.3 Meio Czapeck

Glicose.....	30g/L
NaNO <sub>3</sub> .....	2g/L
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	1g/L
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O.....	0,5 g/L
KCl.....	0,5 g/L
FeSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O.....	0,01 g/L
Extrato de levedura.....	1g/L
Agar.....	20 g/L

Os ingredientes foram misturados e distribuídos em frascos e então esterilizados em autoclave a 121°C por 20 minutos.

#### 5.1.4 Meio para isolamento de *Fusarium*

Glicose.....	0,2g
Amido em Pó.....	0,5g
Sacarose.....	0,2g
KNO <sub>3</sub> .....	1,0g
KCl.....	0,5g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	1,0g
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O.....	0,05g
Água destilada.....	1000mL
Ágar.....	15g

Os ingredientes foram misturados e distribuídos em frascos e então esterilizados em autoclave a 121°C por 20 minutos.

## 5.2 SOLUÇÕES

### 5.2.1 Solução de “Tween 80” 0,1%

“Tween 80”.....	0,1 ml
Água destilada.....	99,9 ml

Mistura-se os componentes e autoclava-se por 30 minutos a 1 atm.

## 5.3 CORANTE E CLAREADOR

### 5.3.1 Lactofenol Azul de Algodão (CRUZ, 1981)

Ácido lático.....	20,0g
Cristais de fenol.....	20,0g
Glicerina.....	20,0g
Azul de algodão (Methyl blue Difco).....	0,05g
Água destilada.....	20,0mL

Os cristais de fenol são fundidos em banho-maria, sendo os compostos adicionados em seguida. Espera-se 24 horas e filtra-se a solução.

### 5.3.2 Lactofenol de Amann (CRUZ, 1981)

Ácido lático.....	10,0g
Ácido fênico.....	10,0g
Glicerina.....	20,0g
Água destilada.....	10,0mL

## 5.4 MATERIAL BIOLÓGICO

Os fungos foram isolados de amostras compostas de sementes armazenadas de café, despulpadas e secas, da variedade IAPAR 59, provenientes de duas lavouras da região de Londrina, Paraná. As amostras foram da safra de 2002/2003 e constaram de 1120 sementes para cada sistema de produção.

## 5.5 ISOLAMENTO DOS FUNGOS

As sementes foram acondicionadas em saco plástico, e foram mantidas sob refrigeração até o momento do uso.

A determinação da população fúngica foi realizada pela contagem dos fungos que contaminaram as sementes. O método consistiu em se colocar as sementes em placas de Petri contendo meio BDA, meio Czapeck, meio DRBC Ágar e meio para o isolamento do gênero *Fusarium*. Foi adicionado o antibiótico tetraciclina (100µg/ml) aos meios para impedir o crescimento de bactérias.

Para uma primeira avaliação das sementes foram utilizadas 160 placas de Petri contendo meio BDA com 10 sementes em cada placa, sendo 80 placas com sementes provenientes de sistema de cultivo orgânico e 80 placas com sementes provenientes de sistema de cultivo convencional (FIGURA 01).

Em seguida, para efeito de comparação e determinação do meio mais adequado para isolamento dos fungos, foram utilizadas mais 80 placas de Petri: 20 placas contendo meio de cultura DRBC Ágar, 20 placas contendo meio de cultura BDA, 20 placas contendo meio de cultura Czapeck e 20 placas contendo meio de cultura para o isolamento do gênero *Fusarium*. Das 80 placas, 40 foram destinadas a sementes provenientes de sistema de produção convencional e 40 foram destinadas a sementes de sistema de produção orgânico, sendo colocadas 8 sementes por placa (FIGURA 02).

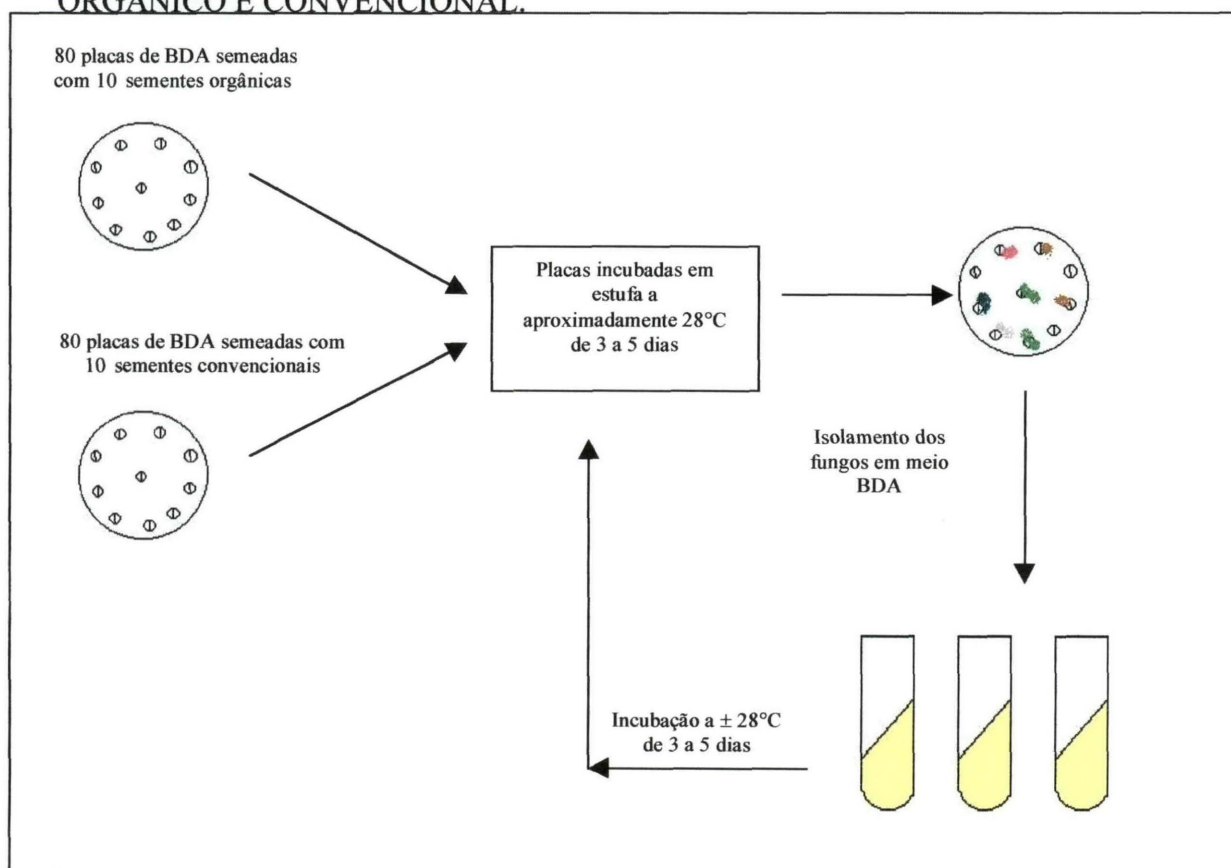
As placas contendo as sementes foram colocadas em estufa, a uma temperatura em torno de 28° C de 3 a 5 dias, para o desenvolvimento das colônias fúngicas.

O isolamento dos fungos foi realizado repicando-se as colônias em tubos de ensaio. Em seguida os tubos foram incubados em estufa com temperatura em torno de 28°C num período de 3 a 5 dias, sendo então mantidos em geladeira a 4°C para a futura identificação.

## 5.6 PURIFICAÇÃO DOS ISOLADOS

Os isolados foram purificados em solução de “Tween 80” 0,1%. Uma porção do micélio do fungo foi colocado em um tubo de ensaio contendo 2,0 ml de “Tween 80” 0,1% esterilizado. Em seguida o tubo foi agitado por 3 minutos em agitador de tubos, semeando-se então 100µl da solução em placa de Petri contendo meio de cultura BDA. As placas foram incubadas a 28°C em estufa incubadora por aproximadamente 3 dias.

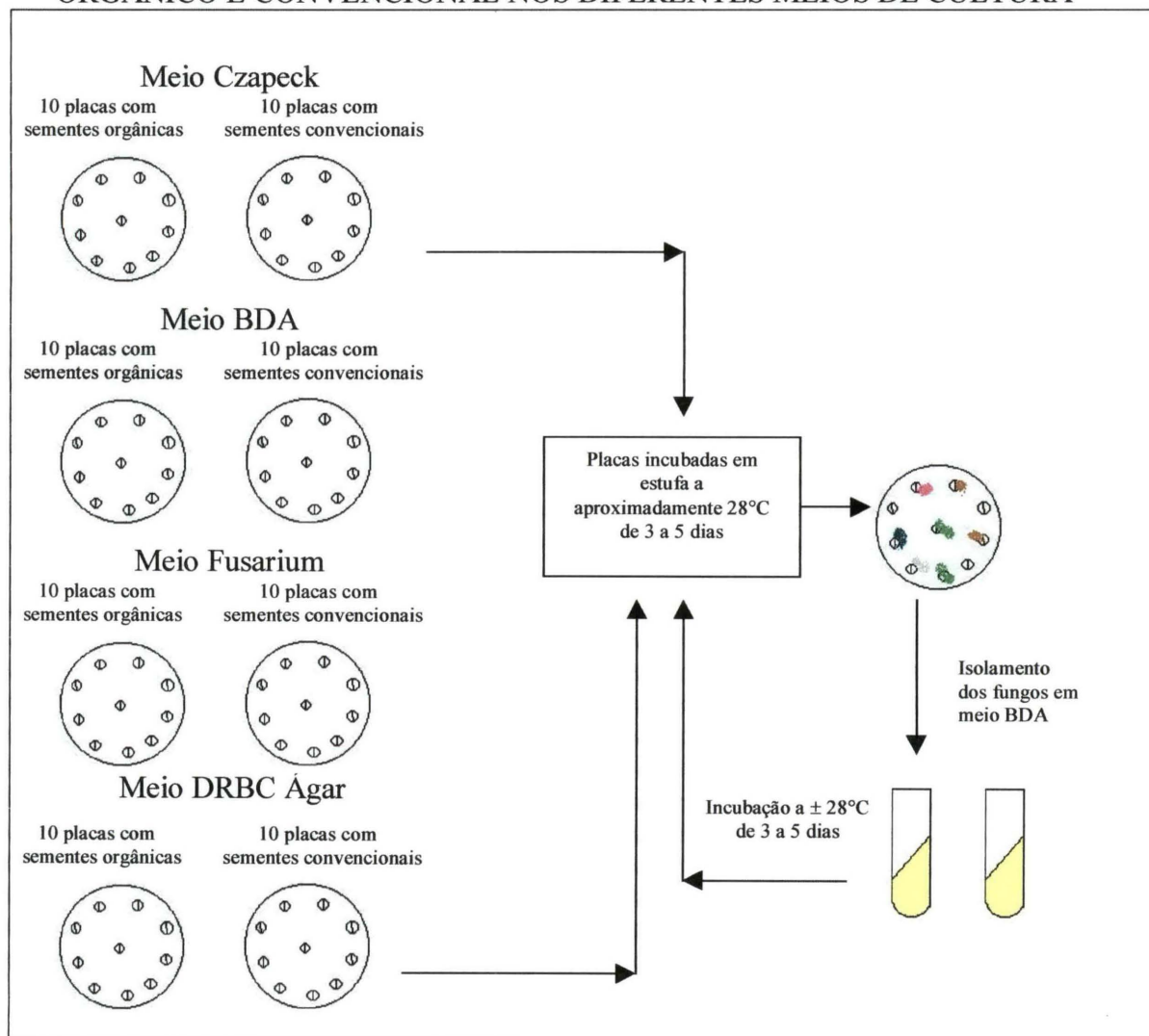
FIGURA 1 – ISOLAMENTO DOS FUNGOS DAS SEMENTES DE CAFÉ ORGÂNICO E CONVENCIONAL.



## 5.7 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS

A identificação dos isolados foi realizada por meio da observação das estruturas reprodutivas (sexual e assexual) dos mesmos, utilizando o método de cultura em lâmina ou técnica do microcultivo (KERN & BLEVINS, 1999) e de acordo com literatura especializada (ELLIS, 1971, 1976; BARNETT & HUNTER 1987; PETRINI, 1986; KONEMAN & ROBERTS, 2001; LARONE, 1987; ALVES, 1998).

FIGURA 2 – ISOLAMENTO DOS FUNGOS DAS SEMENTES DE CAFÉ ORGÂNICO E CONVENCIONAL NOS DIFERENTES MEIOS DE CULTURA



### 5.7.1 Técnica do microcultivo (KERN & BLEVINS, 1999)

Para essa técnica foram utilizadas placas de Petri esterilizadas contendo em seu interior uma lâmina e um pedaço de algodão. Um cubo de 1 cm<sup>2</sup> de meio de cultura BDA foi cortado e colocado sobre a lâmina no interior da placa. Repicou-se o fungo em todos os lados do cubo, cobrindo-o posteriormente com uma lamínula esterilizada. O algodão no interior da placa foi umedecido com água destilada esterilizada e a placa foi incubada em estufa incubadora por 7 a 14 dias à 28° C. Após o tempo determinado a lamínula foi retirada e colocada sobre outra lâmina limpa contendo uma gota de Lactofenol azul de algodão ou Lactofenol de Amann, sendo as bordas vedadas com parafina. As lâminas preparadas foram observadas em microscópio óptico.

## 5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A variável considerada foi o número de fungos e esses dados foram obtidos tanto das sementes de cultivo orgânico como convencional onde se utilizou dez sementes por repetições (placa), num total de 160 repetições para identificar os fungos associados ao café produzido por sistema de produção orgânica e convencional. Para testar a eficácia de diferentes meios de cultura para o isolamento de fungos associados ao café produzido por sistema de produção orgânico e convencional foram utilizadas 8 sementes por repetição (placa), num total de 80 repetições.

Os dados foram transformados para  $\log(x+2)$ , e em seguida foi feita uma análise de variância para se verificar se havia diferença significativa dos fungos encontrados nos dois sistemas de produção.

Para o teste da eficácia dos meios de cultura ainda foi realizado o Teste de Tukey, para se determinar se havia diferença entre os mesmos. Todas as análises foram realizadas segundo PIMENTEL GOMES (1985).

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 ISOLAMENTO DOS FUNGOS ASSOCIADOS ÀS SEMENTES DE CAFÉ ORGÂNICO E CONVENCIONAL DA VARIEDADE IAPAR 59

Foram isolados 1327 fungos no experimento para identificar os fungos associados ao café produzido por sistema de produção orgânica e convencional, que foram separados em sete gêneros, a saber: *Aspergillus*, *Curvularia*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Nigrospora*, *Trichoderma*, *Colletotrichum* e outros fungos dematiáceos (TABELA 1). Para se testar a eficácia de diferentes meios de cultura foram isolados 941 fungos, separados também em sete gêneros: *Aspergillus*, *Mucor*, *Nigrospora*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Rhizopus* e *Fusarium* (TABELA 2).

Os tratamentos foram analisados estatisticamente por análise de variância, demonstrando haver diferença significativa relacionada ao número total de fungos encontrados nas sementes de café produzido por sistema orgânico e convencional (ANEXO 1). Entretanto, ao se realizar a análise de variância entre os gêneros de cada sistema de produção, verificou-se que só há diferença significativa para os seguintes fungos: *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus* sp<sub>1</sub>, *Mucor*, *Aspergillus* sp<sub>3</sub>, *Rhizopus* sp<sub>1</sub> e *Curvularia* (ANEXO 1).

TABELA 1 – FUNGOS ISOLADOS DAS SEMENTES DE CAFÉ ORGÂNICO E CONVENCIONAL DA VARIEDADE IAPAR 59.

continua

FUNGOS	SISTEMAS DE PRODUÇÃO	
	Convencional	Orgânico
<i>Aspergillus flavus</i>	92	97
<i>Aspergillus carbonarius</i>	107	439
<i>Aspergillus</i> sp <sub>1</sub>	58	6
<i>Aspergillus</i> sp <sub>2</sub>	97	110
<i>Aspergillus</i> sp <sub>3</sub>	26	11
<i>Aspergillus</i> sp <sub>4</sub>	1	-
<i>Colletotrichum</i>	13	28
<i>Curvularia</i>	2	17

continuação

FUNGOS	SISTEMAS DE PRODUÇÃO	
	Convencional	Orgânico
Dematiáceos	51	49
<i>Mucor</i>	48	9
<i>Nigrospora</i>	6	4
<i>Rhizopus</i> sp <sub>1</sub>	43	11
<i>Trichoderma</i>	2	-
Total	547	780

FUNGOS ISOLADOS EM 1600 SEMENTES, 800 PARA CADA SISTEMA DE PRODUÇÃO

TABELA 2 – FUNGOS ISOLADOS DAS SEMENTES DE CAFÉ ORGÂNICO E CONVENCIONAL DA VARIEDADE IAPAR 59 NOS DIFERENTES MEIOS DE CULTURA.

FUNGOS	MEIOS			
	Czapeck	<i>Fusarium</i>	BDA	DRBC
<i>Aspergillus flavus</i>	24	16	9	23
<i>Aspergillus carbonarius</i>	35	11	20	35
<i>Aspergillus</i> sp <sub>6</sub>	-	-	-	1
<i>Aspergillus</i> sp <sub>7</sub>	11	5	9	16
<i>Fusarium</i> sp <sub>1</sub>	-	-	-	1
<i>Fusarium</i> sp <sub>2</sub>	-	3	-	-
<i>Fusarium</i> sp <sub>3</sub>	1	5	-	-
<i>Mucor</i>	16	7	9	19
<i>Nigrospora</i>	14	7	2	4
<i>Penicillium</i> sp <sub>1</sub>	109	116	111	112
<i>Penicillium</i> sp <sub>2</sub>	34	27	56	30
<i>Penicillium</i> sp <sub>3</sub>	-	1	-	-
<i>Rhizopus</i> sp <sub>1</sub>	3	7	15	-
<i>Rhizopus</i> sp <sub>2</sub>	1	-	-	1
<i>Trichoderma</i>	-	-	4	3
TOTAL	247	205	235	245

FUNGOS ISOLADOS EM 640 SEMENTES, 320 PARA CADA SISTEMA DE PRODUÇÃO



## 6.2 DETERMINAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DE CADA GÊNERO ISOLADO DAS SEMENTES DE CAFÉ ORGÂNICO E CONVENCIONAL DA VARIEDADE IAPAR 59

Para a determinação das frequências de cada gênero só foram considerados os fungos isolados do café produzido por sistema de produção orgânica e convencional (TABELA 1).

Observou-se uma maior incidência de fungos do gênero *Aspergillus* em sementes de cultivo orgânico (GRÁFICO 1). Além disso, pode-se observar que o gênero *Aspergillus* contribuiu com duas espécies identificadas (*A. carbonarius* e *A. flavus*), além de 5 morfotipos (TABELA 3).

Os gêneros que apresentaram uma diferença significativa de frequência foram: *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus* sp<sub>1</sub>, *Mucor*, *Aspergillus* sp<sub>3</sub>, *Rhizopus* sp<sub>1</sub> e *Curvularia*. (ANEXO 1).

*Aspergillus carbonarius* apresentou uma frequência de 54,88% em sementes de cultivo orgânico e 13,38 % em sementes de cultivo convencional. *Aspergillus* sp<sub>1</sub> apresentou frequência de 0,75% em sementes de cultivo orgânico e 7,25% em sementes de cultivo convencional. O gênero *Mucor* com frequências de 1,13% e 6,00% em sementes produzidas por cultivo orgânico e convencional, respectivamente. *Aspergillus* sp<sub>3</sub> apresentou uma frequência de 1,38% em sementes de cultivo orgânico e 3,25% em sementes de cultivo convencional. O gênero *Rhizopus* por sua vez com frequências de 1,381% e 5,38% para sementes provenientes de cultivo orgânico e convencional, respectivamente. Por fim, o gênero *Curvularia* apresentou uma frequência de 2,13% em sementes de cultivo orgânico e 0,25% em sementes de cultivo convencional. (TABELA 3). A distribuição de frequência dos gêneros com diferença significativa entre os dois sistemas de produção é visualizada no GRÁFICO 2.

As frequências dos demais gêneros não apresentaram uma diferença significativa, de acordo com a análise de variância (ANEXO 1).

GRÁFICO 1 – NÚMERO TOTAL DE FUNGOS DO GÊNERO *ASPERGILLUS* ENCONTRADOS EM SEMENTES PROVENIENTES DE CULTIVO ORGÂNICO E CONVENCIONAL DA VARIEDADE IAPAR 59.

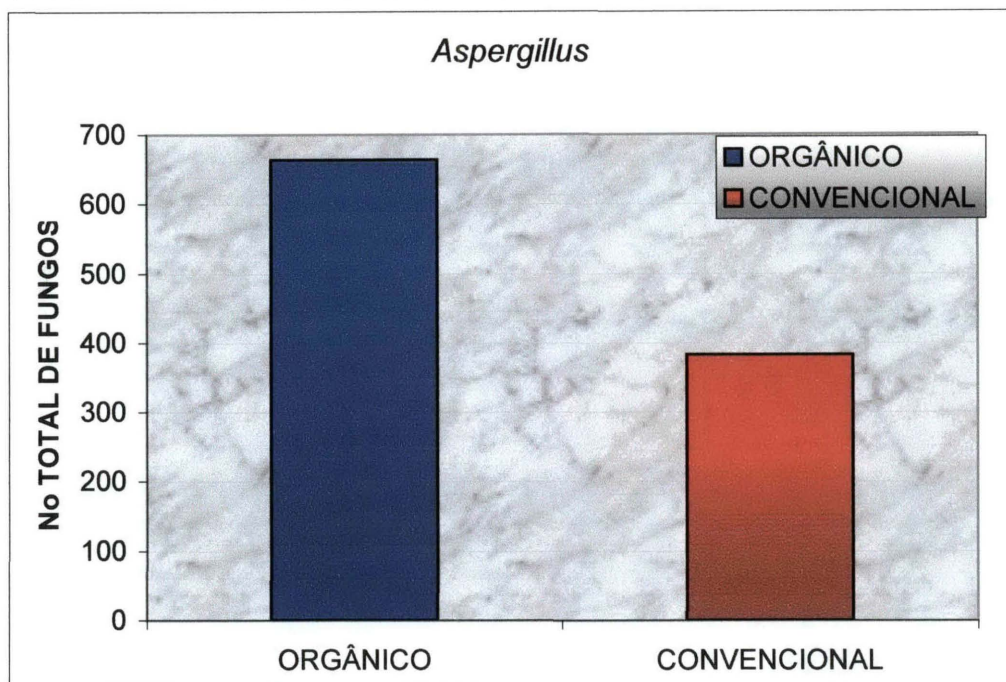
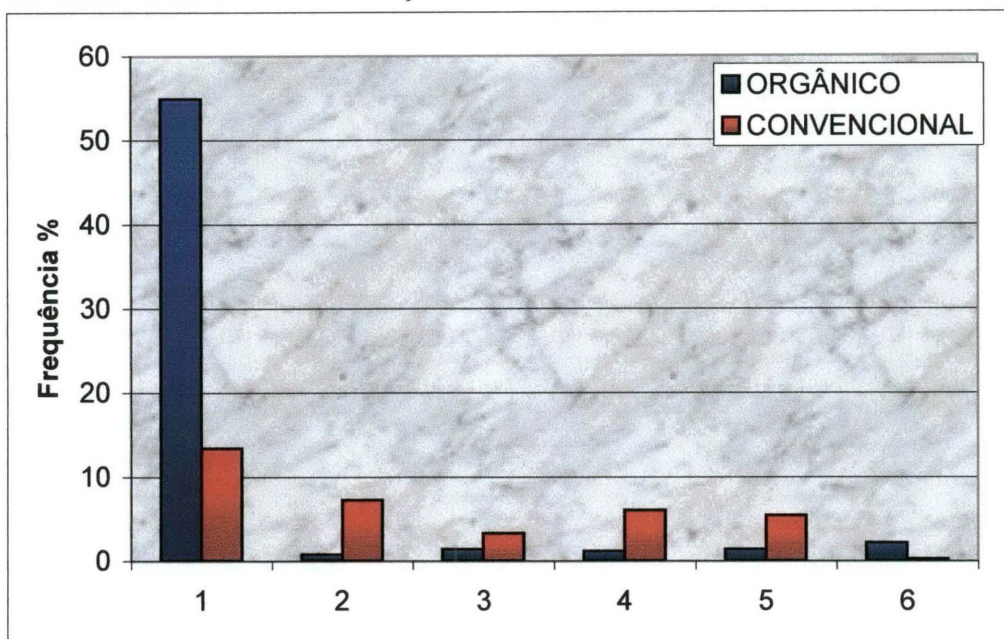


TABELA 3 - NÚMERO TOTAL DE COLÔNIAS OBSERVADAS E FREQUÊNCIA RELATIVA EM PERCENTAGEM DA OCORRÊNCIA DE FUNGOS EM RELAÇÃO AO NÚMERO TOTAL DE SEMENTES DE CAFÉS PROVENIENTES DOS SISTEMAS ORGÂNICO E CONVENCIONAL DA VARIEDADE IAPAR 59.

FUNGOS	Orgânico		Convencional	
	N	%	N	%
<i>Aspergillus carbonarius</i>	439	54,88	107	13,38
<i>Aspergillus flavus</i>	97	12,13	92	11,50
<i>Aspergillus</i> sp <sub>1</sub>	6	0,75	58	7,25
<i>Aspergillus</i> sp <sub>2</sub>	110	13,75	97	12,13
<i>Aspergillus</i> sp <sub>3</sub>	11	1,38	26	3,25
<i>Aspergillus</i> sp <sub>4</sub>	-	-	1	0,13
<i>Aspergillus</i> sp <sub>5</sub>	-	-	1	0,13
<i>Curvularia</i>	17	2,13	2	0,25
Dematiáceos	49	6,13	51	6,38
<i>Mucor</i>	9	1,13	48	6,00
<i>Rhizopus</i> sp <sub>1</sub>	11	1,38	43	5,38
<i>Nigrospora</i>	4	0,50	6	0,75
<i>Trichoderma</i>	-	-	2	0,25
<i>Colletotrichum</i>	28	3,50	13	1,63

N = número total de colônias observadas em 800 sementes; % = percentagem em frequência na amostra.

GRÁFICO 2 – DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA DE FUNGOS DE SEMENTES DE CAFÉ PROVENIENTES DE CULTIVO ORGÂNICO E CONVENCIONAL QUE APRESENTARAM DIFERENÇA SIGNIFICATIVA.



**Legenda:** 1, *Aspergillus carbonarius*; 2, *Aspergillus sp1*; 3, *Aspergillus sp3*; 4, *Mucor*; 5, *Rhizopus* 6, *Curvularia*.

### 6.3 DIFERENÇAS ENTRE OS SISTEMAS DE PRODUÇÃO DE CAFÉ ORGÂNICO E CONVENCIONAL DA VARIEDADE IAPAR 59

De acordo com os resultados obtidos pode-se verificar que há diferença significativa entre o total de fungos encontrados em cada sistema de produção. Os gêneros que realmente apresentaram uma diferença significativa entre sistemas de produção foram: *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus sp1*, *Mucor*, *Aspergillus sp3*, *Rhizopus sp1* e *Curvularia*.

O gênero *Aspergillus* apresentou maior incidência em sementes de origem orgânica. Segundo FREITAS (2000) espécies do gênero *Aspergillus* são as principais responsáveis pelo sabor amargo desagradável e liberação de toxinas. Entretanto, vale a pena ressaltar que a ocorrência e a concentração de toxinas é dependente de diversos fatores além da presença ou ausência das espécies nos frutos ou sementes dos cafés (PASTER *et al.*, 1992; PITT *et al.*, 1997; SCUSSEL, 1998), e também fatores como

composição química das sementes e grãos, já que certas substâncias como a cafeína pode inibir substancialmente a produção de micotoxinas.

Entre os *Aspergillus* encontrados, *Aspergillus carbonarius* merece especial atenção, por seu potencial toxigênico (JOOSTEN *et al.*, 2000; SOARES, 2000).

*Aspergillus carbonarius* é produtor de ocratoxina A (OA), uma micotoxina nefrotóxica e nefrocarcinogênica, a qual já foi detectada em diversos alimentos, como cereais, nozes, vinhos, cerveja e também café. A ocorrência da OA em sementes de café já foi reportada por diversos autores (KONONENKO *et al.*, 2000; STEGEN *et al.*, 1997; TANIWAKI *et al.*, 2003; TRUCKSESS *et al.*, 1999), mas várias controvérsias são encontradas, no que se refere à influência do processamento do café na concentração de OA (PITT *et al.*, 1997); um recente estudo mostrou que mais de 80% da OA encontrada em grãos de café é destruída durante o seu processamento sob condições industriais (BLANC *et al.*, 1998).

O fato das sementes de origem orgânica terem apresentado em torno de 4 vezes mais *Aspergillus carbonarius* do que sementes de origem convencional pode levantar algumas controvérsias sobre esse sistema de produção, pois se por um lado a agricultura orgânica prega a ausência do uso de substâncias químicas que, muitas vezes, são agressivas aos humanos e ao ambiente (BETTIOL *et al.*, 2002), por outro, as sementes orgânicas apresentaram um número muito grande de *Aspergillus carbonarius*, um fungo que é potencial liberador de ocratoxina A. Esse dado pode parecer preocupante à primeira vista, mas segundo SOARES (2000), o café brasileiro não tem se mostrado com contaminações significativas desses metabólitos, e quando apresenta, os valores são muito baixos.

Como o gênero *Aspergillus* tem sido descrito como um fungo de armazenamento (CHRISTENSEN e KAUFMANN, 1969), e como ele aumenta sua freqüência com o tempo de armazenamento (PIMENTA *et al.*, 2003), uma maneira de se contornar o problema da alta densidade de *Aspergillus* em sementes de origem orgânica, seria melhorar as condições de armazenamento, fazendo um melhor controle de umidade e temperatura, pois a alta umidade relativa do ar e a alta temperatura podem propiciar a infecção e crescimento de microrganismos, comprometendo a qualidade da bebida. As condições climáticas e a flora microbiana predominante são consideradas alguns dos fatores responsáveis pela melhor ou pior qualidade do café (CHALFOUN, 1996).

Em sementes de café convencional observou-se uma frequência mais baixa de *Colletotrichum* que nas sementes de café orgânico; (BRACCINI, 1999) isolou *Colletotrichum* em sementes de café robusta, e classifica este juntamente com varias espécies de *Aspergillus*, *Fusarium*, e *Alternaria* como fungos de armazenamento e demonstra que a incidência destes fungos e principalmente de *Aspergillus* pode aumentar a sua frequência com o tempo de armazenamento.

No experimento para identificar os fungos associados ao café produzido por sistema de produção orgânica e convencional verificou-se a ausência do gênero *Fusarium* em ambos os tipos de semente, contudo, vários trabalhos demonstram que esse gênero é normalmente encontrado em grãos de café (ALVES, 1998; SILVA et al., 1998; KRUG, 1940; WOSIACK, 1971; CHALFOUN e CARVALHO, 1989; MEIRELLES, 1990; ALVES, 1996; FREITAS, 2000; BATISTA, 2000).

Uma possível explicação para a ausência de *Fusarium* é relatada por MISLIVEC et al (1983) que atribui esta inibição pela presença de alguns metabólitos produzidos por certos fungos. Outros gêneros como *Aspergillus* e *Rhizopus* podem colonizar os tecidos da planta mais rapidamente (BITANCOURT, 1957; KRUG, 1941), fazendo com que a presença de certos gêneros de crescimento mais lento seja mascarada. A ausência do gênero *Fusarium* ainda pode ser explicada pelas condições climáticas da região onde os grãos foram coletados, que podem não ser favoráveis para o desenvolvimento do fungo.

Os gêneros *Mucor* e *Rhizopus* apareceram com maior frequência em sementes de origem convencional, sendo que várias pesquisas têm demonstrado que ambos os gêneros estão sempre associados a grãos de café (MISLIVEC et al., 1983; TANIWAKI et al., 1998; KRUG, 1940; WOSIACK, 1971; CHALFOUN & Carvalho, 1989; MEIRELLES, 1990; ALVES, 1996; FREITAS, 2000; BATISTA, 2000).

#### 6.4 DETERMINAÇÃO DA EFICÁCIA DOS MEIOS DE CULTURA PARA O ISOLAMENTO DE FUNGOS DE SEMENTES DE CAFÉ ORGÂNICO E CONVENCIONAL DA VARIEDADE IAPAR 59

Para esse experimento foram utilizados 4 meios de cultura : DRBC, BDA, Czapeck e meio para o isolamento de *Fusarium*. Foram isolados 941 fungos das sementes de café da variedade IAPAR 59 produzidas por sistema orgânico e convencional, separados em sete gêneros: *Aspergillus*, *Mucor*, *Nigrospora*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Rhizopus* e *Fusarium*.

Para se testar a eficácia de cada meio no isolamento dos gêneros que apresentaram diferença significativa entre os sistemas de produção (ANEXO 2), foi realizado o Teste de Tukey, (TABELA 4) o qual compara as médias dos fungos em cada meio de cultura, assim verificando-se o melhor meio de cultura para o isolamento de cada gênero de fungo. Somente 4 gêneros apresentaram diferença significativa entre o número de fungos encontrados nos diferentes meios de cultura: *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus flavus*, *Nigrospora*, *Trichoderma* e *Fusarium* sp<sub>2</sub>. O total de fungos também apresentou uma diferença significativa (ANEXO 2).

TABELA 4 – MÉDIA DA OCORRÊNCIA DOS FUNGOS ISOLADOS NOS DIFERENTES MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS PARA O ISOLAMENTO DE FUNGOS DE SEMENTES DE CAFÉ ORGÂNICO E CONVENCIONAL DA VARIEDADE IAPAR 59

Meio de Cultura	FUNGOS					TOTAL
	<i>A. carbonarius</i>	<i>A. flavus</i>	<i>Nigrospora</i> sp	<i>Trichoderma</i> sp	<i>Fusarium</i> sp <sub>2</sub>	
DRBC	5,438 a	4,791 a	3,363 a	3,724 a	3,010 a	63,595 a
Czapeck	5,414 a	4,840 a	4,141 b	3,010 b	3,010 a	63,550 a
BDA	4,553 b	3,727 b	3,161 c	3,363 c	3,010 a	62,025 b
Fusarium	3,953 c	4,303 c	3,601 d	3,010 b	3,274 b	61,430 c
CV (%)	66,55	52,61	53,06	25,65	19,20	7,81

Obs.: Médias obtidas a partir dos dados transformados para  $\log(x+2)$ . Médias com a mesma letra não diferem entre si, a 1% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Como pode-se observar na TABELA 4, *Aspergillus carbonarius* e *Aspergillus flavus* obtiveram um melhor crescimento nos meios DRBC e Czapeck, os quais não diferiram estatisticamente entre si. Já para o gênero *Nigrospora* o meio mais eficaz foi o Czapeck, o qual teve a maior média de colônias observadas, diferindo assim dos demais meios. O gênero *Trichoderma* apresentou maior número de colônias isoladas no meio BDA; e para *Fusarium* sp<sub>2</sub>, a maior média, a qual diferiu significativamente das demais, foi conseguida pelo meio para isolamento de *Fusarium*, como era de se esperar.

Ao se considerar a média do total de fungos isolados dos 4 meios de cultura, os meios mais eficazes foram o DRBC e o Czapeck, os quais não diferiram significativamente entre si.

## 6.5 DIFERENÇAS ENTRE OS MEIOS DE CULTURA PARA O ISOLAMENTO DE FUNGOS DE SEMENTES DE CAFÉ ORGÂNICO E CONVENCIONAL DA VARIEDADE IAPAR 59

De acordo com os resultados obtidos, pode-se verificar que certos meios de cultura são mais eficazes no isolamento de certos gêneros de fungos que outros.

O meio DRBC (Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar) apresentou bons resultados em fungos de crescimento rápido, como fungos do gênero *Aspergillus*, pois é um meio especialmente indicado para analisar amostras com maior taxa de crescimento. O dichloran e a rosa bengala efetivamente diminuem o crescimento dos fungos, propiciando a detecção de outros propágulos de fungos que tenham menor taxa de crescimento (GAVA, 2002). Esse meio mostrou o mesmo desempenho em outros estudos, como os desenvolvidos por KING *et al.* (1979), motivo pelo qual esse meio foi adotado pelos principais guias de microbiologia de alimentos (ACUFF, 1992; TOURNAS *et al.*, 1998).

O meio Czapeck praticamente não diferiu significativamente do DRBC, ainda sendo o mais indicado para o isolamento de *Nigrospora* sp, então podendo-se sugerir o seu uso juntamente com o DRBC para aqueles gêneros com maior taxa de crescimento.

O meio BDA, apesar de ser muito utilizado para isolamento de fungos, somente foi mais eficaz para isolamento do gênero *Trichoderma*.

Finalmente, o meio para isolamento de gênero *Fusarium* foi, de fato, mais eficaz para o isolamento desse gênero, apresentando maior média que os demais meios, a qual diferiu significativamente das demais. Apesar disso, o meio não apresentou os resultados esperados, visto que a frequência de *Fusarium* sp foi muito baixa, se comparada com os demais gêneros.

Para os demais fungos, os meios de cultura não apresentaram uma diferença significativa, ou seja, não importa qual o meio de cultura utilizado, *Aspergillus* sp<sub>6</sub>, *Aspergillus* sp<sub>7</sub>, *Mucor* sp, *Penicillium* sp<sub>1</sub>, *Penicillium* sp<sub>2</sub>, *Penicillium* sp<sub>3</sub>, *Rhizopus* sp<sub>1</sub>, *Rhizopus* sp<sub>2</sub>, *Fusarium* sp<sub>1</sub> e *Fusarium* sp<sub>3</sub> se comportam de maneira igual, não fazendo distinção entre um meio ou outro.

## 7. CONCLUSÕES

- Há diferença significativa entre o número de fungos encontrados em sementes de café provenientes de sistema de produção convencional e orgânico, confirmando o impacto gerado pelos agrotóxicos sobre a microbiota das plantas.
- Sementes de origem orgânica apresentaram um número aproximadamente quatro vezes maior da espécie *Aspergillus carbonarius*, um fungo potencialmente produtor de ocratoxina A.
- Ao se utilizar diferentes meios de cultura para o isolamento de fungos de sementes de café provenientes de sistema de produção orgânico e convencional, observou-se uma diferença significativa entre os 4 meios para o isolamento de *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus flavus*, *Nigrospora* sp, *Trichoderma* sp e *Fusarium* sp<sub>2</sub>.



## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACUFF, G.R. Media, reagents and stains. In: VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D.F. (Ed.). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3. ed. Whashingto: Edwards Brothers. chap. 62, p. 1093-1208, 1992.
- ALICE. **Análise das Informações de Comércio Exterior**. Disponível em <[http://www.abic.com.br/estat\\_exportacoes.html](http://www.abic.com.br/estat_exportacoes.html)> Acessado em 29/08/04.
- ALVES, E. **População fúngica associada ao café (Coffea arabica L.) beneficiado e as fases pré e pós colheita-relação com a bebida e local de cultivo**. Lavras: UFLA, 1996. 48p. (Dissertação-Mestrado em Fitopatologia).
- ALVES, E.; CASTRO, H. **Associação de fungos associados ao café (Coffea arabica L.) nas fases de pré e pós colheita em lavouras da região de Lavras**. Summa Phytopathologica, Jaboticabal, v.24, n.1, p.4-7, 1998.
- ALVES, S.B.; NOGUEIRA, N.L. **Efeito da temperatura na germinação e viabilidade do *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 9. Londrina. *Resumos*. p.170, 1984.
- AMORIN, H. V. **Aspectos bioquímicos e histoquímicos do grão de café verde relacionados com a deterioração de Qualidade**. 1978. Tese (Livre docência) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiróz”, Piracicaba. **Moderna**, Campinas, v. 1, n. 2, p. 31-33, jul./ago.
- ANDERSON, J.P.E.; ARMSTRONG, R.A.; SMITH, S.N. Methods to evaluate pesticide damage to the biomass of soil microflora. **Soil Biology & Biochemistry**, v.13, p. 149-153, 1981.
- BARNETT, H.C.; HUNTER, B.B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 3 ed. Minneapolis: Burgess Publications, 1987.
- BATISTA, L.R. **Identificação, potencial toxigênica e produção de micotoxinas de fungos associados a grãos de café (Coffea arabica L)**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2000. 188p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos).
- BETTIOL, W.; GHINI, R.; GALVÃO, J.A.H.; LIGO, M.A.V.; MINEIRO, J.L.C. Soil microorganisms in organic and conventional cropping systems. **Scientia Agricola**, v.59, n.3, p. 565-572, 2002.
- BITANCOURT, A. A. As fermentações e podridões da cereja café. **Boletim da Superintendência dos Servidores do Café**, v. 32, n. 359, p. 7-14, 1957.
- BLANC, M.; PITTET, A.; MUNOZ-BOX, R.; VIANI, R.. Behavior of ochratoxin A during green coffee roasting and soluble coffee manufacture. **J. Agric. Food Chem.** 46, 673–675, 1998.

BRACCINI, A. de L. e. et al. **Incidência de microorganismos em sementes de café robusta durante o armazenamento.** *Bragantia*, Campinas, v. 58, n. 2, p. 305-315, 1999.

BULLERMAN, L.B. **Significance of mycotoxins to food safety and human health.** *J. Food Prot.*, v.42, n.1, p.65-86, 1979.

BULLERMAN, L.B.; SCHROEDER, L.L.; PARK, K.Y. **Formation and control of mycotoxins in food.** *J. Food Prot.*, v.47, n.8, p.637-646, 1984.

CARVALHO, V.D., CHALFOUN, S.M. **Aspectos qualitativos do café.** Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v. 11, n. 126, p. 79-92, 1985.

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

CARVALHO, V.D.; CHAGAS, S.J.R.; CHALFOUN, S.M. **Fatores que afetam a qualidade do café.** Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v.18, n.187, p.15-20. 1997.

CHALFOUN, S.M.S. **O café (Coffea arabica L.) na Região Sul de Minas Gerais - relação da qualidade com fatores ambientais, estruturais e tecnológicos.** Lavras: UFLA, 1996. 171p. (Tese - Doutorado em Fitotecnia).

CHALFOUN, S. M., CARVALHO, V. D. Microflora associada a frutos e grãos de café de diferentes locais, tipos de colheita e diferentes etapas de preparo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 11, Londrina. Anais... Londrina: Instituto Brasileiro do Café, 1984. 319 p., 1989.

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

COLE, G.T. & HOCH, H.C. **The fungal spore and disease initiation in plants and animals,** New York, Plenum Press, 1991. p.72.

COLLIER, L.; BALOWS. A.; SUSSMAN, M. Topley & Wilson's **Microbiology and Microbial Infections**, 9th ed, vol. 4. Arnold, London, Sydney, Auckland, New York, 1998.

CONAB. **Companhia Nacional de Abastecimento.** Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/download/Safra/Safracafe.pdf>> Acessado em 10/09/04.

COULOMBE, R.A. **Aflatoxins.** In: SHARMA R.P.; SALUNKHE, DK. (Eds.) *Mycotoxins and Phytoalexins.* London: CRC Press, 1991. p.103-144.

DAVIS, B.N.K.; WILLIAMS, C.T. Bufferzone widths for honeybees from ground and aerial spraying of insecticides. **Environmental Pollution**, v.63, p. 247-259, 1990

DE HOOG, G. S.; GUARRO, J.; GENE, J.; FIGUERAS, M. J. **Atlas of Clinical Fungi**, 2nd ed, vol. 1. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands, 2000.

DHINGRA, O.C. Prejuízos causados por microrganismos durante o armazenamento de sementes. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.7, n.1, p.139-145, 1985.

ELLIS, M.B. **More dematiaceous hyphomycetes**. Surrey, Common health Mycological Institut, 1971.

EMATER. **Empresa Paranaense de Assistência Técnica e Extensão Rural**. Disponível em: [http://www.emater.pr.gov.br/programas/agricultura\\_organica.html](http://www.emater.pr.gov.br/programas/agricultura_organica.html)> Acessado em 11/12/04.

EMBRAPA. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**. Disponível em: <http://www.embrapa.br/cafe/historico.htm>.> Acessado em 29/08/04.

FAO. **Food and Agriculture Organization**. Disponível em: <http://www.fao.org/organica/frame6-e.htm>> Acessado em: 11/12/04.

FERRON, P. **Biological control of insects pest by entomogenous fungi**. *An. Ver. Entomol.*, Palo Alto, v.23, p. 409-442, 1978.

FREITAS, R.F. **Fungos associados a grãos de café (Coffea arabica L.) beneficiado de diversos municípios da região Sul de Minas Gerais**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2000. 95p. (Dissertação-Mestrado em Ciência dos Alimentos).

FREITAS, R.F.; PFENNING, L.H., CHALFOUN, S.M.; BATISTA, L.R.; MAIA, T.J. **Ocorrência e severidade da contaminação de grãos de café (Coffea arábica L.) por fungos do gênero Aspergillus em diversas propriedades do sul de Minas Gerais**. **Simpósio de Pesquisas dos Cafés do Brasil**. Poços de Caldas, p. 245-248, 2000.

FRISVAD, J.C. & SAMSON, R.A. **Filamentous in foods and feeds: ecology, spoilage, and mycotoxin production**. In: BHATNAGAR, D.; LILLEHOJ, E.B.; ARARI, D.K. (Eds.) *Handbook of Applied Mycology: "Mycotoxins in Ecological Systems"*. New York: Marcel Dekker, 1992. v.5, p.32-57.

GAVA, M. A. **Desempenho de diferentes meios de cultura utilizados na avaliação de fungos presentes em ambientes de produção de alimentos**. Dissertação de Mestrado, Piracicaba, São Paulo, 2002.

GONÇALES, E.; PINTO, M.M.; FELÍCIO, J.D. **Fungos Produtores de Micotoxinas**. Instituto Biológico, São Paulo, v.63, n.1/2, p.15-19, jan./dez., 2001.

HUSSEIN, S.H. & BRASEL, J.M. **Toxicoly, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals**. *Toxicology*, v.167, p.101-134, 2001.

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Disponível em: [http://www.agricultura.gov.br/pls/portal/docs/PAGE/MAPA/ESTATISTICAS/AGRICULTURA\\_EM\\_NUMEROS\\_2003/3.1.01.C.XLS](http://www.agricultura.gov.br/pls/portal/docs/PAGE/MAPA/ESTATISTICAS/AGRICULTURA_EM_NUMEROS_2003/3.1.01.C.XLS).> Acessado em 29/08/04.

IGNOFFO, C.M., GARCIA, C., HOSTETTER, D.L. **Effects of temperature on growth and sporulation of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi***. *Environ. Entomol.*, v.5, p. 935-936, 1976.

JOOSTEN, H.M.L.J.; GOETZ, J.; PITTET, A.; SCHELLENBERG, M.; BUCHELI, P. **Production of Ochratoxin A by *Aspergillus carbonarius* on Coffee Cherries.** International Journal of Food Microbiology, 65, 39-44, 2000.

KERN, M.E.; BLEVINS, K.S. **Micologia Médica.** 2ª. ed. São Paulo: Editora Premier, 1999.

KING, A.D.; HOCKING, A.D.; PITT, J.I. Dichloran-Rose Bengal Medium for enumeration and isolation of molds from foods. **Applied and Environmental Microbiology**, v.37, n.5, p.959-964, May, 1979.

KNUDTSON, W. U.; KIRKBRIDE, C. A. **Fungi associated with bovine abortion in the northern plains states (USA).** J Vet Diagn Invest. 4:181-5, 1992.

KONEMAN, E.W.; ROBERTS, G.D. **Micologia Prática de Laboratório.** Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana, 2001.

KONONENKO, G. P.; BURKIN, A. A.; ZOTOVA, E. V.; & SOBOLEVA, N. A. (2000). Ochratoxin A: contamination of grain. **Applied Biochemistry and Microbiology**, 36, 177-180.

KRUG, H.P. **Cafés duros II - Um estudo sobre a qualidade dos cafés de varrição.** Revista do Instituto do café, do Estado de São Paulo, São Paulo, v. 15, p. 1393-1396, 1940.

KRUG, H. P. **Concepção moderna sobre a origem dos cafés duros.** **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v. 20, p. 416-426, 1945.

KRUG, H. P. **A origem dos cafés duros.** **Boletim da Agricultura**, São Paulo, v. 48, p. 397-406, 1947.

LARONE, D. H. 1995. **Medically Important Fungi - A Guide to Identification**, 3rd ed. ASM Press, Washington, D.C., 1995.

LAZZARI, F.A. **Umidade, fungos e micotoxinas na qualidade de sementes, grãos e rações.** 2ª ed. Paranaset, Curitiba, 1997.

MALLOZZI, A.B. & CORRÊA, B. **Fungos Toxigênicos e Micotoxinas.** *Bol. Técn. Inst. Biol.*, São Paulo, n.12, p.5- 26, 1998.

MEIRELLES, A.M.A. **Ocorrência e controle da microflora associada aos frutos de café (*Coffea arabica* L.) provenientes de diferentes localidades do estado de Minas Gerais.** Lavras: Escola Superior de Agricultura de Lavras, 1990. 71p. (Dissertação - estrado em Agronomia).

MISLIVEC, P. B., R. B. VERNEAL and R. GIBSON. **Incidence of toxigenic and other molds in green coffee beans.** Journal of Food Protection, v.46, p. 969-973, 1983.

MOSS, M.O. **Mycotoxic fungi**. In: ADRIAN, R.E. (Ed.) *Microbial food poisoning*. London: Chapman & Hall, 1996. p.75-93.

OGA, S. **Fundamentos de toxicologia**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 1996.

PASTER, N., PUSHINSKY, A; MENASHEROV, M. e CHET, I. Inhibitory Effect of *Aspergillus niger* on the Growth of *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus flavus*, and on Aflavotoxin Formation. **Journal Science Food Agricultural**, n.58, p. 589-591, 1992.

PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E.C.S. **Microbiologia**. São Paulo. McGraw-Hill, 1996.

PEREIRA, R.G.; BORÉM, F.M.; VILELA, T. Microbiologia dos cafés do Alto Rio Grande. In: **II Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil** - Setembro de 2001.

PIMENTA, C.J.; VILELA, E.R. **Composição Microbiana e Ocratoxina A no Café (*Coffea arabica* L.) Submetido a Diferentes Tempos de Espera e Secagem**. Ciênc. agrotec., Lavras. V.27, n.6, p.1315-1320, nov./dez., 2003.

PIMENTEL GOMES, F. **Curso de estatística experimental**,. Ed. São Paulo, Nobel, 1985, 466p.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D.; BHUDHASAMAI, K.; MISCAMBLE, B. F.; WHEELER, K. A.; TANBOON-EK, P. The normal mycoflora of commodities from Thailand. 2. Beans, rice, small grains and other commodities. **International Journal of Food Microbiology**. 23:35-43, 1994.

PITT, J. I. e HOCKING, A. D., **Fungi and Food Spoilage**, 2ª edição, Cambridge: Chapman & Hall, 1997.

PITT, J. I.; BASILICO, J. C.; ABARCA, M. L.; LOPEZ, C. **Mycotoxins and toxigenic fungi**. *Med Mycol*. 38:41-46, 2000.

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

SCHAAFSMA, A. W.; NICOL, R. W.; SAVARD, M. E.; SINHA, R. C.; REID, L. M.; ROTTINGHAUS, G. Analysis of *Fusarium* toxins in maize and wheat using thin layer chromatography. **Mycopathologia**. 142:107-13, 1998.

SCHNURER, J.; ROSSWALL, T. Mineralisation of nitrogen from N labeled fungi, soil microbial biomass and roots, and its uptake plants. **Plant and Soil**, v. 102, p.71-78, 1987.

SCISLABBA, N.E.; HATTAM, C. **Organic agriculture, environment and food security**, Rome. Food and agriculture organization of the united nations press, 2002.

SCUSSEL, V.M. **Micotoxinas em alimentos**. Florianópolis: Insular, 1998. p. 19-22.

SHARMA, R.P. & SALUNKHE, D.K. **Introduction to mycotoxins**. In: SHARMA, R.P. & SALUNKHE, D.K. (Ed.) *Mycotoxins and Phytoalexins*. London: CRC Press, 1991. p.3-11.

SIVAPALAN, A.; WENDY, M.C.; FRANZ, P.R. Monitoring populations of soil microorganisms during a conversion from a conventional to an organic system of vegetables growing. *Biological Agriculture and Horticulture*, v. 147, p. 2943-2950, 2001.

SILVA, J.S.; AFONSO, A.D.L.; LACERDA FILHO, A.F. **Secagem e armazenagem de produtos agrícolas In: Pré-processamento de produtos agrícolas**. Juiz de Fora, Instituto Maria. 1998. p.395-461.

SILVA, C.F. **Diversidade microbiana em grãos de café (*Coffea arabica* L.) processados por via seca nas fases pré e pós-colheita**. Lavras: UFLA, 2000. 105p. (Dissertação - Mestrado em Ciência dos Alimentos).

SMITH, J.E. & HENDERSON, R.S. **Mycotoxins and animal foods**. London: CRC Press, 1991. p.816-841.

SOARES, L. V. **Ocratoxinas e Aflatoxinas em cafés brasileiros**. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL SOBRE BIOTECNOLOGIA NA AGROINDÚSTRIA CAFEEIRA, 3, Londrina. Anais... Londrina: IAPAR/IRD, 2000. p. 447-452, 2000.

SOSA GOMEZ, D.R. **Caracterização de isolados de *Beauveria* spp. e determinação das exigências térmicas e hídricas de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill**. Piracicaba: 1990. 98p. [Tese (Doutorado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo].

ST-GERMAIN, G.; SUMMERBELL R. **Identifying Filamentous Fungi - A Clinical Laboratory Handbook**, 1st ed. Star Publishing Company, Belmont, California, 1996.

STEGEN, G. V. D.; JORISSEN, U.; PITTET, A.; SACCON, M.; STEINER, W.; VINCENZI, M.; WINKLER, M.; ZAPP, J.; & SCHLATTER, C. Screening of European cereal products for occurrence of ochratoxin A (OTA). **Food Additives and Contaminants**, 14, 211– 216, 1997.

SUTTON, D. A.; FOTHERGILL, A. W.; RINALDI, M. G. (ed.). **Guide to Clinically Significant Fungi**, 1st ed. Williams & Wilkins, Baltimore, 1998.

TANIWAKI, M. H.; PITT, J. I.; TEIXEIRA, A. A.; & IAMANAKA, B. T. The source of ochratoxin A in Brazilian cereals and its formation in relation to processing methods. **International Journal of Food Microbiology**, 82, 173–179, 2003.

TED, L. Growth of speciality coffee industry. **Plantations, recherche, developpement**, v. 3, n. 2, p. 171-178, 1996.

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

TOURNAS, V.; SATABACK, M.E.; MISLIVEC, P.B.; KOCH, H.A.; BANDLER, R. **Yeasts, molds and mycotoxins**. In: Food and drug administration: bacteriological and analytical manual. 8.ed. Gaithersburg: AOAC International. chap.18, p. 18.01-18.09, 1998.

TRABULSI, L.R. **Microbiologia** 4a. Edição Atheneu. São Paulo, 2002.

TRUCKSESS, M. W.; GILER, J.; YOUNG, K.; WHITE, K. D.; & PAGE, W. Determination and survey of ochratoxin A in wheat, barley, and co. ee-1997. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, 82, 85–89, 1999.

VALBENEDITO-SANHUEZA, R.M. Leveduras para o biocontrole de patógenos. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. **Controle Biológico**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000.

VINING, L.C. **Functions of secondary metabolites**. *Annu..Rev. Microbiol.*, v.44, p.395-427, 1990.

VOIGT, K.; CIGELNIK, E.; O'DONNELL, K. **Phylogeny and PCR identification of clinically important zygomycetes based on nuclear ribosomal-DNA sequence data**. *J Clin Microbiol.* 37:3957-3964, 1999.

WATSON, D.H. **Natural toxicants in food**. Chichester: Ellis Horwood, 1987. p.232-247.

WOSIACK, G. **Produção de enzimas hidrolíticas por fungos isolados do café**. Curitiba: UFPR, 1971. 33p. (Dissertação-Mestrado).

YENDOL, W.G. **Factors affecting germination of Entomophthora conidia**. *J. Invertebr. Pathol.* , v.10, p.116-121, 1968.

**ANEXOS**



ANEXO 1 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS FUNGOS ISOLADOS DAS  
SEMENTES DE CAFÉ PRODUZIDOS POR SISTEMA ORGÂNICO E  
CONVENCIONAL DA VARIEDADE IAPAR 59

1. Total de Fungos

FV	GL	SQ	QM	F
Origem	1	1,59978	1,5998	10,4763**
Resíduo	158	24,12727	0,1527	
Total	159	25,72705		

CV% = 6,0175

\*\* Significativo ao nível de probabilidade de 1%

2. *Aspergillus carbonarius*

FV	GL	SQ	QM	F
Origem	1	5,24998	5,25	270,08**
Resíduo	158	3,071328	0,0194	
Total	159	8,321308		

CV% = 20,57

\*\* Significativo ao nível de probabilidade de 1%

3. *Aspergillus* sp<sub>1</sub>

FV	GL	SQ	QM	F
Origem	1	0,418748	0,4187	46,7548**
Resíduo	158	1,415089	0,009	
Total	159	1,833837		

CV% = 25,9

\*\* Significativo ao nível de probabilidade de 1%

4. *Mucor* sp

FV	GL	SQ	QM	F
Origem	1	0,226216	0,2262	22,27**
Resíduo	158	1,604941	0,0102	
Total	159	1,831156		

CV% = 28,22

\*\* Significativo ao nível de probabilidade de 1%

5. *Aspergillus* sp<sub>2</sub>

FV	GL	SQ	QM	F
Origem	1	0,012305	0,0123	0,33169
Resíduo	158	5,861515	0,0371	
Total	159	5,87382		

CV% = 40,88

6. *Aspergillus flavus*

FV	GL	SQ	QM	F
Origem	1	0,000973	0,001	0,04039
Resíduo	158	3,808132	0,0241	
Total	159	3,809105		

CV% = 32,73

7. *Aspergillus* sp<sub>3</sub>

FV	GL	SQ	QM	F
Origem	1	0,033247	0,0332	4,6898**
Resíduo	158	1,120104	0,0071	
Total	159	1,153352		

CV% = 24,84

\*\* Significativo ao nível de probabilidade de 1%

8. *Aspergillus* sp<sub>4</sub>

FV	GL	SQ	QM	F
Origem	1	0,000194	0,0002	1,000
Resíduo	158	0,030621	0,0002	
Total	159	0,030814		

CV% = 4,61

9. *Nigrospora* sp

FV	GL	SQ	QM	F
Origem	1	0,000775	0,0008	0,42246
Resíduo	158	0,289926	0,0018	
Total	159	0,290701		

CV% = 13,73

10. *Trichoderma* sp

FV	GL	SQ	QM	F
Origem	1	0,000775	0,0008	2,02564
Resíduo	158	0,060466	0,0004	
Total	159	0,061241		

CV% = 6,45

## 11. Dematiáceos

FV	GL	SQ	QM	F
Origem	1	0,012169	0,0122	0,48287
Resíduo	158	3,98186	0,0252	
Total	159	3,994029		

CV% = 41,77

12. *Aspergillus* sp<sub>5</sub>

FV	GL	SQ	QM	F
Origem	1	0,000194	0,0002	1,000
Resíduo	158	0,030621	0,0002	
Total	159	0,030814		

CV% = 4,61

13. *Colletotrichum* sp

FV	GL	SQ	QM	F
Origem	1	0,032444	0,0324	3,61889
Resíduo	158	1,416514	0,009	
Total	159	1,448958		

CV% = 27,77

14. *Rhizopus* sp

FV	GL	SQ	QM	F
Origem	1	0,063891	0,0639	4,3155**
Resíduo	158	2,339179	0,0148	
Total	159	2,403071		

CV% = 35,38

\*\* Significativo ao nível de probabilidade de 1%

15. *Curvularia* sp

FV	GL	SQ	QM	F
Origem	1	0,034739	0,0347	8,4838**
Resíduo	158	0,646959	0,0041	
Total	159	0,681698		

CV% = 19,99

\*\* Significativo ao nível de probabilidade de 1%

ANEXO 2 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS FUNGOS PROVENIENTES DE SEMENTES DE CAFÉ ORGÂNICO E CONVENCIONAL DA VARIEDADE IAPAR 59, ISOLADOS DOS DIFERENTES MEIOS DE CULTURA

## 1. Total de fungos

FV	GL	SQ	QM	F
Trat	7	2,621	0,374	5,25**
Meio (M)	3	0,719	0,24	3,36*
Orig (O)	1	1,175	1,175	16,48**
M x O	3	0,727	0,242	3,40*
Resíd	72	5,136	0,071	
Total	79	7,757		

CV% = 7,81

\*\* Significativo ao nível de probabilidade de 1%

\* Significativo ao nível de probabilidade de 5%

2. *Aspergillus* sp<sub>7</sub>

FV	GL	SQ	QM	F
Trat	7	0,54214	0,0774	5,90**
Meio (M)	3	0,13469	0,0449	1,433
Orig (O)	1	0,30099	0,301	34,37**
M x O	3	0,10646	0,0355	0,85
Resíd	72	0,74667	0,0104	
Total	79	1,28881		

CV% = 57,77

\*\* Significativo ao nível de probabilidade de 1%

3. *Mucor* sp

FV	GL	SQ	QM	F
Trat	7	0,11844	0,0169	1,274
Meio (M)	3	0,05942	0,0198	1,491
Orig (O)	1	0,00969	0,0097	0,73
M x O	3	0,04933	0,0164	1,238
Resíd	72	0,95621	0,0133	
Total	79	1,07465		

CV% = 33,91

4. *Aspergillus* sp<sub>6</sub>

FV	GL	SQ	QM	F
Trat	7	0,00271	0,0004	1,00
Meio (M)	3	0,00116	0,0004	1,00
Orig (O)	1	0,00039	0,0004	1,00
M x O	3	0,00116	0,0004	1,00
Resíd	72	0,02791	0,0004	
Total	79	0,03062		

CV% = 6,49

5. *Aspergillus flavus*

FV	GL	SQ	QM	F
Trat	7	0,32	0,046	2,85**
Meio (M)	3	0,207	0,069	3,47*
Orig (O)	1	0,081	0,081	9,14**
M x O	3	0,033	0,011	0,625
Resíd	72	1,277	0,018	
Total	79	1,598		

CV% = 60,89

\*\* Significativo ao nível de probabilidade de 1%

\* Significativo ao nível de probabilidade de 5%

6. *Aspergillus carbonarius*

FV	GL	SQ	QM	F
Trat	7	0,965	0,138	13,58**
Meio (M)	3	0,19	0,063	8,80**
Orig (O)	1	0,564	0,564	60,33**
M x O	3	0,212	0,071	2,77
Resíd	72	0,876	0,012	
Total	79	1,842		

CV% = 50,91

\*\* Significativo ao nível de probabilidade de 1%

7. *Nigrospora* sp

FV	GL	SQ	QM	F
Trat	7	0,144	0,021	2,24.1*
Meio (M)	3	0,109	0,036	3,94*
Orig (O)	1	0,023	0,023	2,203
M x O	3	0,013	0,004	0,453
Resíd	72	0,663	0,009	
Total	79	0,807		

CV% = 53,18

\* Significativo ao nível de probabilidade de 1%

8. *Penicillium* sp<sub>1</sub>

FV	GL	SQ	QM	F
Trat	7	0,895	0,128	11,05**
Meio (M)	3	0,181	0,06	0,37
Orig (O)	1	0,497	0,497	70,9**
M x O	3	0,217	0,072	1,78
Resíd	72	0,749	0,01	
Total	79	1,644		

CV% = 27,92

\*\*Significativo ao nível de probabilidade de 1%

9. *Penicillium* sp<sub>2</sub>

FV	GL	SQ	QM	F
Trat	7	1,881	0,269	11,24**
Meio (M)	3	0,151	0,05	1,899
Orig (O)	1	1,059	1,059	45.73**
M x O	3	0,671	0,224	8,46**
Resíd	72	1,905	0,026	
Total	79	3,786		

CV% = 42,17

\*\*Significativo ao nível de probabilidade de 1%

10. *Penicillium* sp<sub>3</sub>

FV	GL	SQ	QM	F
Trat	7	0,003	4E-04	1,00
Meio (M)	3	0,001	4E-04	1,00
Orig (O)	1	4E-04	4E-04	1,00
M x O	3	0,001	4E-04	1,00
Resíd	72	0,028	4E-04	
Total	79	0,031		

CV% = 6,49

11. *Trichoderma* sp

FV	GL	SQ	QM	F
Trat	7	0,03992	0,0057	2,597*
Meio (M)	3	0,01977	0,0066	3,00*
Orig (O)	1	0,00969	0,0097	4,412*
M x O	3	0,01047	0,0035	1,588
Resíd	72	0,15814	0,0022	
Total	79	0,19806		

CV% = 25,65

\* Significativo ao nível de probabilidade de 1%

12. *Rhizopus* sp<sub>1</sub>

FV	GL	SQ	QM	F
Trat	7	0,24318	0,0347	2,90**
Meio (M)	3	0,0814	0,0271	2,261
Orig (O)	1	0,08348	0,0835	6,96**
M x O	3	0,0783	0,0261	2,175
Resíd	72	0,86409	0,012	
Total	79	1,10728		

CV% = 48,14

\*\*Significativo ao nível de probabilidade de 1%

13. *Rhizopus* sp<sub>2</sub>

FV	GL	SQ	QM	F
Trat	7	0,00465	0,0007	0,857
Meio (M)	3	0,00155	0,0005	0,667
Orig (O)	1	0,00155	0,0016	2,00
M x O	3	0,00155	0,0005	0,667
Resíd	72	0,05581	0,0008	
Total	79	0,06047		

CV% = 7,44

14. *Fusarium* sp<sub>1</sub>

FV	GL	SQ	QM	F
Trat	7	0,00271	0,0004	1,00
Meio (M)	3	0,00116	0,0004	1,00
Orig (O)	1	0,00039	0,0004	1,00
M x O	3	0,00116	0,0004	1,00
Resíd	72	0,02791	0,0004	
Total	79	0,03062		

CV% = 6,49

15. *Fusarium* sp<sub>2</sub>

FV	GL	SQ	QM	F
Trat	7	0,02442	0,0035	3,86**
Meio (M)	3	0,01047	0,0035	3,86*
Orig (O)	1	0,00349	0,0035	3,857
M x O	3	0,01047	0,0035	3,86*
Resíd	72	0,06512	0,0009	
Total	79	0,08954		

CV% = 19,2

\*\* Significativo ao nível de probabilidade de 1%

\* Significativo ao nível de probabilidade de 5

16. *Fusarium* sp<sub>3</sub>

FV	GL	SQ	QM	F
Trat	7	0,05227	0,0075	2,99**
Meio (M)	3	0,02044	0,0068	2,732
Orig (O)	1	0,00453	0,0045	1,816
M x O	3	0,0273	0,0091	3,65*
Resíd	72	0,1796	0,0025	
Total	79	0,23187		

CV% = 26,38

\*\* Significativo ao nível de probabilidade de 1%

\* Significativo ao nível de probabilidade de 5