

MELISSA KULIG AESCHBACH

**ISOLAMENTO DE FUNGOS DE GRÃOS DE CAFÉ DA VARIEDADE IAPAR
59 ASSOCIADOS À QUALIDADE DE BEBIDA DE CAFÉ**

**Monografia apresentada para obtenção
do título de Bacharel em Ciências
Biológicas, Departamento de Patologia
Básica, Setor de Ciências Biológicas,
Universidade Federal do Paraná.**

**Orientadora: Profª Drª Ida Chapaval
Pimentel**

**CURITIBA
2004**

Agradeço a

minha mãe Mara (*in memoriam*), por ter me ensinado a nunca desistir dos meus sonhos.

minha madrinha Miriam, minha irmã Larissa e minha melhor amiga Luciana, pelo apoio e confiança nos momentos mais difíceis de minha vida.

meu namorado Gilberto, por sempre acreditar em mim.

professora e orientadora Ida Chapaval Pimentel, pelo incentivo e tempo de dedicação.

Dalton e Yanê, pelas opiniões e ajuda tão importantes.

SUMÁRIO

RESUMO	iv
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 INTRODUÇÃO	3
2.2 FATORES CLIMÁTICOS	3
2.3 QUALIDADE DE BEBIDA.....	4
2.4 COMPOSTOS ORGÂNICOS.....	6
2.5 MICOTOXINAS	7
2.6 DOENÇAS DO CAFEIEIRO	8
2.7 PRAGAS DO CAFEIEIRO	11
2.8 CAFÉS ARMAZENADOS	13
3 MATERIAL E MÉTODOS	14
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
4.1 ISOLAMENTO DOS FUNGOS DOS GRÃOS DE CAFÉ DA VARIEDADE IAPAR 59 ORIGINÁRIOS DE ÁRVORE E DO SOLO	18
4.2 ISOLAMENTO DOS FUNGOS DOS GRÃOS DA VARIEDADE IAPAR 59 EM MEIO BDA, SABOURAUD E DRBC ORIGINÁRIOS DA AMOSTRA EXPERIMENTO	25
4.3 ISOLAMENTO EM MEIO BDA DOS FUNGOS DOS GRÃOS DA VARIEDADE IAPAR 59 ORIGINÁRIOS DE ÁRVORE E DO SOLO	27
4.4 ISOLAMENTO EM MEIO SABOURAUD DOS FUNGOS DOS GRÃOS DA VARIEDADE IAPAR 59 ORIGINÁRIOS DE ÁRVORE E DO SOLO	32
4.5 ISOLAMENTO EM MEIO DRBC DOS FUNGOS DOS GRÃOS DA VARIEDADE IAPAR 59 ORIGINÁRIOS DE ÁRVORE E DO SOLO	37
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS FUNGOS ISOLADOS EM MEIO BDA, SABOURAUD E DRBC DOS GRÃOS DA VARIEDADE IAPAR 59 ORIGINÁRIOS DE ÁRVORE E DO SOLO	41
5 CONCLUSÕES	44
REFERÊNCIAS	45
ANEXOS	49

RESUMO

O Brasil tem se tornado menos competitivo no mercado internacional devido a pior qualidade do café brasileiro em comparação ao café produzido em outros países. O café produzido no Estado do Paraná é atacado ou contaminado por vários fungos que alteram a qualidade da bebida. O objetivo geral do trabalho foi isolar fungos em grãos de café da variedade IAPAR 59 coletados de árvore e do solo de lavoura da cidade de Londrina, Estado do Paraná, e os objetivos específicos foram isolar e identificar os principais gêneros de fungos em grãos de café da variedade IAPAR 59 e determinar a principal origem (árvore e solo) de contaminação que possa estar contribuindo para a perda de qualidade de bebida. Os grãos de café foram coletados a cada 15 dias do solo e de árvores. Os grãos de árvore e do solo foram secos separadamente em caixas teladas. A prova da xícara foi realizada por classificadores especializados selecionados pelo IAPAR. Para o isolamento dos fungos dos grãos de café da variedade IAPAR 59 coletados de árvore e do solo utilizou-se três meios de cultura: BDA, Sabouraud e DRBC. Os grãos coletados do solo apresentaram um maior número de espécies de fungos isoladas em relação aos de árvore. A bebida perdeu qualidade em função do tempo de permanência dos grãos na árvore. O meio BDA apresentou a maior frequência de fungos isolados em relação aos outros meios e *Aspergillus ochraceus* deve ser uma das principais espécies envolvidas na alteração da qualidade de bebida.

Palavras-chave: IAPAR 59; qualidade de bebida; *Aspergillus ochraceus*; *Coffea arabica*.

1 INTRODUÇÃO

As primeiras sementes de café chegaram ao Brasil no início do século XVIII trazidas da Guiana Francesa. De lá para cá, a cafeicultura espalhou-se pelo sudeste, Paraná e Bahia. Atualmente, o Brasil ocupa o 7º lugar entre os principais países exportadores de produtos agrícolas e o primeiro lugar entre os países produtores de café (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2004).

A área colhida de café no Brasil em 2003 correspondeu a 2.405.300 hectares (ha) e a produção foi de 1.970.000 toneladas (t), com um rendimento médio de 819 kg/ha. Em 2003, em relação às lavouras permanentes, a de café possuiu a maior área colhida (2.405.300 ha), seguida pela lavoura de laranja (819.000 ha) e de castanha de caju (674.000 ha). Em relação à produção das lavouras permanentes em 2003, a que mais produziu foi a de laranja (16.903.000 t), seguida da banana (6.775.000 t) e café (1.970.000 t). A quantidade de café exportado em 2003 foi de 1.445.000 t, correspondendo a 1.070 US\$/t. A previsão para a safra de 2004/2005 é de 1.341 US\$/t. O café brasileiro é exportado principalmente na forma não torrado, seguida de solúvel e torrado (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2004).

O Paraná possuía em 2003 um parque cafeeiro de 123.200 ha com 315.000.000 cafeeiros. A previsão para a safra de 2004/2005 em relação ao parque cafeeiro é de uma redução de 3,7%, ou seja, de 123.200 ha para 118.700 ha. Já o número de cafeeiros deve sofrer um aumento de 2,2%, ou seja, de 315.000.000 para 322.000.000 cafeeiros. A redução na área plantada deve-se a um aumento na substituição do café por outras culturas. A safra de 2003 no Paraná foi de 1.970.000 sacas beneficiadas, com uma produtividade de 15,99 sacas/ha. A previsão de safra para 2004/2005 é de 2.550.000 sacas beneficiadas, com uma produtividade de 21,48 sacas/ha (CONAB, 2004).

Para que o café possa ser valorizado comercialmente, utilizam-se critérios de características específicas de aroma e sabor, ou seja, melhorando-se a qualidade do produto, aumenta-se a concorrência com outros países exportadores (KRUG, 1947). A qualidade da bebida de café pode ser influenciada por vários fatores tais como: pluviosidade; temperatura; umidade; variedade cultivada; manejo de colheita e pós-colheita; e por fungos e bactérias.

Os fungos são o principal objeto de estudo deste trabalho por serem os principais agentes na alteração da qualidade da bebida. Pretendeu-se com este trabalho, portanto, isolar os fungos presentes em grãos de café da variedade IAPAR 59, originários de árvore e solo, visando identificá-los e correlacioná-los com a qualidade da bebida durante o tempo de coleta.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos principais países exportadores de café do mundo. Sua safra 2003/2004 correspondeu a 28,82 milhões de sacas em uma área plantada de 2,2 milhões de hectares. O faturamento com a exportação de 1,43 milhão de toneladas desta safra foi de US\$ 1,51 bilhão. Com isto, o Brasil detém 28% do mercado mundial de café em grão "in natura" (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2004).

O Paraná é o quarto maior estado produtor de café do Brasil. Sua produção final na safra 2003/2004 foi de 1,97 milhão de sacas em uma área de 123.200 hectares. Isto corresponde a 6,83% da produção brasileira total de café na safra 2003/2004 (CONAB, 2004).

Em vista disso, várias pesquisas estão sendo realizadas para buscar uma melhoria na qualidade da bebida de café. Este aumento na qualidade contribui para um melhor posicionamento do café brasileiro no mercado externo com um conseqüente aumento na exportação e preço da saca.

2.2 FATORES CLIMÁTICOS

Os fatores climáticos estão fortemente relacionados à produtividade da lavoura cafeeira. O melhor clima para a cultura do café é aquele em que durante a época da florada dos cafezais a chuva é intensa, favorecendo a brotação dos frutos, e durante a época da colheita a chuva é escassa, impedindo que os fungos fermentem os grãos, o que garante um processo de maturação mais longo. Além disso, temperaturas inferiores a 18°C para o café arábica provocam uma baixa diferenciação floral, o que prejudica a produtividade. A identificação das condições climáticas de uma região permite encontrar zonas homogêneas para a cultura do café. Existem 3 classes de aptidão climática: apta, quando as condições térmicas e hídricas são favoráveis à cafeicultura; restrita, quando a região possui restrição térmica ou hídrica; inapta, quando as condições térmicas e hídricas não são favoráveis à cafeicultura (EVANGELISTA et al., 2002).

A pluviosidade é um fator determinante para o desenvolvimento dos grãos de café. As chuvas geralmente coincidem com a fase de expansão dos

grãos, que ocorre no período de novembro a fevereiro. Nas outras épocas do ano, uma complementação com irrigação artificial se faz necessária, devido à menor intensidade das chuvas. O tamanho do fruto é sensível ao déficit hídrico, sendo que o tamanho final do grão cereja depende diretamente da precipitação ocorrida no período de 10 - 17 semanas após o florescimento. Este período é conhecido como período de expansão máxima dos frutos. A deficiência hídrica pode ser benéfica apenas no período correspondente à dormência dos botões florais, entre os meses de julho e setembro, uma vez que condiciona um florescimento abundante após chuvas ou irrigações no final da fase, provocando uma frutificação e maturação uniformes na safra seguinte (KARASAWA et al., 2002).

2.3 QUALIDADE DA BEBIDA

As pesquisas realizadas na década de 40 sobre café tentavam explicar a origem dos cafés duros, buscando uma padronização para o café (tipo, peso e medida) e uma melhor preparação do café depois de colhido para o preparo dos *blends*¹. Entre essas pesquisas destacam-se as realizadas por Krug (1940 e 1947) onde ele atribui a alteração na qualidade da bebida de café à ação dos fungos. Além disso, relaciona o tempo de permanência dos frutos no chão com o aumento na porcentagem de fungos encontrados no interior dos grãos (KRUG, 1940). Fora a presença dos fungos, outros fatores alteram a qualidade da bebida, tais como: umidade, temperatura, altitude, tipo de solo, pluviosidade, estágio do fruto quando a colheita é realizada, processo de fermentação, etc., sendo estes de menor importância. Os fungos alteram a qualidade da bebida principalmente nos cafés provenientes de varrição, ou seja, aqueles provenientes da amontoa do café caído naturalmente ou derriçado² no chão (KRUG, 1947).

Tendo os trabalhos de Krug (1940 e 1947) como referência básica, diversos autores desenvolveram suas pesquisas. Um aspecto bastante estudado é a colheita e o manejo pós-colheita, uma vez que o tempo de exposição dos frutos aos microrganismos altera a qualidade da bebida. Os

¹ *Blend*: união de sacas de café provenientes de diversas regiões do país, realizada, geralmente, no porto de Santos (CAMARGO, 1947).

² Derriça é a derrubada manual dos frutos.

microrganismos podem iniciar a infecção com o fruto ainda na planta e persistir após a colheita, até mesmo em parte do período de secagem dos grãos. A fermentação provocada pelos microrganismos ocasiona a degradação de membranas e paredes celulares, alterando os compostos químicos dos grãos, resultando em odor e sabor desagradáveis (FAVARIN et al., 2004). Além disso, o processo de estabelecimento e crescimento dos microrganismos pode ser facilitado por fatores ambientais, tais como elevada umidade e temperatura. Essas condições aceleram o processo de senescência dos frutos e o processo de estabelecimento de microrganismos (PAULA et al., 1984).

Quando o grão de café encontra-se no estágio cereja, sua polpa apresenta elevada concentração de açúcares, o que a torna atrativa não apenas para microrganismos como também para insetos. Assim, os insetos perfuram a epiderme dos frutos para se alimentarem e para procriarem. Após a perfuração da epiderme pelos insetos, a entrada de microrganismos fica facilitada, permitindo o início da fermentação dos grãos antes da colheita dos frutos, deteriorando a qualidade da bebida (CAMARGO, 1947).

De acordo com o padrão da bebida, ela pode ser classificada em: Estritamente Mole, bebida de sabor suavíssimo e adocicado; Mole, bebida de sabor suave, acentuado e adocicado; Apenas Mole, bebida de sabor suave, com leve adstringência; Dura, bebida com sabor adstringente e gosto áspero; Riada, bebida com leve sabor de iodofórmio ou ácido fênico; Rio, bebida com sabor forte e desagradável lembrando iodofórmio ou ácido fênico; Rio Zona, bebida de sabor e odor intoleráveis ao paladar e ao olfato (PINTO, 2001).

A qualidade da bebida é definida após a fermentação e torração dos grãos. A bebida tipo Rio ocorre, principalmente em cafeeiros no Rio de Janeiro, Minas Gerais, Zona da Mata e noroeste do Espírito Santo, afetando 20-25% do café brasileiro. Spadone et al. (1990) analisou grãos de café tipo Rio constatando a freqüente infestação por fungos (*Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Rhizopus*, etc.) e bactérias (*Lactobacillus*, *Streptococcus*). Avaliou ainda substâncias voláteis de grãos de café saudáveis e verdes para detectar qual componente era responsável pelo odor característico da bebida tipo Rio. O composto 2,4,6 – tricloroanisol (TCA) foi considerado como sendo o principal responsável pelo odor característico da bebida tipo Rio.

A microbiota associada aos grãos de café é bastante diversificada e está diretamente relacionada a alguns sabores e aromas característicos da bebida. Alguns gêneros bastante frequentes são: *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus* e *Cladosporium*. Nas bebidas tipo Rio e riada, a infecção por *Aspergillus* é elevada, o que pode estar relacionado com a taxa de umidade superior a 10% encontrada nestes grãos beneficiados. Nos cafés de bebida mole a infecção pelo gênero *Aspergillus* é menor (PIMENTA E CHALFOUN, 2001).

O desenvolvimento da bebida Rio zona em função do tempo de permanência dos frutos na lavoura é outro aspecto bastante abordado nas pesquisas sobre a qualidade da bebida. Em regiões de inverno úmido a importância do estudo sobre o aparecimento da bebida Rio zona ocorre porque essas condições são favoráveis ao desenvolvimento de microrganismos. Estes microrganismos produzem compostos orgânicos que propiciam o surgimento do sabor desagradável ao paladar (CARNEIRO FILHO et al., 2001).

2.4 COMPOSTOS ORGÂNICOS

Vários trabalhos vêm sendo realizados para detectar quais compostos orgânicos produzidos pelos fungos são capazes de alterar a qualidade da bebida de café. Entre estes compostos orgânicos estão os compostos fenólicos, açúcares totais e açúcares redutores e não redutores. A concentração de cada um desses compostos varia de acordo com o tipo de bebida, com a bebida tipo Rio apresentando o maior teor de polifenóis, as bebidas tipo estritamente mole e riada apresentando os maiores teores de açúcares totais e não redutores e a bebida tipo estritamente mole também apresentando o maior teor de açúcares redutores (PINTO et al., 2001).

O composto 2,4,6 – tricloroanisol (TCA) é uma das principais causas de contaminação em alimentos fechados não hermeticamente e crus. O TCA provoca um intenso odor de mofado nos alimentos e bebidas. Este é um problema comum nos containeres de carga, provocando a contaminação dos alimentos. Os clorofenóis presentes no chão dos containeres são metilados em TCA pela ação de fungos (HILL et al., 1995). O TCA, além disso, é considerado o principal agente contribuidor para o aparecimento da bebida tipo Rio (SPADONE et al., 1990).

2.5 MICOTOXINAS

Outro fator importante são as micotoxinas, metabólitos secundários tóxicos produzidos por algumas espécies de fungos. Dependendo da quantidade em que são ingeridas, podem produzir efeitos tóxicos, no homem e em animais. A produção de micotoxinas está relacionada ao crescimento do fungo; sem o crescimento, geralmente, a produção de micotoxinas não ocorre. A produção de micotoxinas é influenciada por alguns fatores, tais como: 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. Dentre as micotoxinas, as 5 principais são: aflatoxinas, ocratoxinas, toxina T2, deoxinivalenol (DON) e fumonisinas (GONÇALEZ et al., 2001).

Segundo um trabalho publicado por Rodríguez-Amaya e Sabino (2002) sobre as pesquisas realizadas no Brasil referentes a micotoxinas entre os anos de 1991-2000, houve um ampliação e aprofundamento nos temas das pesquisas desenvolvidas. Enquanto que entre os anos de 1961-1990 se estudava apenas as aflatoxinas, a partir de 1990 outras micotoxinas também passaram a ser estudadas. Trabalhos referentes a métodos analíticos e estudos micológicos continuam sendo bastante freqüentes, mas cada vez mais vêm dando espaço a estudos sobre prevenção e controle da contaminação fúngica e produção de micotoxinas. Fatores que possam influir na produção de micotoxinas, tais como, resistência de genótipos, conteúdo/atividade de água, umidade relativa, temperatura, presença de metais, tipo de solo, infestação de insetos e o potencial antagônico de outros microrganismos contra os fungos produtores de micotoxinas também foram estudados.

Um gênero de fungo conhecido pela produção de micotoxinas é *Fusarium*, um produtor da enzima galactose oxidase. As micotoxinas produzidas pelo gênero *Fusarium* são: moniliformina, ácido fusárico, deoxinivalenol (DON), fusarenona-X (FX), nivalenol (NIV), 3-acetildeoxinivalenol (ADON), neosolaniol (NEO), zearalenol (ZEOH), zearalenona (ZEA), acetil T-2 e iso T-2. O estudo das micotoxinas produzidas pelo gênero *Fusarium* é importante devido ao papel de destaque do gênero para a agricultura e saúde (PEREIRA E KEMMELMEIER, 2000).

É conhecido que certas espécies de fungos, especialmente *Aspergillus ochraceus* e *Penicillium verrucosum*, produzem substâncias tóxicas. A mais importante delas é a ocratoxina A, que é uma substância contaminante de alimentos. Em seu trabalho, Pimenta e Vilela (2003) não encontraram indícios da presença de ocratoxina A em grãos de frutos de café submetidos a diferentes tempos em repouso antes da secagem. O estudo tanto de espécies com e sem potencial ocratoxigênico é de grande importância para a compreensão dos mecanismos e interações da produção de ocratoxina A por fungos em grãos de café. *Aspergillus niger var. niger* é uma das poucas espécies reconhecidas como sendo de baixa toxicidade e considerada como GRAS (*generally regarded as safe*³) pela FDA (*Food and Drug Administration*). Seu possível efeito inibitório sobre a produção de ocratoxina A foi testado em isolados de *Aspergillus* da seção *Circumdati*. Em todos os isolados houve uma redução na produção de ocratoxina A na presença do filtrado do fungo inibidor, *Aspergillus niger var. niger*. Isto o torna promissor como um possível meio de eliminar as micotoxinas em substratos como grãos de café (NASSER et al., 2003).

A ocratoxina A pode ser encontrada em café verde, torrado e moído, solúvel e em bebidas de café. A ocratoxina A possui, no homem, ação nefrotóxica, teratogênica, carcinogênica, imunossupressora e está relacionada com a nefropatia endêmica dos Balcãs, doença degenerativa dos rins que afeta exclusivamente a população adulta rural. Em alguns países europeus o nível máximo de ocratoxina A foi delimitado em 5 µg/kg em cereais e 1 µg/kg em alimentos destinados a crianças. No Brasil ainda não foram adotadas medidas semelhantes (PRADO et al., 2000).

2.6 DOENÇAS DO CAFEEIRO

Outro aspecto que pode influenciar fortemente a produção cafeeira são as doenças. Várias doenças podem acometer esta cultura, desde o viveiro até o armazenamento. Além disso, dependendo da região produtora as doenças são o principal motivo pela baixa produtividade. Essas doenças afetam a produção cafeeira não apenas quantitativamente, mas também

³ *Generally regarded as safe*: geralmente reconhecido como seguro

qualitativamente. Elas estão relacionadas ao tipo de cultura, ao patógeno, à localidade, ao ambiente e às medidas de controle. Com isso, é importante que os cafeicultores utilizem a diagnose correta para buscarem o melhor tratamento para suas lavouras (GARCIA JÚNIOR et al., 2003).

As doenças que atingiam a cultura do café antes do surgimento da ferrugem no Brasil não provocavam grandes perdas econômicas, apenas reduziam a produção do cafeeiro. Atualmente, mesmo com a presença das doenças, cultivares mais produtivos garantem que a redução na produção não seja tão significativa. As principais doenças do cafeeiro são: ferrugem; cercosporiose ou mancha de olho pardo; mancha aureolada; e phoma. A ferrugem é provocada pelo fungo *Hemileia vastatrix* (Berk et Br). Ela ataca as folhas do cafeeiro, produzindo manchas amarelas e alaranjadas que, com o desenvolvimento da doença, assumem um aspecto pulverulento na face inferior e clorose na face superior. A disseminação dos uredosporos na lavoura ocorre principalmente pelo respingo das gotas durante as chuvas, por insetos, animais e, em longas distâncias, pelo homem e pelo vento. A ferrugem provoca uma redução de 20 a 30% na produção de café por hectare (ALMEIDA, 1984).

A cercosporiose ou mancha de olho pardo é provocada pelo fungo *Cercospora coffeicola* (Berk et Cooke). A cercosporiose ataca principalmente plantas com deficiência nutricional em nitrogênio. As lesões provocadas são extremamente características, sendo circulares nas folhas, de cor pardo-clara, com um pequeno círculo branco-acinzentado no centro. Este pequeno círculo possui pontuações escuras correspondentes aos corpos de frutificação do fungo. A lesão é envolvida por um pequeno círculo amarelo. A cercosporiose provoca também lesões deprimidas e marrom-claro nos frutos, além de ocasionar a queda prematura dos mesmos (ALMEIDA, 1984).

A mancha aureolada é provocada pela bactéria *Pseudomonas garçae*. Suas lesões são pardo-escuras, de área irregular e envolvidas por um anel amarelo. A área necrosada no centro da lesão geralmente se rompe, ficando um furo em seu lugar. Nas folhas novas, a lesão não apresenta o anel amarelo. O desenvolvimento da bactéria é favorecido por fatores como ventos frios e umidade elevada (ALMEIDA, 1984).

O phoma é provocado pelo fungo *Phoma* spp.. Nas folhas, as lesões assumem coloração marrom e formam anéis concêntricos. Nos ramos, são

deprimidas e de cor marrom. E, nos frutos, circulares, deprimidas e com pontuações negras correspondentes às frutificações do fungo. O desenvolvimento do fungo é favorecido por temperaturas baixas, excesso de umidade e vento (ALMEIDA, 1984).

Em seu artigo sobre o gênero *Fusarium*, Torres (2000) cita que algumas espécies do gênero podem ser usadas no controle biológico de algumas espécies de fungos que provocam doenças nas plantas. As doenças provocadas por este gênero incluem: murcha vascular, manchas e escurecimento das folhas, apodrecimento das raízes e apodrecimento de frutos, grãos e sementes. Entre as espécies de *Fusarium*, a que causa maior prejuízo econômico é *F. oxysporum*. Esta espécie possui alta especialização em relação aos hospedeiros, um grande número de patotipos, sendo que as formas não patogênicas são mais competitivas que as formas patogênicas.

Em seu trabalho, Gichuru et al. (2000), cita como principal perigo econômico nas lavouras cafeeiras africanas a doença do grão de café (CBD)⁴. Esta doença surgiu no Quênia em 1922 e desde então se espalhou por todo o continente africano, não atingindo outros continentes até o momento. O fungo causador da CBD é o *Colletotrichum kahawae*. Como existe uma variação genética entre os isolados de *C. kahawae* coletados de diferentes partes do continente africano, faz-se necessário estudar a variabilidade genética deste gênero. O método utilizado foi a compatibilidade vegetativa de grupos, onde a compatibilidade vegetativa é evidenciada pela habilidade das hifas de diferentes fungos se fundirem (anastomose) e formar um heterocário funcional e estável dividindo o material genético do núcleo assim introduzido. Como esta é a única maneira de troca genética em fungos assexuados, isolados que possuem compatibilidade vegetativa possuem o mesmo alelo em cada *locus* incompatível, assim a relação entre vários *loci* pode ser avaliada. A compatibilidade vegetativa de grupos pode ser usada para diferenciar isolados em patotipos e origem geográfica.

O desenvolvimento de doenças em lavouras depende da interação entre 3 fatores: hospedeiro, patógeno e condições ambientais. Muitas dessas doenças ocorrem devido a interações entre patógenos do solo e nematodos.

⁴ Doença do grão de café: *coffee berry borer*

As doenças provocadas por nematodos parasitas de plantas e microrganismos do solo formam um complexo sinérgico⁵. Os nematodos mais comuns envolvidos em complexos de doenças são: *Globodera*, *Heterodera*, *Meloidogyne*, *Rotylenchulus* e *Pratylenchus*. Esses gêneros interagem normalmente com os seguintes gêneros de fungos: *Fusarium*, *Verticillium*, *Pythium*, *Phytophthora* e *Rhizoctonia*. Esta interação faz com que a produtividade da lavoura seja prejudicada. Em seu trabalho, Back et al. (2002), citam que *Fusarium oxysporum* provocou aumento na necrose da raiz e clorose nas folhas de cafeeiros onde as plantas foram inoculadas 2 ou 4 semanas antes com *Meloidogyne incognita* (Nematoda).

2.7 PRAGAS DO CAFEEIRO

As pragas do cafeeiro variam de acordo com a região cafeeira do país, sendo o bicho mineiro, a broca-do-café e as cochonilhas pragas recorrentes em todas as regiões cafeeiras brasileiras. O controle dessas pragas é feito por meio de produtos químicos, como inseticidas, sendo o controle biológico pouco utilizado (IBC/GERCA, 1985).

A broca-do-café (*Hypothenemus hampei*) (Ferrari, 1867) (Coleoptera: Scolytidae) é a praga mais importante nas plantações de café. Ela é originária do continente africano e foi introduzida no continente americano no início do século XX. No seu novo habitat ela não encontrou inimigos naturais, com exceção do fungo *Beauveria bassiana*. *Beauveria bassiana* é o principal fator de mortalidade da broca-do-café nos países africanos e nos países do continente americano onde ela se espalhou. Devido à escassez de estudos sobre inimigos naturais da broca-do-café no continente americano, Bustillo et al. (2002) desenvolveu uma pesquisa para detectar novos inimigos naturais na região colombiana. Entre seus resultados ele encontrou 5 espécies de fungos e 2 gêneros de bactérias infectando a broca-do-café. Os fungos encontrados foram: *Beauveria bassiana*, *Hirsutella eleutheratorum*, *Metarhizium anisopliae*, *Fusarium oxysporum* e *Paecilomyces lilacinus*. Dentre essas espécies a que provoca maior mortalidade na broca-do-café é *Beauveria bassiana*. Os gêneros de bactérias encontradas foram: *Bacillus* sp. e *Serratia* sp..

⁵ Complexo sinérgico: interação entre dois ou mais agentes ou forças cujo efeito combinado é maior que a soma de seus efeitos individuais.

Em uma tentativa de controle biológico da broca-do-café nas décadas de 30 e 40 utilizou-se o microhimenóptero *Prorops nasuta* (Waterston, 1923) (Hymenoptera: Bethyridae), conhecido como “vespa de Uganda”. Esta vespa foi introduzida no Brasil em 1929, mas devido às dificuldades de criação, multiplicação e adaptação seu uso como controle biológico foi abandonado. Outros dois microhimenópteros são parasitas da broca-do-café, no entanto, não ocorrem no Brasil, são eles: *Heterospilus coffeicola* (Schm., 1923) (Hymenoptera: Braconidae) e *Cephalonomia stephanoderes* (Betrem, 1961) (Hymenoptera: Bethyridae). Além dos microhimenópteros, a broca-do-café é também afetada por fungos entomopatogênicos, como: *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill, *Spicaria javanica* (Bally) e *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin, sendo o primeiro e o último de alta eficiência no controle da broca-do-café (IBC/GERCA, 1985).

Entre os mais de 800 insetos encontrados nas lavouras de café, a broca-do-café é a única espécie que desenvolveu a capacidade de utilizar os grãos de café como recurso na alimentação. Isto é um fato curioso, uma vez que existem vários registros da toxicidade da cafeína para os insetos. A cafeína pode ser considerada como uma substância alcalóide que defende a planta contra o ataque de herbívoros. A capacidade da broca-do-café em utilizar o grão de café como recurso alimentar de maneira satisfatória decorre, não apenas, de particularidades biológicas da família Scolytidae, mas também, de um mecanismo de detoxificação⁶ que está ausente na maioria das espécies que não sobrevivem nos grãos de café. Em seu trabalho, Vega et al. (2003), encontraram leveduras dentro de brocas-do-café. Leveduras são conhecidas como endosimbiontes de insetos, e, em alguns casos, elas atuam na detoxificação de toxinas de plantas ou produzem enzimas que atuam na digestão do material alimentar.

Ao contrário do bicho mineiro (*Perileucoptera coffeella*), que é um inseto monófago, a broca-do-café (*Hypothenemus hampei*) é um inseto polífago (IBC/GERCA, 1985). Entre as famílias vegetais em que a reprodução e alimentação da broca-do-café foi observada, estão: Rubiaceae e Fabaceae. Entre as famílias em que apenas reprodução foi observada, estão: Poaceae e

⁶ Detoxificação: processo metabólico no qual as propriedades de um veneno ou toxina são reduzidas pelo corpo.

Dioscoreaceae. E, entre as famílias em que alimentação foi observada, estão: Capparidaceae, Passifloraceae, Rosaceae, Euphorbiaceae, Malvaceae, Convolvulaceae e Oleaceae (DAMON, 2000).

Várias espécies de vespas parasitas utilizam seus hospedeiros tanto como recurso alimentar como para oviposição. A decisão do parasita em utilizar o hospedeiro como fonte de alimento ou para oviposição depende de uma série de fatores, como, estado fisiológico do parasita, atraso na maturação dos ovos, estado nutricional, expectativa de vida e qualidade e quantidade do hospedeiro. *Cephalonomia stephanoderes* (Hymenoptera: Bethyridae) é parasita da broca-do-café, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). Quando eclodem, os ovários das fêmeas ainda não possuem ovos maduros e é necessário que as fêmeas se alimentem do hospedeiro para que os oócitos amadureçam. As fêmeas agem como predadoras durante o período de pré-oviposição e antes do período de oviposição ocorre paralisia permanente da broca-do-café (LAUZIÈRE et al., 1999).

2.8 CAFÉS ARMAZENADOS

Segundo Pimenta e Vilela (2003), para aquelas pessoas que trabalham com grãos armazenados, é muito importante entender como, onde e por que os fungos crescem. Para que um armazenamento seja considerado bom é necessário prevenir o surgimento de fungos. Estes variam de acordo com fatores como umidade, altitude, região, etc., e, geralmente, invadem a semente antes da colheita.

Uma maneira de se evitar o surgimento de fungos em cafés armazenados é reduzir o teor de umidade dos grãos de café abaixo de 15% (PRADO et al., 2000).

Em trabalho com cafés lavados submetidos a diferentes tempos de amontoa no terreiro antes da secagem, Pimenta e Vilela (2003) perceberam um aumento na infecção por *Aspergillus* sp., *Cladosporium* sp., e *Fusarium* sp. com um maior tempo de amontoa, enquanto *Penicillium* sp. não mostrou uma tendência definida.

3 MATERIAL E MÉTODOS

As sementes analisadas foram coletadas na Estação Experimental pertencente ao Instituto Agrônômico do Paraná (IAPAR) localizada na cidade de Londrina. De acordo com a classificação de Köppen o clima regional é identificado como Cfa, sempre úmido com verão quente. Os dados climáticos referentes à temperatura média, umidade relativa média e precipitação foram obtidos junto à Estação Meteorológica do SIMEPAR em Londrina.

As sementes de café da variedade IAPAR 59 analisadas pertencem à safra 2003/2004. Esta é uma variedade resistente à ferrugem. O experimento iniciou-se em 22/07/2003 com a retirada de todos os frutos cereja de 200 cafeeiros da lavoura da Estação Experimental do IAPAR. Os cafeeiros foram divididos em quatro parcelas com 10 plantas cada uma. A cada 15 dias foram coletados dessas parcelas os frutos cereja das árvores e os frutos que caíram no solo, totalizando sete tempos de coleta. Os frutos coletados de árvore e do solo foram secos separadamente ao sol em caixas teladas até atingirem a umidade de 12%. Em seguida foram beneficiados e guardados em embalagens de papel para serem analisados. A metodologia para secagem, beneficiamento e armazenamento dos grãos foi desenvolvida pelos técnicos da Estação Experimental do IAPAR.

Após a secagem e beneficiamento dos grãos, realizou-se a prova da xícara com classificadores especializados. A classificação do café é realizada de acordo com o aroma e sabor da bebida, sendo uma prova subjetiva. A prova foi realizada com um número variável de defeitos, como se observa na tabela 1 a seguir. Os defeitos do café dizem respeito às impurezas presentes em sua bebida, tais como: paus, pedras, cascas, ardidos, verdes, etc.

Os grãos de café coletados foram separados em 52 amostras divididas em quatro repetições, cada repetição contando, portanto, com 13 amostras. A primeira amostra recebeu um tratamento específico para cada uma das repetições. Estas estão indicadas pelos códigos 1 A, 1 B, 1 C e 1 D e os tratamentos utilizados foram café seco, café de varrição, maduro e verde, respectivamente. Os grãos foram coletados apenas de árvores. Esta primeira amostra foi utilizada para se avaliar a qualidade de bebida de café nos diferentes tratamentos utilizados.

A partir da amostra de número 2 as coletas foram realizadas quinzenalmente, totalizando seis tempos de coleta. Os tratamentos utilizados para estas amostras foram coleta de frutos cereja de árvore e frutos caídos no solo. Assim, num mesmo tempo, foram realizadas coletas na árvore, indicadas pelos números pares e coletas no solo, indicadas pelos números ímpares. Estas amostras também foram submetidas a prova da xícara, visando relacionar a qualidade de bebida com os diferentes tempos de coleta. Além disso, nessas amostras também foram testadas as influências do tempo, meio de cultura e origem (árvore e solo) sobre os fungos.

TABELA 3 – TRATAMENTO UTILIZADO NAS AMOSTRAS POR TEMPO DE COLETA

Tempo	Número da amostra	Tratamento	Data da coleta	Número de defeitos
(Ensaio)	1A	Café seco	22/07/03	30
	1B	Café de varrição	22/07/03	40
	1C	Maduro	22/07/03	30
	1D	Verde	22/07/03	300
Tempo 0	2	Café de árvore	15/08/03	30
	3	Café do solo	15/08/03	40
Tempo 15	4	Café de árvore	01/09/03	30
	5	Café do solo	01/09/03	40
Tempo 30	6	Café de árvore	15/09/03	30
	7	Café do solo	15/09/03	40
Tempo 45	8	Café de árvore	30/09/03	30
	9	Café do solo	30/09/03	40
Tempo 60	10	Café de árvore	15/10/03	40
	11	Café do solo	15/10/03	60
Tempo 75	12	Café de árvore	31/10/03	50
	13	Café do solo	31/10/03	80

FONTE: IAPAR

Para o isolamento dos fungos dos grãos foram utilizados três meios de cultura: Agar BDA (Biobrás Diagnósticos – Montes Claros/MG), Agar Sabouraud a 4% de glucose (Merck KgaA – Darmstadt, Alemanha) e DRBC Agar (Dichloran - Rose Bengal - Chloramphenicol Agar / DIFCO, EUA).

Para o desenvolvimento dos fungos colocou-se cinco grãos por placa, totalizando 260 grãos por meio em 52 placas. Cada placa, portanto, representa uma amostra, sendo que treze delas compõem uma repetição. Após cinco dias de crescimento na estufa (26°C), procedeu-se a leitura das placas. Colônias iguais eram agrupadas com o mesmo código. Em seguida, as colônias foram isoladas em tubos de ensaio com meio Agar BDA inclinado, independentemente do meio em que se encontravam nas placas. Para o crescimento dessas colônias, os tubos foram mantidos em estufa (26°C) por uma semana.

Após a retirada dos tubos de ensaio da estufa, os mesmos foram repicados para placas de Petri e, após crescimento, agrupados sob o critério de semelhança morfológica de suas colônias. Realizou-se, então, a técnica do microcultivo em uma colônia de cada grupo morfológicamente análogo (KERN & BLEVINS, 1999).

Para a identificação dos fungos, foram utilizadas as lâminas de sete e 14 dias obtidas do microcultivo. A classificação foi realizada por meio da observação de corpos de frutificação ao microscópio óptico e da utilização de chaves de classificação (KLICH & PITT, 1988)(CHALFOUN & BATISTA, 2003)(BARNETT & HUNTER, 1987)(KLEIN & EVELEIGH, 1998).

As amostras foram previamente testadas em relação à presença de ocratoxina A com metodologia desenvolvida pelo IAPAR. As amostras foram recebidas com o resultado deste teste.

Para o cálculo referente à frequência de cada fungo utilizou-se os dados relativos ao número de grãos positivos, ou seja, aqueles grãos em que houve o crescimento dos fungos. A porcentagem relativa foi calculada através de uma regra de três simples, onde o número de grãos positivos está para 20 (número total de grãos na amostra experimento) assim como 100 está para a porcentagem relativa. Este cálculo foi utilizado para os grãos provenientes da amostra experimento. Para os grãos provenientes das amostras solo e árvore o número total de grãos por amostra foi 120, assim a regra de três simples ficou: o número de grãos positivos está para 120 (número total de grãos na amostra de origem solo) assim como 100 está para a porcentagem relativa. Este cálculo foi utilizado no isolamento dos fungos nos diferentes meios de cultura.

Com os dados referentes ao número de colônias por grão, número de colônias por placa e número de colônias por meio realizou-se a análise estatística. Os testes utilizados foram ANOVA (fatorial) e teste de Tukey para médias (PIMENTEL GOMES, 1990). Optou-se por realizar uma análise estatística para os fungos dos grãos coletados do solo e outra para os coletados de árvore devido a grande quantidade de fatores testados. A análise estatística utilizada foi ANOVA fatorial. O esquema fatorial para cada ANOVA foi 6 x 3 x 14 (6 tempos de estudo; 3 meios utilizados para o isolamento e 14 fungos identificados). O número de repetições foi quatro e os dados foram transformados em raiz $x + 2$ (PIMENTEL GOMES, 1990).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ISOLAMENTO DOS FUNGOS DOS GRÃOS DA VARIEDADE IAPAR 59 ORIGINÁRIOS DE ÁRVORE E DO SOLO

Após o crescimento e identificação dos fungos isolados dos grãos de café da variedade IAPAR 59 em cada um dos três meios de cultura testados (BDA, Sabouraud e DRBC), realizou-se a contagem do número absoluto destes fungos nos 780 grãos de café (TABELA 4).

TABELA 4 – NÚMERO ABSOLUTO DE FUNGOS ISOLADOS ORIGINÁRIOS DE ÁRVORE E DO SOLO NOS MEIOS BDA, SABOURAUD E DRBC

Fungos / Meios	BDA	Sabouraud	DRBC	Total
<i>Aspergillus flavus</i>	0	11	13	24
<i>Aspergillus fumigatus</i>	58	47	54	159
<i>Aspergillus ochraceus</i>	170	92	129	391
<i>Aspergillus sp</i>	0	0	1	1
<i>Botrytis sp</i>	23	29	0	52
Dematiáceo	5	0	9	14
<i>Drechslera sp</i>	1	0	0	1
<i>Fusarium sp</i>	4	5	0	9
Leveduras	57	14	22	93
<i>Mycelia sterilia</i>	1	6	3	10
<i>Penicillium chrysogenum</i>	116	19	0	135
<i>Rhizopus sp</i>	0	0	62	62
Sinêmio	0	0	3	3
<i>Trichoderma sp</i>	2	0	0	2
Total	437	223	296	956

O meio BDA apresentou um maior número de fungos isolados em relação aos outros dois meios. Provavelmente, isto ocorreu pelo fato dos meios Sabouraud e DRBC serem seletivos, o que pode ter criado algumas barreiras para o desenvolvimento de fungos menos exigentes, ou seja, estes meios devem apresentar substâncias que não podem ser degradadas por algumas espécies de fungos.

Como pode ser observado, os fungos encontrados em maior número absoluto foram: *Aspergillus ochraceus* (391 isolados), *Aspergillus fumigatus* (159) e *Penicillium chrysogenum* (135), e em menor número absoluto foram: *Aspergillus sp* (1) e *Drechslera sp* (1).

Em relação aos meios, *Aspergillus ochraceus* (170), *Penicillium chrysogenum* (116) e *Aspergillus fumigatus* (58) apresentaram maior número de isolados no meio BDA; *Aspergillus ochraceus* (92), *Aspergillus fumigatus* (47) e *Botrytis* sp (29) foram isolados em maior número no meio Sabouraud e *Aspergillus ochraceus* (129), *Rhizopus* sp (62) e *Aspergillus fumigatus* (54) apresentaram um maior número de isolados no meio DRBC.

Ainda em relação aos meios, *Drechslera* sp (1), *Mycelia sterilia* (1) e *Trichoderma* sp (2) foram isolados em menor número no meio BDA; *Fusarium* sp (5) no meio Sabouraud e *Aspergillus* sp (1) e *Mycelia sterilia* e sinêmio (3) no meio DRBC.

Estes resultados diferem um pouco daqueles obtidos por Pimenta e Chalfoun (2001) que encontraram uma maior ocorrência dos gêneros *Penicillium* sp, *Fusarium* sp e *Cladosporium* sp nos frutos colhidos no estágio cereja. Isto pode ter ocorrido devido a uma diferença metodológica, já que ao invés de colocarem os grãos em placas com meio de cultura para o isolamento dos fungos Pimenta e Vilela (2001) optaram por utilizar o método de *blotter*, que consiste na incubação dos frutos em placas de Petri de 8,5 cm de diâmetro, contendo duas folhas de papel filtro esterilizadas e umedecidas com água destilada esterilizada, sob condições de temperatura controlada (23°C) e 12 horas de luminosidade.

A relação entre o número absoluto de fungos e a origem dos grãos pode ser observada na tabela 5.

TABELA 5 – RELAÇÃO ENTRE NÚMERO ABSOLUTO DE FUNGOS ISOLADOS NOS MEIOS BDA, SABOURAUD E DRBC EM RELAÇÃO À ORIGEM ÁRVORE E SOLO

Fungo / Meio Origem	BDA		Sabouraud		DRBC		Total	
	Árvore	Solo	Árvore	Solo	Árvore	Solo	Árvore	Solo
<i>Aspergillus flavus</i>	0	0	9	2	1	12	10	14
<i>Aspergillus fumigatus</i>	20	38	17	30	21	33	58	101
<i>Aspergillus ochraceus</i>	87	83	45	47	71	58	203	188
<i>Aspergillus sp</i>	0	0	0	0	1	0	1	0
<i>Botrytis sp</i>	1	22	11	18	0	0	12	40
Dematiáceo	0	5	0	0	0	9	0	14
<i>Drechslera sp</i>	1	0	0	0	0	0	1	0
<i>Fusarium sp</i>	2	2	0	5	0	0	2	7
Leveduras	37	20	10	4	12	10	59	34
<i>Mycelia sterilia</i>	0	1	0	6	3	0	3	7
<i>Penicillium chrysogenum</i>	46	70	8	11	0	0	54	81
<i>Rhizopus sp</i>	0	0	0	0	15	47	15	47
Sinêmio	0	0	0	0	0	3	0	3
<i>Trichoderma sp</i>	0	2	0	0	0	0	0	2
Total	194	243	100	123	124	172	418	538

No total parcial das origens em cada um dos três meios e no total geral de cada origem, o número absoluto de isolados foi maior em grãos coletados do solo. Dos quatorze fungos isolados e identificados, dez apresentaram maior número absoluto total em grãos coletados do solo. Os quatro isolados que apresentaram maior número absoluto total em grãos coletados de árvore foram: *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus sp*, *Drechslera sp* e leveduras. Dos fungos isolados no meio BDA, os que apresentaram maior número absoluto de isolados em grãos coletados de árvore foram: *Aspergillus ochraceus*, *Drechslera sp* e leveduras. No meio Sabouraud, apresentaram maior número absoluto em grãos coletados de árvore, *Aspergillus flavus* e leveduras e no meio DRBC, aqueles que apresentaram maior número absoluto em grãos coletados de árvore foram *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus sp*, leveduras e *Mycelia sterilia*.

Não existem dados na literatura referentes à relação entre número absoluto de fungos coletados de árvore e do solo. Uma possível explicação para um número maior de fungos nos grãos coletados no solo seja a maior exposição desses grãos aos fatores climáticos, tais como chuva, umidade, orvalho, propiciando uma maior infecção dos grãos pelos fungos.

Os dados relativos à qualidade de bebida em relação ao tempo de coleta podem ser observados na tabela 6 (ANEXOS) e gráficos 1 e 2. A qualidade de bebida pode ser analisada através dos dados climáticos. Como pode ser observado nos gráficos 3 e 4, durante o período de estudo a média de temperatura foi de 20,1 °C, a média de umidade relativa foi de 69,8% e a precipitação foi de 187,6 mm.

O resultado da prova da xícara indicou uma alteração na qualidade da bebida de grãos coletados de árvore em relação ao tempo de coleta. De apenas mole a bebida passou a ser qualificada como dura. Já a bebida de grãos coletados do solo não apresentou uma variação significativa, sendo classificada como dura ao longo dos seis tempos de coleta.

GRÁFICO 1 – QUALIDADE DA BEBIDA DE CAFÉ DA VARIEDADE IAPAR 59 DE GRÃOS ORIGINÁRIOS DO SOLO NOS DIFERENTES TEMPOS DE COLETA

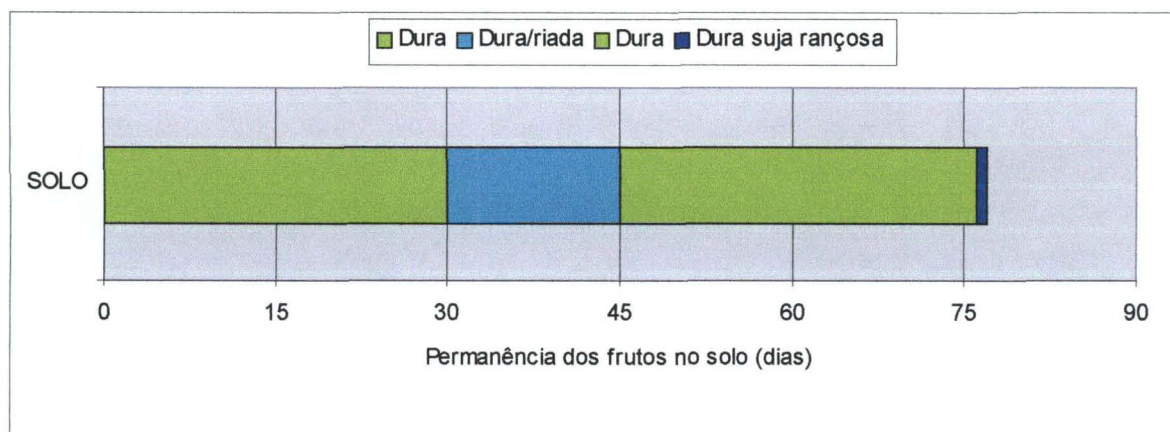


GRÁFICO 2 – QUALIDADE DA BEBIDA DE CAFÉ DA VARIEDADE IAPAR 59 DE GRÃOS ORIGINÁRIOS DE ÁRVORE NOS DIFERENTES TEMPOS DE COLETA

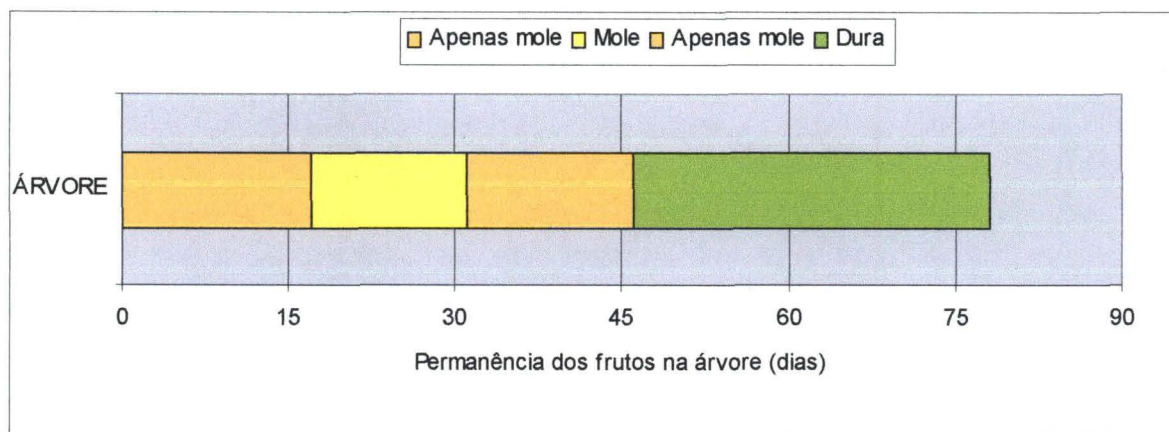


GRÁFICO 3 – TEMPERATURA MÉDIA E UMIDADE RELATIVA NA REGIÃO DE LONDRINA DURANTE O PERÍODO DE COLETA

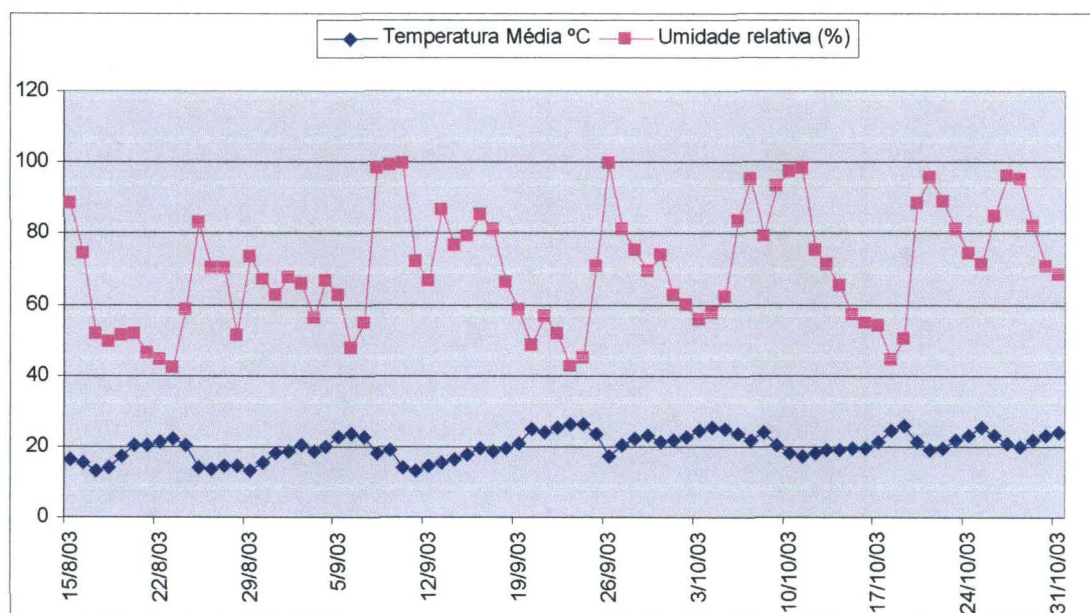
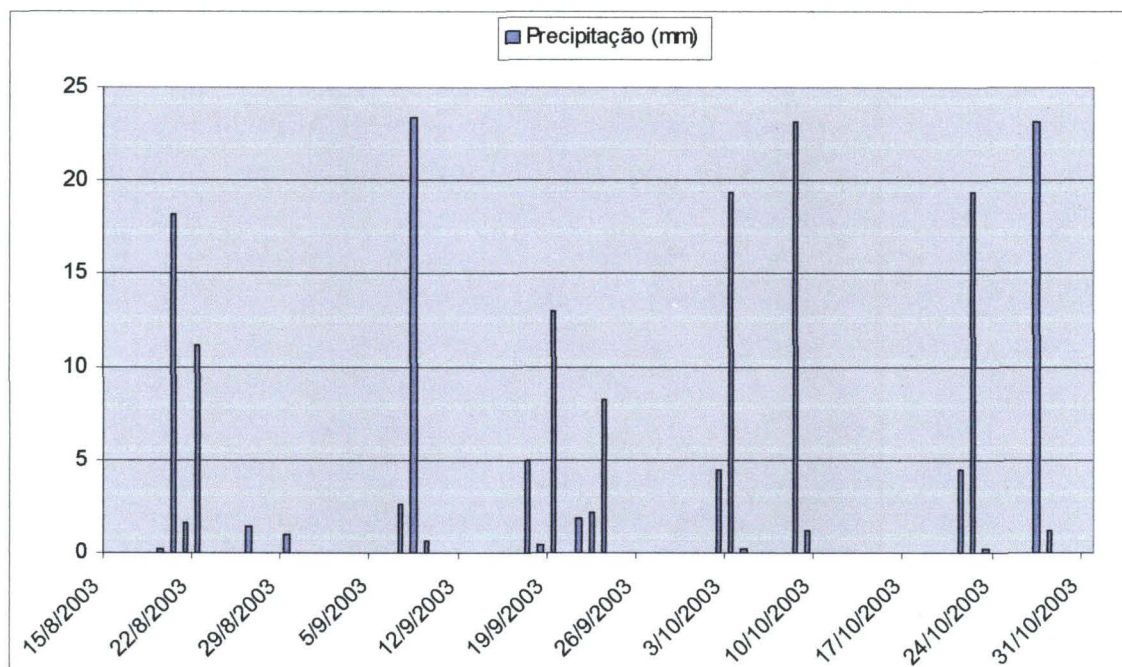


GRÁFICO 4 – PRECIPITAÇÃO NA REGIÃO DE LONDRINA DURANTE O PERÍODO DE COLETA



Na bebida originada dos grãos coletados de árvore observou-se que após 46 dias a qualidade de bebida passou de apenas mole para dura. Este resultado concorda com os obtidos por Carneiro Filho *et al* (2001). Em seu trabalho relacionando o tempo de permanência dos frutos na árvore com a qualidade de bebida, Carneiro Filho *et al* (2001) também obtiveram uma piora na qualidade de bebida, de apenas mole à dura, com um aumento no tempo de permanência dos frutos na árvore. Além disso, eles também observaram um período de aproximadamente um mês para que a qualidade de bebida passasse de apenas mole para uma bebida tipo dura.

A umidade relativa permaneceu bastante elevada na maior parte do tempo de estudo e as temperaturas permaneceram em torno dos 20 °C. A partir do tempo 15 dias, houve chuvas regulares entre os períodos de coleta. Sabe-se que os fungos costumam desenvolver-se em condições de umidade e calor elevados. A umidade elevada durante o período de estudo pode ter contribuído para um maior desenvolvimento de fungos com uma conseqüente piora na qualidade de bebida.

Na bebida de grãos coletados do solo a qualidade da bebida deixa a desejar. Isto ocorre porque com o passar do tempo os grãos do solo tornam-se mais sujeitos ao ataque de fungos, ainda mais em condições de calor e umidade elevada, como as observadas no período de estudo. Em um trabalho pioneiro, Krug (1940) obteve resultados semelhantes com a qualidade de bebida de grãos coletados do solo. Além disso, quando a fermentação provocada pelos fungos é prolongada, a infecção torna-se acentuada e inicia-se então a produção de compostos responsáveis pelos sabores desagradáveis (PIMENTA E VILELA, 2003). Assim sendo, deve-se evitar a utilização de grãos coletados do solo para o preparo da bebida de café uma vez que estes possuem uma pior qualidade devido a uma maior infecção por fungos.

O resultado para o teste de presença de ocratoxina A foi negativo para todas as amostras testadas. Pimenta e Vilela (2003) também não detectaram a presença de ocratoxina A em amostras de grãos de café submetidos a diferentes tempos em repouso antes da secagem. Isto pode ocorrer devido ao fato da ocratoxina A ser um metabólito secundário produzido por certos fungos em resposta às condições ambientais a que estão expostos. Assim, em um ambiente rico em nutrientes e com temperatura adequada não há produção de metabólitos secundários (GONÇALEZ et al., 2001).

4.2 ISOLAMENTO DOS FUNGOS DOS GRÃOS DA VARIEDADE IAPAR 59 EM MEIO BDA, SABOURAUD E DRBC ORIGINÁRIOS DA AMOSTRA EXPERIMENTO

Os resultados obtidos para os fungos isolados da amostra experimento em meio BDA, Sabouraud e DRBC podem ser observados na tabela 7, 8 e 9 (ANEXOS) e gráficos 5, 6 e 6.

GRÁFICO 5 – PORCENTAGEM DE FUNGOS ISOLADOS EM MEIO BDA DE GRÃOS DA VARIEDADE IAPAR 59 EM RELAÇÃO AO TRATAMENTO

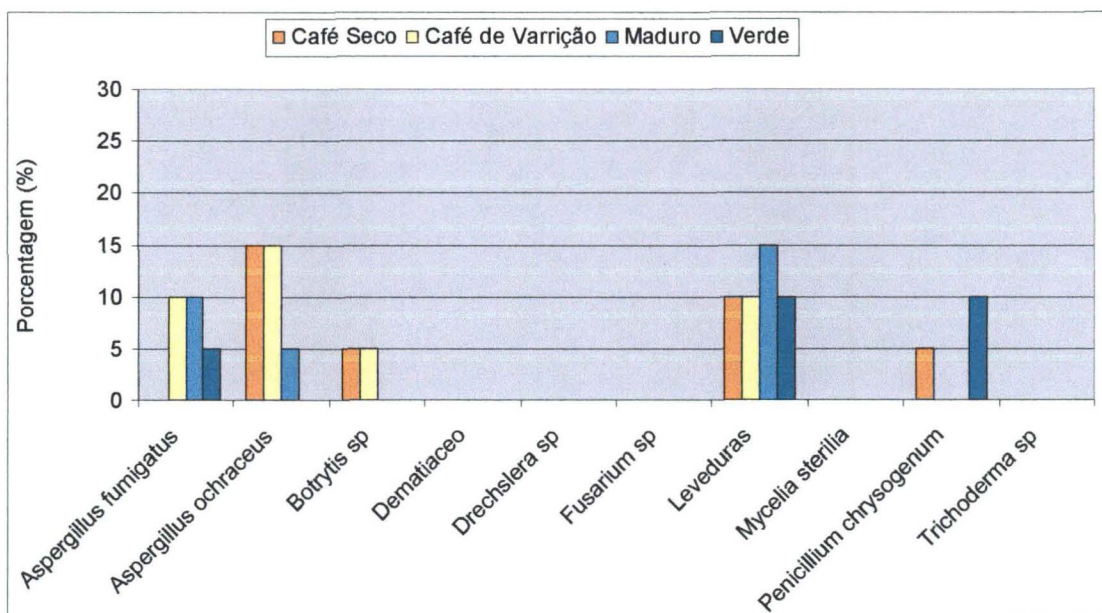


GRÁFICO 6 – PORCENTAGEM DE FUNGOS ISOLADOS EM MEIO SABOURAUD DE GRÃOS DA VARIEDADE IAPAR 59 EM RELAÇÃO AO TRATAMENTO

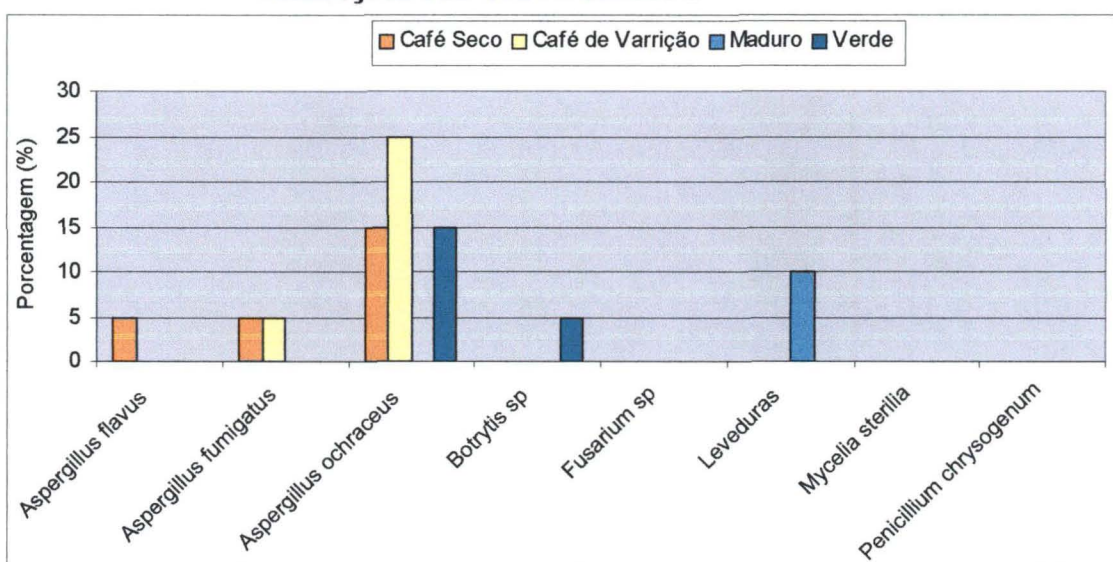
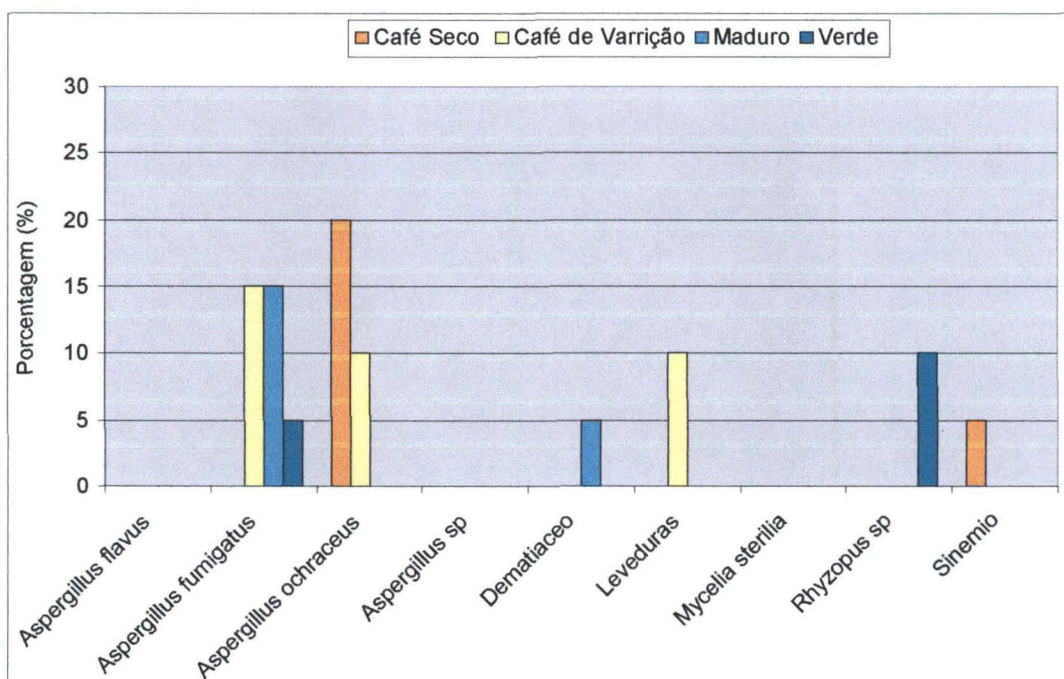


GRÁFICO 7 – PORCENTAGEM DE FUNGOS ISOLADOS EM MEIO DRBC DE GRÃOS DA VARIEDADE IAPAR 59 EM RELAÇÃO AO TRATAMENTO



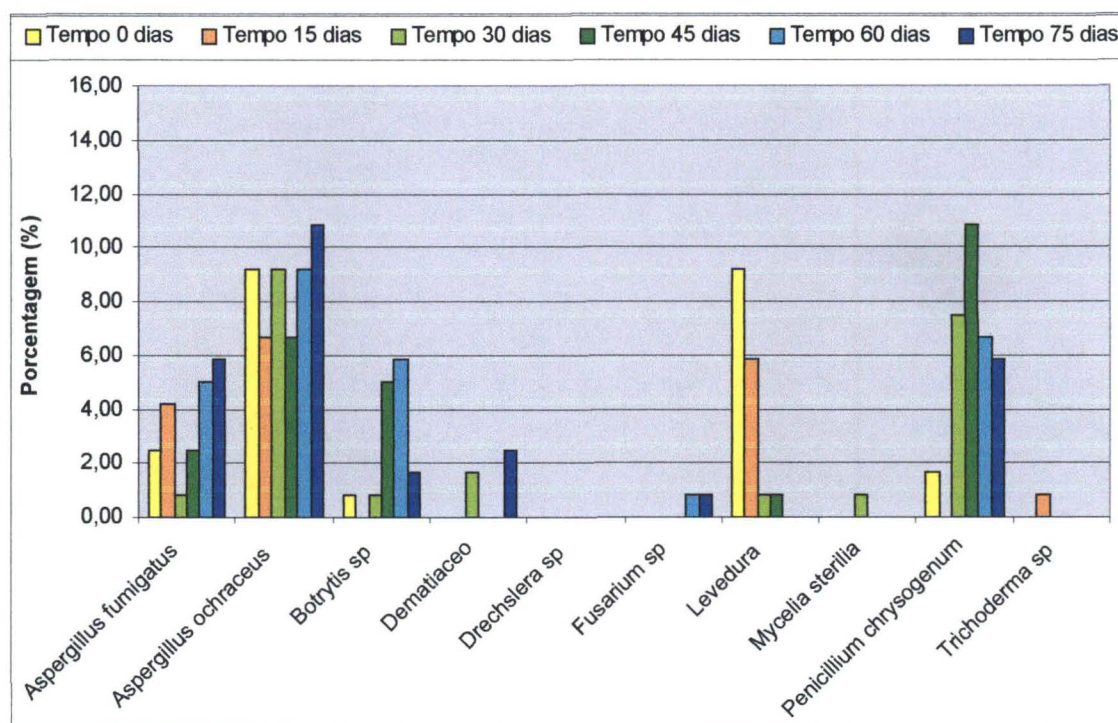
O tratamento café seco apresentou maior porcentagem de isolados de *Aspergillus ochraceus* nos três meios em que foi testado. O tratamento café de varrição apresentou maior porcentagem de isolados de *Aspergillus ochraceus* nos meios BDA e Sabouraud e no meio DRBC de *Aspergillus fumigatus*. O tratamento maduro apresentou maior porcentagem de isolados de *Trichoderma* sp em BDA, leveduras em Sabouraud e *Aspergillus fumigatus* em DRBC. O tratamento verde também apresentou maior porcentagem de isolados de *Trichoderma* sp em BDA, *Aspergillus ochraceus* em Sabouraud e *Rhizopus* sp em DRBC.

Em relação à qualidade de bebida todos os tratamentos apresentaram uma bebida tipo dura. A presença em grande quantidade do gênero *Aspergillus* nestes tratamentos pode ser um indicativo de que este gênero esteja envolvido na piora da qualidade de bebida.

4.3 ISOLAMENTO EM MEIO BDA DOS FUNGOS DOS GRÃOS DA VARIEDADE IAPAR 59 ORIGINÁRIOS DE ÁRVORE E DO SOLO

Os resultados obtidos para os fungos isolados do solo em meio BDA podem ser observados na tabela 10 (ANEXOS) e gráfico 8.

GRÁFICO 8 – PORCENTAGEM DE FUNGOS ISOLADOS EM MEIO BDA DE GRÃOS DA VARIEDADE IAPAR 59 COLETADOS DO SOLO EM RELAÇÃO AO TEMPO



O tempo com o maior número de espécies foi o tempo 30 dias, com sete espécies diferentes de fungos. Em seguida ocorreram: tempo 75 dias, com seis espécies; tempos 0, 45 e 60 dias, com cinco espécies; e tempo 15 dias com quatro espécies. O grande número de espécies encontradas no tempo 75 dias deve-se a uma exposição prolongada dos grãos no solo, o que aumenta a possibilidade de infecção por fungos devido a maior exposição aos fatores climáticos.

No tempo zero, a maior frequência foi de *Aspergillus ochraceus* (9,17%) e leveduras (9,17%) enquanto que a menor frequência foi de *Botrytis sp* (0,83%). No tempo 15 a maior frequência foi de *Aspergillus ochraceus* (6,67%) e a menor de *Trichoderma sp* (0,83%). No tempo 30 a maior frequência foi de *Aspergillus ochraceus* (9,17%) e a menor de *Botrytis sp*, *Aspergillus fumigatus*,

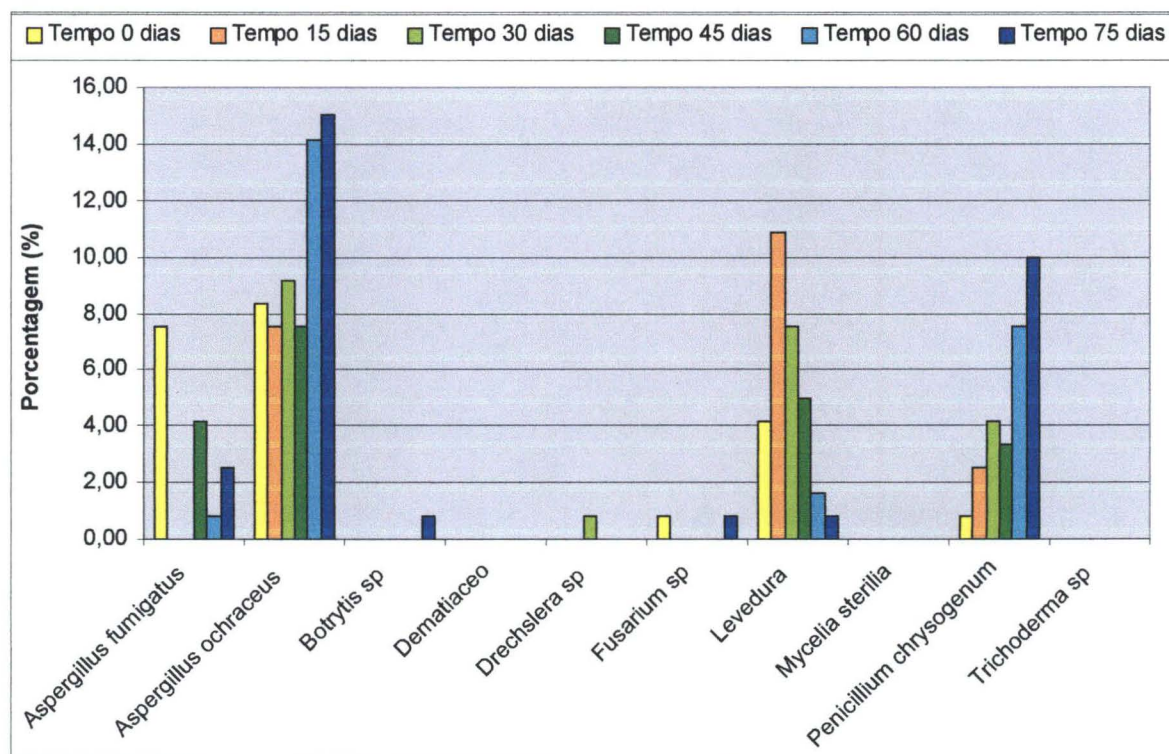
Mycelia sterilia e levedura todos com 0,83%. No tempo 45 a maior frequência foi de *Penicillium chrysogenum* (10,83%) e a menor de leveduras (0,83%). No tempo 60 a maior frequência foi de *Aspergillus ochraceus* (9,17%) e a menor de *Fusarium sp* (0,83%). E no tempo 75 a maior frequência foi de *Aspergillus ochraceus* (10,83%) e a menor de *Fusarium sp* (0,83%).

Aspergillus ochraceus demonstrou uma tendência em aumentar sua frequência nos tempos finais de estudo. Isto pode indicar uma maior participação deste fungo nos processos fermentativos que alteram a qualidade da bebida de café. Este resultado concorda com o obtido por Pimenta e Vilela (2003), que também observaram uma maior infecção por *Aspergillus ochraceus* com o passar dos dias. *Penicillium chrysogenum* aumentou sua frequência até o tempo 45 dias, mostrando uma redução nos dois últimos tempos. Este resultado também concorda com o obtido por Pimenta e Vilela (2003). A alta frequência de leveduras no tempo 0 dias pode estar relacionada com o processo fermentativo dos grãos de café, o que piora a qualidade da bebida.

Aspergillus fumigatus e *Aspergillus ochraceus* estão presentes nos seis tempos de estudo. *Botrytis sp* e *Penicillium chrysogenum* estão presentes em cinco dos seis tempos. As leveduras estão presentes em quatro dos seis tempos. Fungos dematiáceos e *Fusarium sp* estão presentes em dois tempos. *Trichoderma sp* e *Mycelia sterilia* estão em um dos tempos e *Drechslera sp* não estava presente nos grãos coletados do solo. Isto pode indicar que *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus ochraceus*, por participarem dos processos fermentativos dos grãos de café possam estar interferindo significativamente na qualidade de bebida de café.

Os resultados obtidos para os fungos isolados de árvore estão na tabela 11 (ANEXOS) e gráfico 9.

GRÁFICO 9 - PORCENTAGEM DE FUNGOS ISOLADOS EM MEIO BDA DE GRÃOS DA VARIEDADE IAPAR 59 COLETADOS DE ÁRVORE EM RELAÇÃO AO TEMPO



O tempo com o maior número de espécies foi o tempo 75 dias, com seis espécies diferentes de fungos. Em seguida ocorreram: tempo 0 dias com cinco espécies; tempos 30, 45 e 60 dias com quatro espécies; e tempo 15 dias com três espécies. Novamente, a maior permanência dos frutos na árvore os torna mais suscetíveis aos fatores climáticos, propiciando uma maior infecção por parte dos fungos.

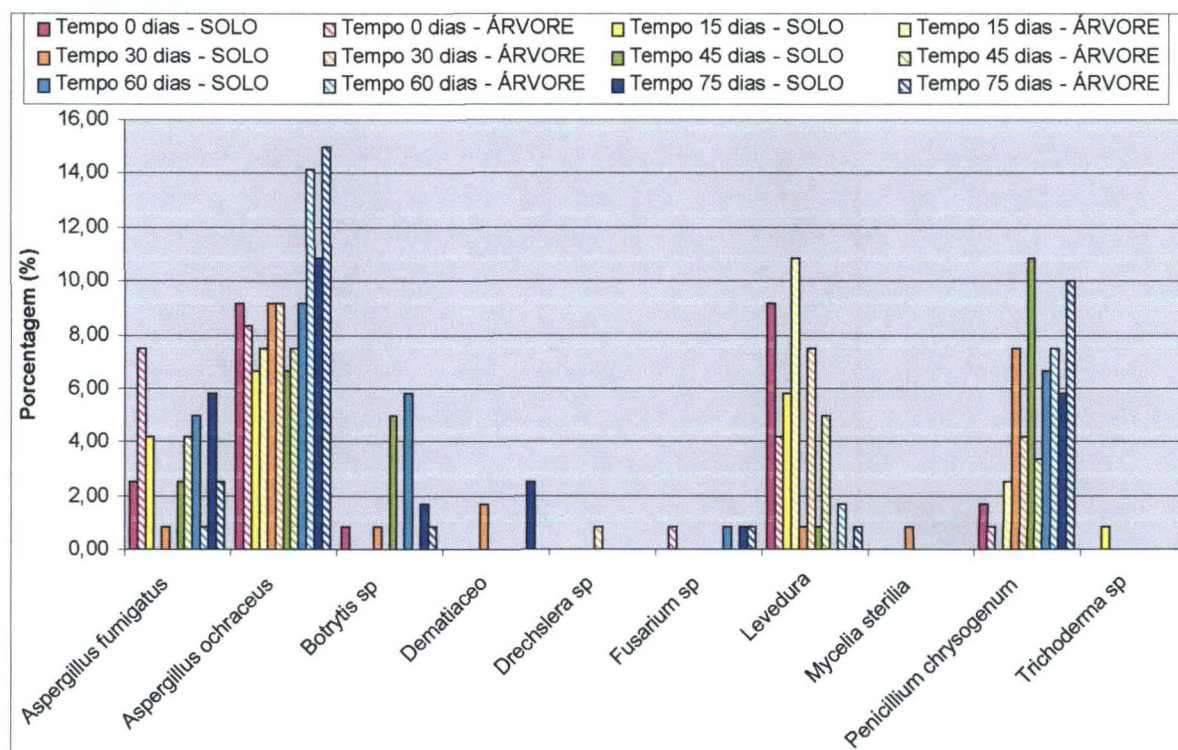
No tempo zero, a maior frequência foi de *Aspergillus ochraceus* (8,33%) enquanto que a menor frequência foi de *Penicillium chrysogenum* e *Fusarium sp* (0,83%). No tempo 15 a maior frequência foi de leveduras (10,83%) e a menor de *Penicillium chrysogenum* (2,50%). No tempo 30 a maior frequência foi de *Aspergillus ochraceus* (9,17%) e a menor de *Drechslera sp* (0,83%). No tempo 45 a maior frequência foi de *Aspergillus ochraceus* (7,50%) e a menor de *Aspergillus fumigatus* (4,17%). No tempo 60 a maior frequência foi de *Aspergillus ochraceus* (14,17%) e a menor de *Aspergillus fumigatus* (0,83%). E no tempo 75 a maior frequência foi de *Aspergillus ochraceus* (15,00%) e a menor de *Botrytis sp*, *Fusarium sp* e de leveduras (0,83%).

Os dados obtidos dos grãos coletados de árvore não diferem daqueles obtidos dos grãos coletados do solo. *Aspergillus ochraceus* demonstrou nos grãos coletados de árvore a mesma tendência em aumentar sua infecção com o passar dos dias assim como *Penicillium chrysogenum*. Apesar de *Aspergillus* ser um gênero que atua no processo fermentativo dos grãos alterando conseqüentemente a qualidade de bebida, para os grãos coletados de árvore a qualidade da bebida foi boa para os tempos 0, 15 e 30 dias, provavelmente pela menor infecção por *Aspergillus* nestes tempos em relação aos outros. A tendência mostrada pelas leveduras nos grãos coletados de árvore é semelhante àquela observada nos grãos coletados do solo. Elas sofreram um aumento até o tempo 15 dias com uma acentuada redução nos tempos seguintes. Não existem dados na literatura referentes à porcentagem de fungos isolados de grãos coletados de árvores que possam corroborar estes resultados.

Aspergillus ochraceus, *Penicillium chrysogenum* e leveduras estão presentes nos seis tempos de estudo. *Aspergillus fumigatus* está presente em quatro dos seis tempos. *Fusarium* sp está presente em dois dos seis tempos. *Botrytis* sp e *Drechslera* sp estão presentes em um dos tempos e *Mycelia sterilia*, *Trichoderma* sp e fungo dematiáceo não estavam presentes nos grãos coletados de árvore. A presença de *Aspergillus ochraceus* e leveduras em todos os tempos de estudo pode estar relacionada à piora na qualidade de bebida sofrida com o passar do tempo.

Aspergillus ochraceus foi o único microrganismo presente em todos os tempos nos grãos coletados de árvore e do solo. *Mycelia sterilia*, *Trichoderma* sp e fungo dematiáceo desenvolveram-se apenas nos grãos coletados do solo enquanto *Drechslera* sp desenvolveu-se apenas nos grãos coletados de árvore. O gráfico 10 mostra a porcentagem de grãos positivos em comparação nos grãos coletados de árvore e solo.

GRÁFICO 10 – PORCENTAGEM DE FUNGOS ISOLADOS EM MEIO BDA DE GRÃOS DA VARIEDADE IAPAR 59 COLETADOS DE ÁRVORE E DO SOLO EM RELAÇÃO AO TEMPO

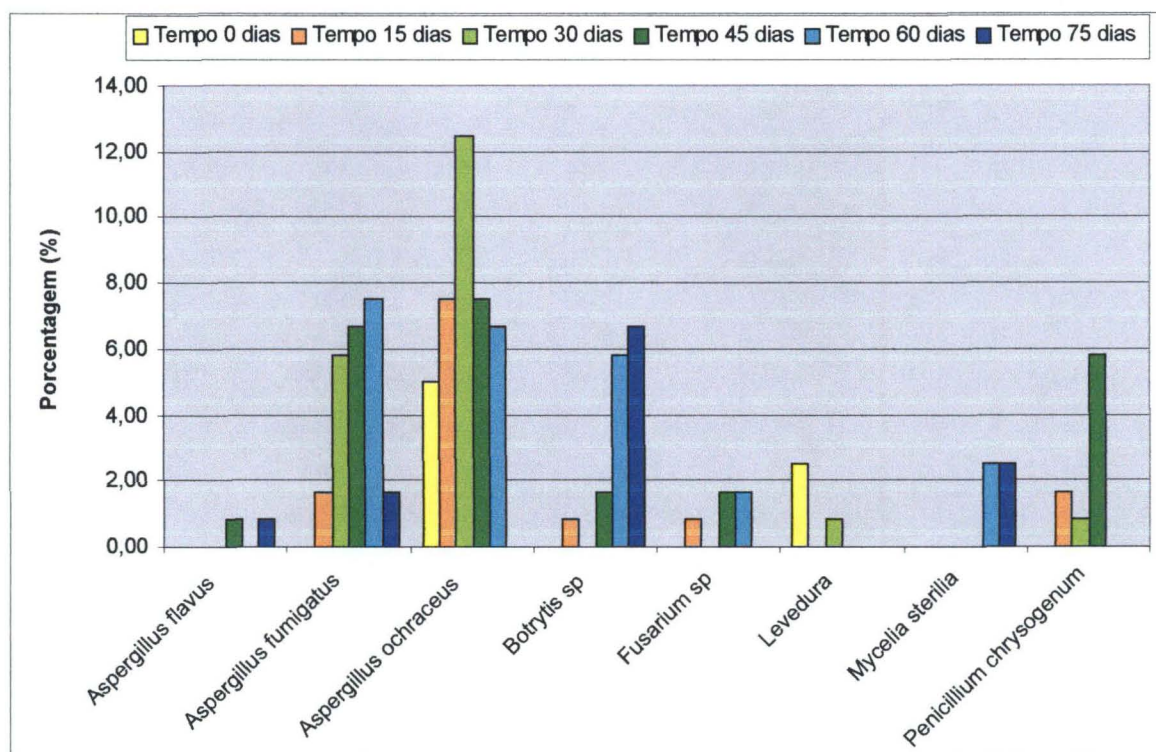


Por estarem presentes na maior parte dos tempos de estudo, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus ochraceus*, Leveduras e *Penicillium chrysogenum* podem ser os agentes responsáveis por alterar a qualidade da bebida de café.

4.4 ISOLAMENTO EM MEIO SABOURAUD DOS FUNGOS DOS GRÃOS DA VARIEDADE IAPAR 59 ORIGINÁRIOS DE ÁRVORE E DO SOLO

Os resultados obtidos para os fungos isolados do solo em meio Sabouraud podem ser observados na tabela 12 (ANEXOS) e gráfico 11.

GRÁFICO 11 – PORCENTAGEM DE FUNGOS ISOLADOS EM MEIO SABOURAUD DE GRÃOS DA VARIEDADE IAPAR 59 COLETADOS DO SOLO EM RELAÇÃO AO TEMPO



Tendo como base a tabela 12 (ANEXOS) e o gráfico 11, pode-se observar que o tempo com o maior número de espécies foi o tempo 45 dias, com seis espécies diferentes de fungos. Em seguida ocorreram: tempos 15 e 60 dias, com cinco espécies; tempos 30 e 75 dias, com quatro espécies; e tempo 0 dias com duas espécies. O tempo 75 dias apresentou um número um pouco menor de espécies em relação ao tempo 45 dias provavelmente devido ao meio utilizado para o isolamento dos fungos. Não existem relatos na literatura quanto à utilização do meio Sabouraud para o isolamento de fungos de grãos originados de árvore e solo.

No tempo zero, a maior frequência foi de *Aspergillus ochraceus* (5,00%) enquanto que a menor frequência foi de leveduras (2,50%). No tempo 15 a

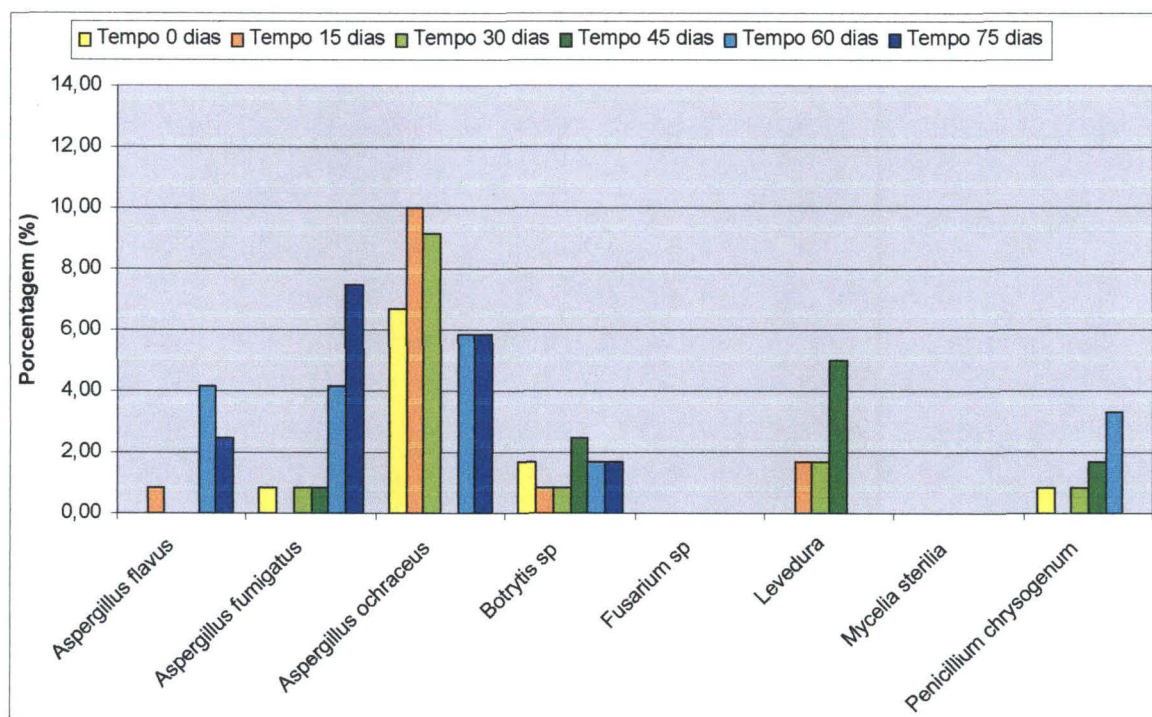
maior frequência foi de *Aspergillus ochraceus* (7,50%) e a menor de *Botrytis* sp e *Fusarium* sp ambos com 0,83%. No tempo 30 a maior frequência foi de *Aspergillus ochraceus* (12,50%) e a menor de *Penicillium chrysogenum* e leveduras ambos com 0,83%. No tempo 45 a maior frequência foi de *Aspergillus ochraceus* (7,50%) e a menor de *Aspergillus flavus* (0,83%). No tempo 60 a maior frequência foi de *Aspergillus fumigatus* (7,50%) e a menor de *Fusarium* sp (1,67%). E no tempo 75 a maior frequência foi de *Botrytis* sp (6,67%) e a menor de *Aspergillus flavus* (0,83%).

Aspergillus ochraceus apresentou uma tendência diversa daquela apresentada no meio BDA. Até o tempo 30 dias sofreu um aumento na sua frequência com uma conseqüente queda na frequência nos tempos seguintes. Leveduras e *Penicillium chrysogenum* também demonstraram uma tendência diferente neste meio em relação ao anterior, apresentando baixas frequências de infecção. Apesar da tendência diferenciada *Aspergillus ochraceus* deve ser aqui também o principal agente alterador da qualidade de bebida de café por estar presente em todos os tempos com frequências consideráveis e por estar relacionado a fermentação dos grãos. Não há dados na literatura que possam corroborar estes dados.

Aspergillus fumigatus e *Aspergillus ochraceus* estão presentes em cinco dos seis tempos de estudo. *Botrytis* sp está presente em quatro dos seis tempos. *Fusarium* sp e *Penicillium chrysogenum* estão presentes em três dos seis tempos. Leveduras, *Mycelia sterilia* e *Aspergillus flavus* estão presentes em dois tempos dos seis tempos de estudo.

Os resultados obtidos nos grãos coletados de árvore estão na tabela 13 (ANEXOS) e gráfico 12.

GRÁFICO 12 – PORCENTAGEM DE FUNGOS ISOLADOS EM MEIO SABOURAUD DE GRÃOS DA VARIEDADE IAPAR 59 COLETADOS DE ÁRVORE EM RELAÇÃO AO TEMPO



Os tempos com o maior número de espécies foram os tempos 30 e 60 dias, com cinco espécies diferentes de fungos. Todos os outros tempos (0, 15, 45 e 75 dias) apresentaram quatro espécies. Os tempos 30 e 60 dias apresentaram uma maior diversidade de fungos em relação aos outros tempos provavelmente devido ao meio utilizado.

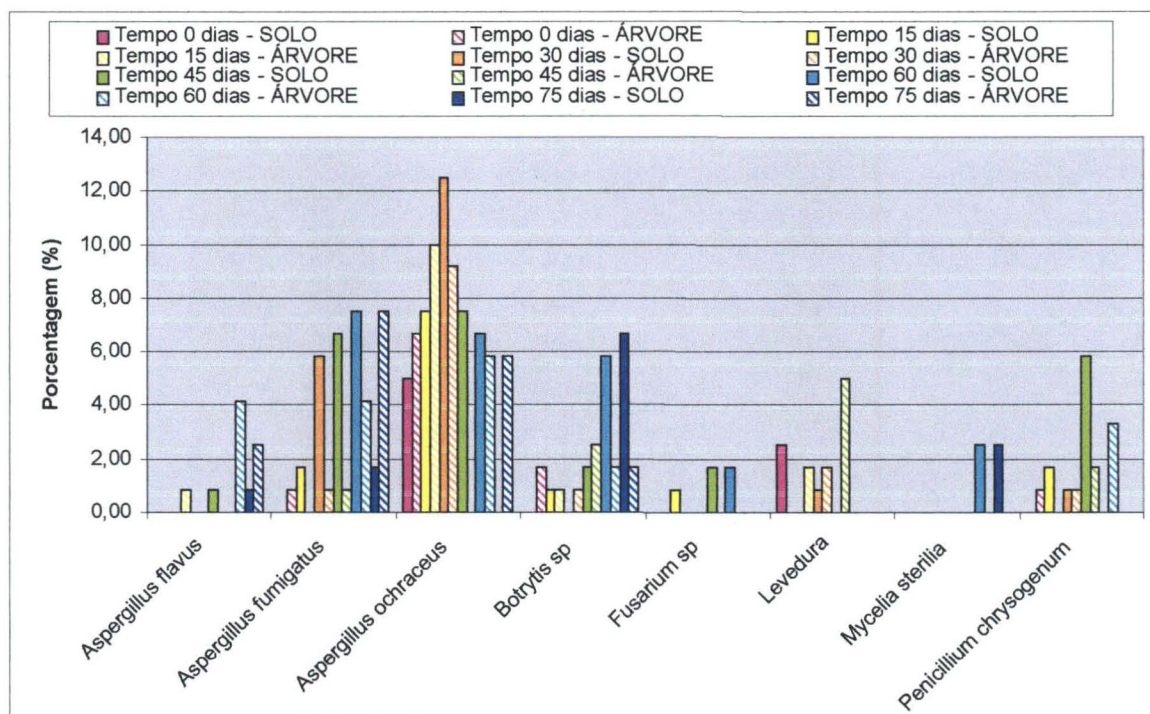
No tempo zero, a maior frequência foi de *Aspergillus ochraceus* (6,67%) enquanto que a menor frequência foi de *Penicillium chrysogenum* e *Aspergillus fumigatus* (0,83%). No tempo 15 a maior frequência foi de *Aspergillus ochraceus* (10,00%) e a menor de *Botrytis sp* e *Aspergillus flavus* (0,83%). No tempo 30 a maior frequência foi de *Aspergillus ochraceus* (9,17%) e a menor de *Botrytis sp*, *Penicillium chrysogenum* e *Aspergillus fumigatus* (0,83%). No tempo 45 a maior frequência foi de leveduras (5,00%) e a menor de *Aspergillus fumigatus* (0,83%). No tempo 60 a maior frequência foi de *Aspergillus ochraceus* (5,83%) e a menor de *Botrytis sp* (1,67%). E no tempo 75 a maior frequência foi de *Aspergillus fumigatus* (7,50%) e a menor de *Botrytis sp* (1,67%).

Aspergillus ochraceus demonstrou uma tendência semelhante àquela observada nos grãos coletados do solo. A princípio sofreu um aumento até o tempo 15 dias e conseqüentemente uma queda nos tempos seguintes. Esta tendência é diferente daquela observada no meio BDA, onde *Aspergillus ochraceus* aumentava sua freqüência com o passar dos dias. Leveduras e *Penicillium chrysogenum* apresentaram baixa freqüência neste meio, ao contrário do observado no meio BDA. *Aspergillus ochraceus* além de ser responsável pela fermentação dos frutos de café ele esteve presente em freqüências consideráveis na maioria dos tempos de estudo. Este fato concorda com os resultados obtidos no meio BDA, indicando *Aspergillus ochraceus* como uma espécie fundamental para a alteração na qualidade de bebida de café.

Botrytis sp está presente nos seis tempos de estudo. *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus ochraceus* estão presentes em cinco dos seis tempos. *Penicillium chrysogenum* está presente em quatro dos seis tempos. Levedura e *Aspergillus flavus* estão presentes em três tempos. *Mycelia sterilia* e *Fusarium* sp não estavam presentes na amostra de origem árvore.

Nenhum fungo esteve presente em todos os tempos nos grãos coletados de solo e de árvore. *Fusarium* sp e *Mycelia sterilia* desenvolveram-se apenas na origem solo. O gráfico 13 mostra a porcentagem de grãos positivos em comparação nos grãos coletados de árvore e de solo.

GRÁFICO 13 – PORCENTAGEM DE FUNGOS ISOLADOS EM MEIO SABOURAUD DE GRÃOS DA VARIEDADE IAPAR 59 COLETADOS DO SOLO E DE ÁRVORE EM RELAÇÃO AO TEMPO

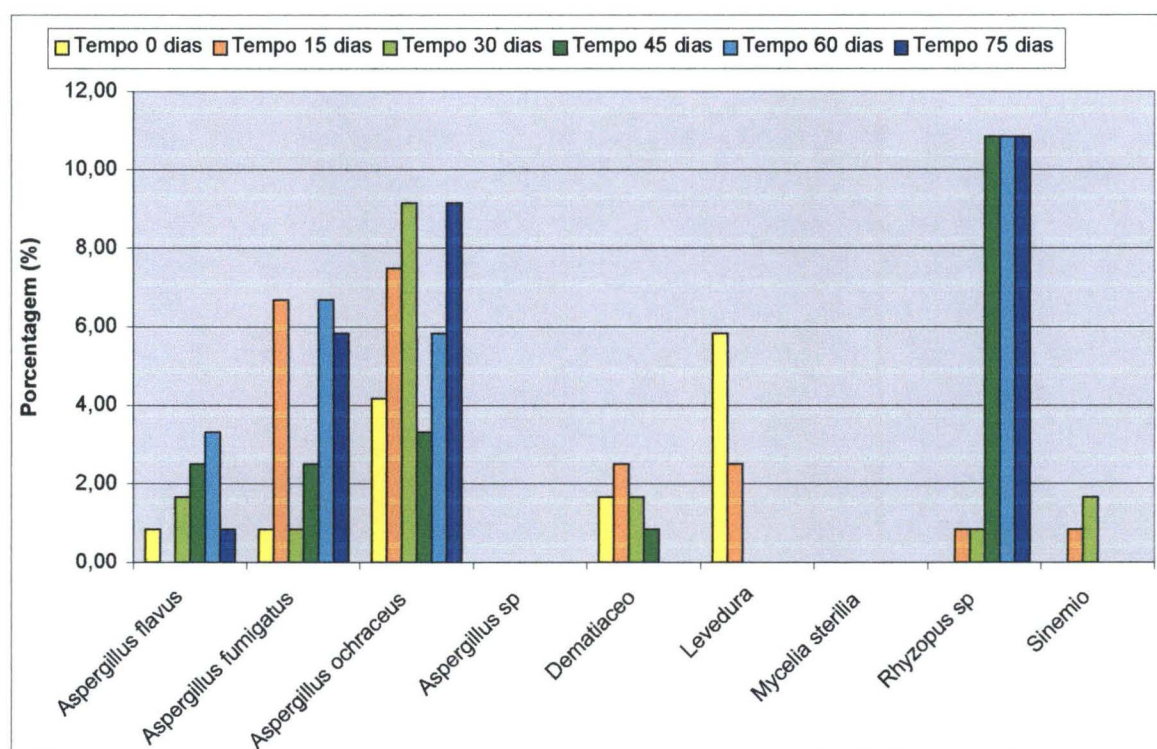


Por estarem presentes em quase todos os tempos de estudo, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus ochraceus* e *Penicillium chrysogenum* podem estar relacionados à piora na qualidade da bebida do café, o que concorda com o resultado obtido no meio BDA.

4.5 ISOLAMENTO EM MEIO DRBC DOS FUNGOS DOS GRÃOS DA VARIEDADE IAPAR 59 ORIGINÁRIOS DE ÁRVORE E DO SOLO

Os resultados obtidos para os fungos isolados do solo em meio DRBC podem ser observados na tabela 14 (ANEXOS) e gráfico 14.

GRÁFICO 14 – PORCENTAGEM DE FUNGOS ISOLADOS EM MEIO DRBC DE GRÃOS DA VARIEDADE IAPAR 59 COLETADOS DO SOLO EM RELAÇÃO AO TEMPO



Tendo como base a tabela 14 (ANEXOS) e o gráfico 14, pode-se observar que os tempos com o maior número de espécies foram os tempos 15 e 30 dias, com seis espécies diferentes de fungos. Em seguida vieram os tempos 0 e 45 dias com cinco espécies; e tempos 60 e 75 dias, com quatro espécies. Nos grãos coletados do solo no meio DRBC houve uma tendência em redução no número de espécies de fungos com o passar do tempo. Este resultado é diferente do encontrado no meio BDA e, talvez por ser o DRBC um meio enriquecido, ele pode selecionar o crescimento de alguns fungos.

No tempo zero, a maior frequência foi de levedura (5,83%) enquanto que a menor frequência foi de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus fumigatus* (0,83%). No tempo 15 a maior frequência foi de *Aspergillus ochraceus* (7,50%) e a menor de *Rhizopus sp* e sinêmio ambos com 0,83%. No tempo 30 a maior

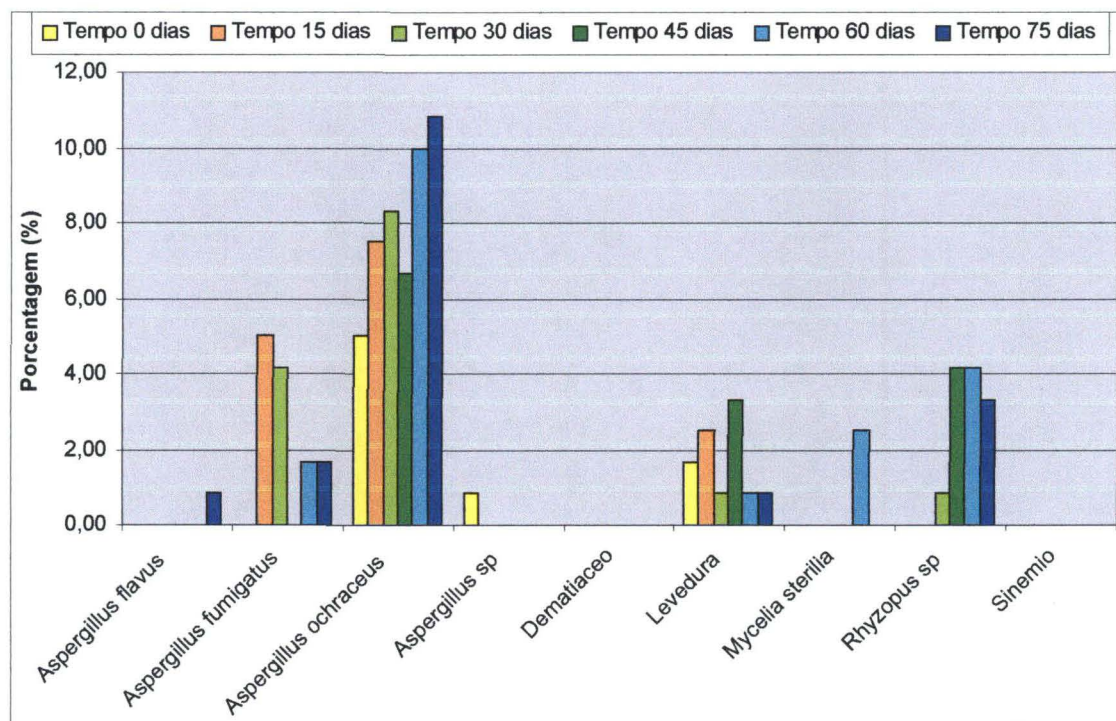
freqüência foi de *Aspergillus ochraceus* (9,17%) e a menor de *Aspergillus fumigatus* e *Rhizopus* sp ambos com 0,83%. No tempo 45 a maior freqüência foi de *Rhizopus* sp (10,83%) e a menor de dematiáceo (0,83%). No tempo 60 a maior freqüência foi de *Rhizopus* sp (10,83%) e a menor de *Aspergillus flavus* (3,33%). E no tempo 75 a maior freqüência foi de *Rhizopus* sp (10,83%) e a menor de *Aspergillus flavus* (0,83%).

Aspergillus ochraceus apresentou uma freqüência significativa em todos os tempos de estudo. No meio DRBC, sua tendência foi semelhante àquela observada no meio BDA, com sua freqüência aumentando com o passar do tempo. *Aspergillus fumigatus* também apresentou um comportamento distinto em relação aos meios anteriores. Sua freqüência foi maior no meio DRBC que nos outros meios. Além disso, a freqüência de *Aspergillus fumigatus* aumentou com o passar dos tempos. *Aspergillus ochraceus*, por estar presente em todos os tempos, deve estar relacionado à qualidade de bebida de café. Não existem dados na literatura sobre o isolamento de fungos de grãos de café coletados do solo em meio DRBC que possam corroborar os dados obtidos.

Aspergillus fumigatus e *Aspergillus ochraceus* estão presentes em todos os seis tempos de estudo. *Aspergillus flavus* e *Rhizopus* sp estão presentes em cinco dos seis tempos. Dematiáceo está presente em quatro dos seis tempos. Levedura e fungo sinêmio estão presentes em dois tempos e *Mycelia sterilia* não estava presente nos grãos coletados do solo.

Os resultados obtidos nos grãos coletados de árvore estão na tabela 15 (ANEXOS) e gráfico 15 que seguem.

GRÁFICO 15 – PORCENTAGEM DE FUNGOS ISOLADOS EM MEIO DRBC DE GRÃOS DA VARIEDADE IAPAR 59 COLETADOS DE ÁRVORE EM RELAÇÃO AO TEMPO



Os tempos com o maior número de espécies foram os tempos 60 e 75 dias, com cinco espécies diferentes de fungos. Em seguida ocorreram: tempo 30 dias com quatro espécies; e tempos 0, 15 e 45 dias, com três espécies. O resultado concorda com o obtido no meio BDA, ocorre um maior número de espécies nos tempos finais de estudo. Isto está relacionado à maior permanência dos frutos na árvore, possibilitando uma maior infecção por fungos com o passar do tempo.

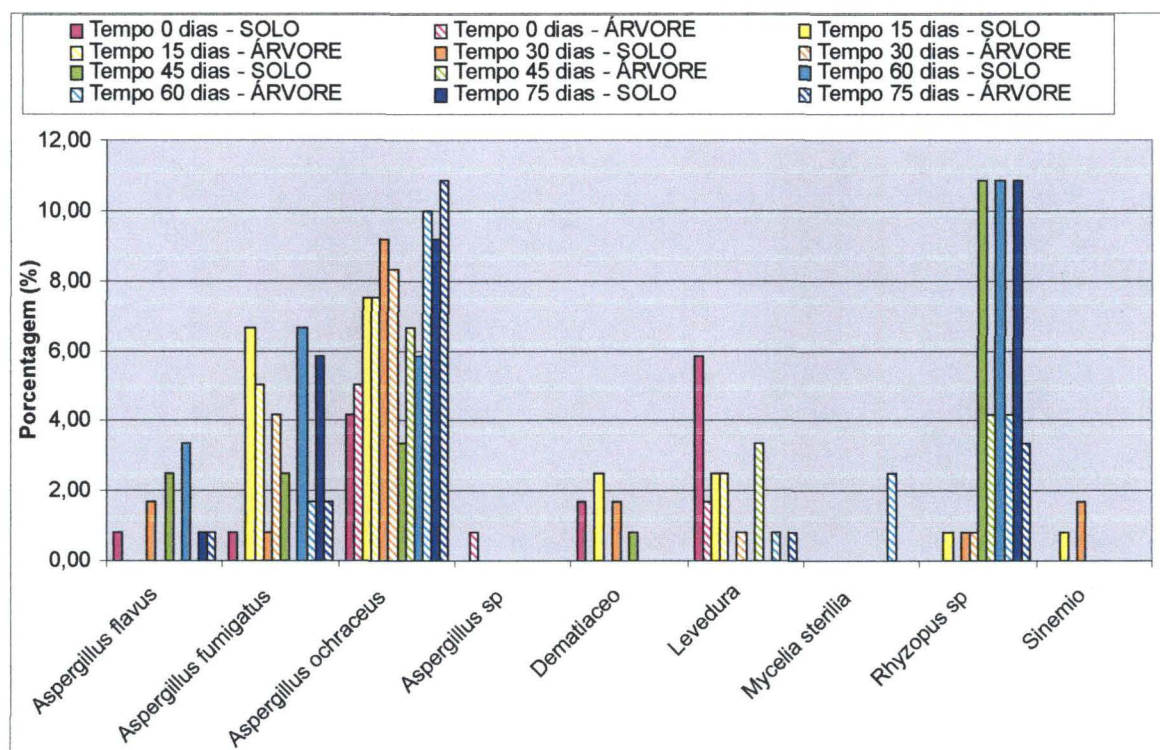
No tempo zero, a maior frequência foi de *Aspergillus ochraceus* (5,00%) enquanto que a menor frequência foi de *Aspergillus sp* (0,83%). No tempo 15 a maior frequência foi de *Aspergillus ochraceus* (7,50%) e a menor de leveduras (2,50%). No tempo 30 a maior frequência foi de *Aspergillus ochraceus* (8,33%) e a menor de *Rhizopus sp* e leveduras (0,83%). No tempo 45 a maior frequência foi de *Aspergillus ochraceus* (6,67%) e a menor de levedura (3,33%). No tempo 60 a maior frequência foi de *Aspergillus ochraceus* (10,00%) e a menor de levedura (0,83%). E no tempo 75 a maior frequência foi de *Aspergillus ochraceus* (10,83%) e a menor de leveduras (0,83%).

Aspergillus ochraceus apresentou uma tendência semelhante àquela observada no meio BDA. Sua frequência aumenta com o passar do tempo, sofrendo uma leve redução no tempo 45 dias. *Aspergillus fumigatus* apresentou nos grãos coletados de árvore uma frequência inferior àquela observada nos grãos coletados do solo. Isto ocorreu, provavelmente, pelo fato dos grãos do solo estarem mais sujeitos a uma maior infecção pelos fungos que os grãos de árvore. *Aspergillus ochraceus* esteve presente em todos os tempos de estudo e sua frequência foi muito superior a dos outros fungos isolados nos grãos coletados de árvore no meio DRBC. Este fungo pode estar relacionado à qualidade da bebida. Não existem dados relacionados à frequência de fungos isolados em grãos coletados de árvore no meio DRBC.

Aspergillus ochraceus e leveduras estão presentes nos seis tempos de estudo. *Aspergillus fumigatus* e *Rhizopus* sp estão presentes em quatro dos seis tempos. *Aspergillus flavus*, *Aspergillus* sp e *Mycelia sterilia* estão presentes em um dos tempos e os fungos dematiáceo e sinêmio não estavam presentes na amostra de origem árvore.

Apenas *Aspergillus ochraceus* esteve presente em todos os tempos nos grãos coletados de árvore e do solo. Dematiáceo e sinêmio desenvolveram-se apenas nos grãos coletados do solo enquanto *Aspergillus* sp e *Mycelia sterilia* desenvolveram-se apenas nos grãos coletados de árvore. O gráfico 16 mostra a porcentagem de grãos positivos em comparação nos grãos coletados de árvore e do solo.

GRÁFICO 16 – PORCENTAGEM DE FUNGOS ISOLADOS EM MEIO DRBC DE GRÃOS DA VARIEDADE IAPAR 59 COLETADOS DE ÁRVORE E DO SOLO EM RELAÇÃO AO TEMPO



Por estarem presentes em todos os tempos, *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus ochraceus* podem estar relacionados à qualidade de bebida, o que concorda com os resultados obtidos no meio BDA.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS FUNGOS ISOLADOS EM MEIO BDA, SABOURAUD E DRBC DOS GRÃOS DA VARIEDADE IAPAR 59 ORIGINÁRIOS DE ÁRVORE E DO SOLO

O resultado da ANOVA fatorial para os fungos isolados de grãos coletados de árvore está na tabela 16 (ANEXOS).

Como pode ser observado, apenas a interação tempo/meio é não significativa. Isto indica que o fator tempo associado ao meio de cultura utilizado para o isolamento dos fungos de grãos coletados de árvore não é um fator determinante para o surgimento de um maior ou menor número de fungos. As outras três possíveis interações testadas foram significativas. Para testar as diferenças entre as médias dentro de cada uma dessas interações realizou-se o teste de Tukey.

O resultado do teste de Tukey pode ser observado nas tabelas 17, 18, 19, 20, 21 E 22 (ANEXOS).

Em relação à interação tempo/fungo pode ser observado que entre os fungos os que sofrem influência por parte do tempo de permanência na árvore são: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus ochraceus*, *Botrytis* sp, fungo dematiáceo, leveduras, *Mycelia sterilia* e *Penicillium chrysogenum*. Em relação à interação meio de cultura/fungo os fungos influenciados pelo meio são: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus ochraceus*, *Botrytis* sp, fungo dematiáceo, *Fusarium* sp, leveduras, *Mycelia sterilia*, *Penicillium chrysogenum*, *Rhizopus* sp e fungo sinêmio. E, em relação à interação tempo/meio/fungo, os fungos influenciados por meio de cultura são para o BDA: *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus ochraceus*, *Botrytis* sp, fungo dematiáceo, leveduras e *Mycelia sterilia*; para Sabouraud: *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus ochraceus*, *Botrytis* sp, *Fusarium* sp, leveduras, *Mycelia sterilia* e *Penicillium chrysogenum*; e para DRBC: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus ochraceus*, fungo dematiáceo, leveduras, *Rhizopus* sp e fungo sinêmio.

Os principais agentes causadores da fermentação dos grãos de café, leveduras e fungos do gênero *Aspergillus* especialmente *Aspergillus ochraceus*, demonstram pelos resultados, que são influenciados pelo tempo de permanência dos grãos na árvore e pelo meio de cultura. Além disso, os resultados demonstram que estes fungos são capazes de se desenvolver em qualquer um dos meios testados, com exceção de *Aspergillus flavus* que se desenvolveu apenas em meio DRBC.

O resultado da ANOVA fatorial para os fungos isolados de grãos coletados do solo está na tabela 23 (ANEXOS).

Para os grãos coletados do solo os resultados não foram muito diferentes. Também para os grãos coletados do solo a única interação não significativa foi a interação tempo/meio. Isto indica também para os grãos coletados do solo o fator tempo associado ao meio de cultura utilizado para o isolamento dos fungos não é um fator determinante para o surgimento de um maior ou menor número de fungos. As outras três possíveis interações testadas também foram significativas. Para testar as diferenças entre as médias dentro de cada uma dessas interações realizou-se o teste de Tukey.

O resultado do teste de Tukey pode ser observado nas tabelas 24, 25, 26, 27, 28 e 29 (ANEXOS).

Em relação à interação tempo/fungo pode ser observado que entre os fungos os que sofrem influência por parte do tempo de permanência no solo são: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus ochraceus*, *Botrytis* sp, leveduras, *Mycelia sterilia*, *Penicillium chrysogenum* e *Rhizopus* sp. Em relação à interação meio de cultura/fungo os fungos influenciados pelo meio são: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus ochraceus*, *Botrytis* sp, *Fusarium* sp, leveduras, *Mycelia sterilia*, *Penicillium chrysogenum* e *Rhizopus* sp. E em relação à interação tempo/meio de cultura/fungo os fungos influenciados por meio de cultura são para o BDA: *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus ochraceus*, leveduras e *Penicillium chrysogenum*; para Sabouraud: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus ochraceus*, *Botrytis* sp, leveduras e *Penicillium chrysogenum*; e para DRBC: *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus ochraceus*, leveduras, *Mycelia sterilia* e *Rhizopus* sp.

Também para os grãos coletados do solo os principais agentes causadores da fermentação dos grãos de café, leveduras e fungos do gênero *Aspergillus* especialmente *Aspergillus ochraceus*, demonstram pelos resultados, que são influenciados pelo tempo de permanência dos grãos no solo e pelo meio de cultura. Além disso, os resultados demonstram que estes fungos são capazes de se desenvolver em qualquer um dos meios testados, com exceção de *Aspergillus flavus* que se desenvolveu apenas em meio Sabouraud.

Assim sendo, os resultados da análise estatística concordam com os dados referentes à frequência dos fungos, embasando a hipótese de que os fungos do gênero *Aspergillus*, especialmente *Aspergillus ochraceus*, estejam atuando de maneira decisiva a piorar a qualidade de bebida de café.

5 CONCLUSÕES

- A porcentagem de fungos isolados foi maior nos grãos de café da variedade IAPAR 59 coletados do solo do que de árvore;
- Observou-se uma piora na qualidade de bebida de grãos coletados de árvore em função do tempo de permanência dos mesmos na árvore;
- Os tempos de coleta aos 60 e 75 dias apresentaram uma maior frequência de fungos;
- O meio BDA apresentou a maior frequência de fungos isolados e entre estes o gênero de maior participação foi *Aspergillus* sendo *Aspergillus ochraceus* a espécie mais comum. Além disso, *Aspergillus ochraceus* esteve presente na maior parte dos tempos de estudo e em grande frequência nos grãos coletados de árvore, o que pode relacioná-lo a alteração na qualidade de bebida de café, sendo que tanto os grãos de árvore como de solo são influenciados pelo tempo de permanência e pelo meio de cultura;
- *Aspergillus ochraceus* apresentou maior média no meio BDA para grãos coletados de árvore e do solo e maior média no tempo 60 dias para grãos coletado de árvore e 30 dias para grãos coletados do solo;
- Para se obter uma melhor qualidade de bebida de café deve-se evitar uma permanência excessiva dos grãos na árvore e os grãos coletados de árvore não devem ser misturados aos do solo para o preparo da bebida de café.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, S. R. Doenças do cafeeiro. In: SIMPÓSIO SOBRE FATORES QUE AFETAM A PRODUTIVIDADE DO CAFEEIRO, 1. **Anais...**Poços de Caldas, MG. 1984.
- BACK, M. A.; HAYDOCK, P. P. J.; JENKINSON, P. Disease complexes involving plant parasitic nematodes and soilborne pathogens. **Plant Pathology**, v. 51, p. 683-697, 2002.
- BARNETT, H. C.; HUNTER, B. B. **Illustrated genera of imperfect fungi**, 3 ed., Minneapolis: Burgess Publications, 1987.
- BUSTILLO, A. E.; CÁRDINAS, R.; POSADA, F. J. Natural enemies and competitors of *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae) in Colombia. **Neotropical Entomology**, v.31, n.4, p.635-639, oct./dec., 2002.
- CAMARGO, R. de. Padronização do café. **Boletim de Agricultura**, São Paulo, v. 48, p. 421-438, 1947.
- CAMPOS, V. P.; LIMA, R. D. de. Nematóides parasitas do cafeeiro. In: SIMPÓSIO SOBRE FATORES QUE AFETAM A PRODUTIVIDADE DO CAFEEIRO, 1. **Anais...**Poços de Caldas, MG. 1984.
- CARNEIRO FILHO, F.; SCHOLZ, M. B. S.; CARAMORI, P. H.; ANDROCIOLI FILHO, A.; LIMA, F. B. Estudo do aparecimento do gosto Rio no café em função do tempo de permanência dos frutos na lavoura. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 2. **Anais...**Vitória, ES. 2001.
- CHALFOUN, S. M.; BATISTA, L.R. **Fungos Associados a Frutos e Grãos do Café – *Aspergillus* e *Penicillium***. 1 ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2003. 69 p.
- CONAB. **Safras**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>> Acesso em 09 out. 2004.
- 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.
- EVANGELISTA, A. W. P.; CARVALHO, L. G. de; SEDIYAMA, G. C. Zoneamento climático associado ao potencial produtivo da cultura do café no estado de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 6, n. 3, p. 445-452, 2002.
- FAVARIN, J. L.; VILLELA, A. L. G.; MORAES, M. H. D.; CHAMMA, H. M. C. P.; COSTA, J. D.; DOURADO-NETO, D. Qualidade da bebida de café de frutos cereja submetidos a diferentes manejos pós-colheita. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 2, p. 187-192, fev. 2004.

GARCIA JÚNIOR, D.; POZZA, E. A.; SOUZA, P. E. de; TALAMINI, V.; POZZA, A. A. A.; CASTRO, H. A. de; SOUZA, R. M. de; ABREU, M. S. de; PFENNING, L. H. Frequência de ocorrência de agentes etiológicos, sintomas e origem de amostras do cafeeiro catalogados em 12 anos de clínica fitossanitária da UFLA. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 1, p. 173-177, jan./fev., 2003.

GICHURU, E. K.; VÁRZEA, V. M. P.; RODRIGUES JUNIOR, C. J.; MASABA, D. M. Vegetative compatibility grouping of *Colletotrichum kahawae* In Kenya. **Journal of Phytopathology**, v. 148, p. 233-237, 2000.

GONÇALEZ, E.; PINTO, M. M.; FELICIO, J. D. Análise de micotoxinas no Instituto Biológico de 1989 a 1999. **Biológico**, São Paulo, v. 63, n. 1/2, p. 15-19, jan./dez., 2001.

HILL, J. L.; HOCKING, A. D.; WHITFIELD, F. B. The role of fungi in the production of chloroanisoles in general purpose freight containers. **Food Chemistry**, v. 54, n. 2, p. 161-166, 1995.

IBC/GERCA. **Cultura do Café no Brasil – Manual de Recomendações**. 5. ed. Rio de Janeiro: IBC/GERCA, 1985. 580 p. (Pragas do Cafeeiro, 8).

KARASAWA, S.; FARIA, M. A. de; GUIMARÃES, R. J. Resposta do cafeeiro cv. Topázio MG-1190 submetido a diferentes tempos de irrigação. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 6, n. 1, p. 28-34, 2002.

KERN, M.E., BLEVINS, K.S. **Micologia Médica – Texto e Atlas**, 2 ed, São Paulo: Editorial Premier, 1999.

KLEIN, D.; EVELEIGH, D. E. Ecology of Trichoderma, In: KUBICEK, C. P.; HARMAN, G. E. **Trichoderma and Gliocladium; Basic Biology, Taxonomy and Genetics**, v. 1, London: Taylor & Francis, pp. 57-74.

KLICH, M. A.; PITT, J. I. **Common Aspergillus Species and their Teleomorphs**. Austrália: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, 1988. 116p.

KRUG, H. P. Cafés duros II: um estudo sobre a qualidade dos cafés de varrição. **Revista do Instituto de Café**, v. 15, p. 1393-1396, 1940.

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

LAUZIÈRE, I.; PÉREZ-LACHAUD, G.; BRODEUR, J. Influence of host density on the reproductive strategy of *Cephalonomia stephanoderis*, a parasitoid of the coffee berry borer. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 92, p. 21-28, 1999.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. **Estatísticas/ Agricultura Brasileira em Números – Anuário 2003**. Disponível em : <<http://www.agricultura.gov.br>> Acesso em 30 ago. 2004.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. **Estatísticas/ Agricultura Mundial**. Disponível em : <<http://www.agricultura.gov.br>> Acesso em 30 ago. 2004.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. **Estatísticas/ Agronegócio Brasileiro**. Disponível em : <<http://www.agricultura.gov.br>> Acesso em 30 ago. 2004.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. **Estatísticas/ Comércio Exterior Brasileiro**. Disponível em : <<http://www.agricultura.gov.br>> Acesso em 30 ago. 2004.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. **Estatísticas/ Culturas**. Disponível em : <<http://www.agricultura.gov.br>> Acesso em 30 ago. 2004.

NASSER, P. P.; SOUZA, S. M. C.de; BATISTA, L. R.; MERCER, J. R. Implicações do fungo *Aspergillus niger var. niger* sobre o crescimento de isolados de *Aspergillus* da seção *Circumdati* e produção de ocratoxina A. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n.5, p.1172-1175, set./out., 2003.

PAULA, E. M.; SAKIYAMA, C. C. H.; PITTA FILHO, O. P. L.; BORGES, A.C.; SILVA, D. O. Comparação da microbiota da superfície de frutos de café (*Coffea arabica* L.) colhidos em duas localidades. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 1. **RESUMOS...** Brasília, DF. 1984.

PEREIRA, A. M.; KEMMELMEIER, C. Production of mycotoxins by galactose oxidase producing *Fusarium* using different culture media. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 31, n. 2, p. 129-134, abr./jun., 2000.

PIMENTA, C. J.; CHALFOUN, S. M. Composição microbiana associada ao café em coco e beneficiado colhido em diferentes estádios de maturação. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 3, p. 677-682, mai./jun., 2001.

PIMENTA, C. J.; VILELA, E. R. Composição microbiana e ocratoxina A no café (*Coffea arabica* L.) submetido a diferentes tempos de espera antes da secagem. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n.6, p.1315-1320, nov./dez., 2003.

PIMENTEL GOMES, F. **Curso de Estatística Experimental**. 13. ed. São Paulo: Nobel, 1990. 468p.

PINTO, N. A. V. D.; FERNANDES, S. M.; PIRES, T. C.; PEREIRA, R. G. F. A.; CARVALHO, V. D. de. Avaliação dos polifenóis e açúcares em padrões de bebida do café torrado tipo expresso. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 7, n. 3, p. 193-195, set./dez. 2001.

PRADO, G.; OLIVEIRA, M. S. de; ABRANTES, F. M.; SANTOS, L. G. dos; VELOSO, T.; BARROSO, R. E. de S. Incidência de ocratoxina A em café torrado e moído e em café solúvel consumido na cidade de Belo Horizonte,

MG. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 20, n. 2, p. 192-196, mai./ago., 2000.

REIS, P. R.; SOUZA, J. C. de. Pragas do Cafeeiro. In: SIMPÓSIO SOBRE FATORES QUE AFETAM A PRODUTIVIDADE DO CAFEIRO, 1. **Anais...** Poços de Caldas, MG. 1984.

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

SIMEPAR. **Dados históricos**. Disponível em : <<http://www.simepar.br>> Acesso em 01 dez. 2004.

SPADONE, J. C.; TAKEOKA, G.; LIARDON, R. Analytical investigation of Rio off-flavor in green coffee. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 38, p. 226-233, 1990.

STEEL, R. G. D.; TORRIE, J. H. **Principles and Procedures of Statistics with Special Reference to the Biological Sciences**. New York: McGraw-Hill, 1960. 481 p.

TORRES, G. A. Algunos aspectos de los hongos del genero *Fusarium* y de la especie *Fusarium oxysporum*. **Agronomia Colombiana**, v. 17, p. 11-16, 2000.

VEGA, F. E.; BLACKBUM, M. B.; KURTZMAN, C. P.; DOWD, P. F. Identification of a coffee berry borer-associated yeast: does it break down caffeine? **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 107, p. 19-24, 2003.

ANEXOS

TABELA 6 – QUALIDADE DA BEBIDA DE CAFÉ DA VARIEDADE IAPAR 59 DE GRÃOS ORIGINÁRIOS DE ÁRVORE E DO SOLO NOS DIFERENTES TEMPOS DE COLETA

Tempo	Tratamento	Qualidade da bebida	Número de defeitos
Ensaio (22/07/03)	Café seco	Dura +	30
	Café de varrição	Dura	40
	Maduro	Dura	30
	Verde	Dura / verde	300
Tempo 0 (15/08/03)	Café na planta	Apenas mole	30
	Café no solo	Dura	40
Tempo 15 (01/09/03)	Café na planta	Mole	30
	Café no solo	Dura	40
Tempo 30 (15/09/03)	Café na planta	Apenas mole	30
	Café no solo	Dura / riada	40
Tempo 45 (30/09/03)	Café na planta	Dura	30
	Café no solo	Dura	40
Tempo 60 (15/10/03)	Café na planta	Dura	40
	Café no solo	Dura	60
Tempo 75 (31/10/03)	Café na planta	Dura	50
	Café no solo	Dura suja rançosa	80

FONTE: IAPAR, 2004

TABELA 7 – NÚMERO ABSOLUTO E PORCENTAGEM RELATIVA DE FUNGOS ISOLADOS EM MEIO BDA DE GRÃOS DA VARIEDADE IAPAR 59 EM RELAÇÃO AO TRATAMENTO

Tratamento Fungo	Café seco		Café de varrição		Maduro		Verde	
	N ⁽¹⁾	% ⁽²⁾	N	%	N	%	N	%
<i>Aspergillus fumigatus</i>	0	0,00	2	10,00	2	10,00	1	5,00
<i>Aspergillus ochraceus</i>	3	15,00	3	15,00	1	5,00	0	0,00
<i>Botrytis</i> sp	1	5,00	1	5,00	0	0,00	0	0,00
Dematiáceo	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
<i>Drechslera</i> sp	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
<i>Fusarium</i> sp	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
Levedura	2	10,00	2	10,00	3	15,00	2	10,00
<i>Mycelia sterilia</i>	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
<i>Penicillium chrysogenum</i>	1	5,00	0	0,00	0	0,00	2	10,00
<i>Trichoderma</i> sp	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00

⁽¹⁾ N: número absoluto de grãos positivos por tratamento e por microrganismo

⁽²⁾ %: porcentagem relativa de grãos positivos por tratamento e por microrganismo

TABELA 8 – NÚMERO ABSOLUTO E PORCENTAGEM RELATIVA DE FUNGOS ISOLADOS EM MEIO SABOURAUD DE GRÃOS DA VARIEDADE IAPAR 59 EM RELAÇÃO AO TRATAMENTO

Tratamento Fungo	Café seco		Café de varrição		Maduro		Verde	
	N ⁽¹⁾	% ⁽²⁾	N	%	N	%	N	%
<i>Aspergillus flavus</i>	1	5,00	1	5,00	0	0,00	0	0,00
<i>Aspergillus fumigatus</i>	1	5,00	1	5,00	0	0,00	0	0,00
<i>Aspergillus ochraceus</i>	3	15,00	5	25,00	0	0,00	15	0,00
<i>Botrytis</i> sp	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	5,00
<i>Fusarium</i> sp	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
Levedura	0	0,00	0	0,00	2	10,00	0	0,00
<i>Mycelia sterilia</i>	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
<i>Penicillium chrysogenum</i>	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00

⁽¹⁾ N: número absoluto de grãos positivos por tratamento e por microrganismo

⁽²⁾ %: porcentagem relativa de grãos positivos por tratamento e por microrganismo

TABELA 9 – NÚMERO ABSOLUTO E PORCENTAGEM RELATIVA DE FUNGOS ISOLADOS EM MEIO DRBC DE GRÃOS DA VARIEDADE IAPAR 59 EM RELAÇÃO AO TRATAMENTO

Tratamento	Café seco		Café de varrição		Maduro		Verde	
	N ⁽¹⁾	% ⁽²⁾	N	%	N	%	N	%
<i>Aspergillus flavus</i>	0	0,00	0	10,00	0	10,00	0	5,00
<i>Aspergillus fumigatus</i>	0	0,00	3	15,00	3	15,00	1	5,00
<i>Aspergillus ochraceus</i>	4	20,00	2	10,00	0	0,00	0	0,00
<i>Aspergillus</i> sp	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
Dematiáceo	0	0,00	0	0,00	1	5,00	0	0,00
Levedura	0	0,00	2	10,00	0	0,00	0	0,00
<i>Mycelia sterilia</i>	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
<i>Rhizopus</i> sp	0	0,00	0	0,00	0	0,00	2	10,00
Sinêmio	1	5,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00

⁽¹⁾ N: número absoluto de grãos positivos por tratamento e por microrganismo

⁽²⁾ %: porcentagem relativa de grãos positivos por tratamento e por microrganismo

TABELA 10 – NÚMERO ABSOLUTO E PORCENTAGEM RELATIVA DE FUNGOS ISOLADOS EM MEIO BDA DE GRÃOS DA VARIEDADE IAPAR 59 COLETADOS DO SOLO EM RELAÇÃO AO TEMPO

Tempo	0 dias		15 dias		30 dias		45 dias		60 dias		75 dias	
	N ⁽¹⁾	% ⁽²⁾	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
<i>Aspergillus fumigatus</i>	3	2,50	5	4,17	1	0,83	3	2,50	6	5,00	7	5,83
<i>Aspergillus ochraceus</i>	11	9,17	8	6,67	11	9,17	8	6,67	11	9,17	13	10,83
<i>Botrytis</i> sp	1	0,83	0	0,00	1	0,83	6	5,00	7	5,83	2	1,67
Dematiáceo	0	0,00	0	0,00	2	1,67	0	0,00	0	0,00	3	2,50
<i>Drechslera</i> sp	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
<i>Fusarium</i> sp	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,83	1	0,83
Levedura	11	9,17	7	5,83	1	0,83	1	0,83	0	0,00	0	0,00
<i>Mycelia sterilia</i>	0	0,00	0	0,00	1	0,83	0	0,00	0	0,00	0	0,00
<i>Penicillium chrysogenum</i>	2	1,67	0	0,00	9	7,50	13	10,83	8	6,67	7	5,83
<i>Trichoderma</i> sp	0	0,00	1	0,83	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00

⁽¹⁾ N: número absoluto de grãos positivos na origem solo por tempo e por microrganismo

⁽²⁾ %: porcentagem relativa de grãos positivos na origem solo por tempo e por microrganismo

TABELA 11 – NÚMERO ABSOLUTO E PORCENTAGEM RELATIVA DE FUNGOS ISOLADOS EM MEIO BDA DE GRÃOS DA VARIEDADE IAPAR 59 COLETADOS DE ÁRVORE EM RELAÇÃO AO TEMPO

Tempo	0 dias		15 dias		30 dias		45 dias		60 dias		75 dias	
	N ⁽¹⁾	% ⁽²⁾	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
<i>Aspergillus fumigatus</i>	9	7,50	0	0,00	0	0,00	5	4,17	1	0,83	3	2,50
<i>Aspergillus ochraceus</i>	10	8,33	9	7,50	11	9,17	9	7,50	17	14,17	18	15,00
<i>Botrytis</i> sp	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,83
Dematiáceo	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
<i>Drechslera</i> sp	0	0,00	0	0,00	1	0,83	0	0,00	0	0,00	0	0,00
<i>Fusarium</i> sp	1	0,83	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,83
Levedura	5	4,17	13	10,83	9	7,50	6	5,00	2	1,67	1	0,83
<i>Mycelia sterilia</i>	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
<i>Penicillium chrysogenum</i>	1	0,83	3	2,50	5	4,17	4	3,33	9	7,50	12	10,00
<i>Trichoderma</i> sp	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00

⁽¹⁾ N: número absoluto de grãos positivos na origem árvore por tempo e por microrganismo

⁽²⁾ %: porcentagem relativa de grãos positivos na origem árvore por tempo e por microrganismo

TABELA 12 - NÚMERO ABSOLUTO E PORCENTAGEM RELATIVA DE FUNGOS ISOLADOS EM MEIO SABOURAUD DE GRÃOS DA VARIEDADE IAPAR 59 COLETADOS DO SOLO EM RELAÇÃO AO TEMPO

Tempo	0 dias		15 dias		30 dias		45 dias		60 dias		75 dias	
	N ⁽¹⁾	% ⁽²⁾	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
<i>Aspergillus flavus</i>	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,83	0	0,00	1	0,83
<i>Aspergillus fumigatus</i>	0	0,00	2	1,67	7	5,83	8	6,67	9	7,50	2	1,67
<i>Aspergillus ochraceus</i>	6	5,00	9	7,50	15	12,50	9	7,50	8	6,67	0	0,00
<i>Botrytis</i> sp	0	0,00	1	0,83	0	0,00	2	1,67	7	5,83	8	6,67
<i>Fusarium</i> sp	0	0,00	1	0,83	0	0,00	2	1,67	2	1,67	0	0,00
Levedura	3	2,50	0	0,00	1	0,83	0	0,00	0	0,00	0	0,00
<i>Mycelia sterilia</i>	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	3	2,50	3	2,50
<i>Penicillium chrysogenum</i>	0	0,00	2	1,67	1	0,83	7	5,83	0	0,00	0	0,00

⁽¹⁾ N: número absoluto de grãos positivos na origem solo por tempo e por microrganismo

⁽²⁾ %: porcentagem relativa de grãos positivos na origem solo por tempo e por microrganismo

TABELA 13 – NÚMERO ABSOLUTO E PORCENTAGEM RELATIVA DE FUNGOS ISOLADOS EM MEIO SABOURAUD DE GRÃOS DA VARIEDADE IAPAR 59 COLETADOS DE ÁRVORE EM RELAÇÃO AO TEMPO

Tempo	0 dias		15 dias		30 dias		45 dias		60 dias		75 dias	
	N ⁽¹⁾	% ⁽²⁾	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
<i>Aspergillus flavus</i>	0	0,00	1	0,83	0	0,00	0	0,00	5	4,17	3	2,50
<i>Aspergillus fumigatus</i>	1	0,83	0	0,00	1	0,83	1	0,83	5	4,17	9	7,50
<i>Aspergillus ochraceus</i>	8	6,67	12	10,00	11	9,17	0	0,00	7	5,83	7	5,83
<i>Botrytis sp</i>	2	1,67	1	0,83	1	0,83	3	2,50	2	1,67	2	1,67
<i>Fusarium sp</i>	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
Levedura	0	0,00	2	1,67	2	1,67	6	5,00	0	0,00	0	0,00
<i>Mycelia sterilia</i>	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
<i>Penicillium chrysogenum</i>	1	0,83	0	0,00	1	0,83	2	1,67	4	3,33	0	0,00

⁽¹⁾ N: número absoluto de grãos positivos na origem árvore por tempo e por microrganismo

⁽²⁾ %: porcentagem relativa de grãos positivos na origem árvore por tempo e por microrganismo

TABELA 14 – NÚMERO ABSOLUTO E PORCENTAGEM RELATIVA DE FUNGOS ISOLADOS EM MEIO DRBC DE GRÃOS DA VARIEDADE IAPAR 59 COLETADOS DO SOLO EM RELAÇÃO AO TEMPO

Tempo	0 dias		15 dias		30 dias		45 dias		60 dias		75 dias	
	N ⁽¹⁾	% ⁽²⁾	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
<i>Aspergillus flavus</i>	1	0,83	0	0,00	2	1,67	3	2,50	4	3,33	1	0,83
<i>Aspergillus fumigatus</i>	1	0,83	8	6,67	1	0,83	3	2,50	8	6,67	7	5,83
<i>Aspergillus ochraceus</i>	5	4,17	9	7,50	11	9,17	4	3,33	7	5,83	11	9,17
<i>Aspergillus</i> sp	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
Dematiáceo	2	1,67	3	2,50	2	1,67	1	0,83	0	0,00	0	0,00
Levedura	7	5,83	3	2,50	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
<i>Mycelia sterilia</i>	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
<i>Rhizopus</i> sp	0	0,00	1	0,83	1	0,83	13	10,83	13	10,83	13	10,83
Sinêmio	0	0,00	1	0,83	2	1,67	0	0,00	0	0,00	0	0,00

⁽¹⁾ N: número absoluto de grãos positivos na origem solo por tempo e por microrganismo

⁽²⁾ %: porcentagem relativa de grãos positivos na origem solo por tempo e por microrganismo

TABELA 15 – NÚMERO ABSOLUTO E PORCENTAGEM RELATIVA DE FUNGOS ISOLADOS EM MEIO DRBC DE GRÃOS DA VARIEDADE IAPAR 59 COLETADOS DE ÁRVORE EM RELAÇÃO AO TEMPO

Tempo	0 dias		15 dias		30 dias		45 dias		60 dias		75 dias	
	N ⁽¹⁾	% ⁽²⁾	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
<i>Aspergillus flavus</i>	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,83
<i>Aspergillus fumigatus</i>	0	0,00	6	5,00	5	4,17	0	0,00	2	1,67	2	1,67
<i>Aspergillus ochraceus</i>	6	5,00	9	7,50	10	8,33	8	6,67	12	10,00	13	10,83
<i>Aspergillus sp</i>	1	0,83	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
Dematiáceo	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
Levedura	2	1,67	3	2,50	1	0,83	4	3,33	1	0,83	1	0,83
<i>Mycelia sterilia</i>	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	3	2,50	0	0,00
<i>Rhizopus sp</i>	0	0,00	0	0,00	1	0,83	5	4,17	5	4,17	4	3,33
Sinêmio	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00

⁽¹⁾ N: número absoluto de grãos positivos na origem árvore por tempo e por microrganismo

⁽²⁾ %: porcentagem relativa de grãos positivos na origem árvore por tempo e por microrganismo

**TABELA 16 – RESULTADOS DA ANÁLISE FATORIAL PARA GRÃOS DA VARIEDADE IAPAR 59
COLETADOS DE ÁRVORE**

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	
tratamento	251	219,0819	0,872836	5,653225	
fator T	5	3,388412	0,677682	4,389244	**
fator M	2	3,125757	1,562878	10,12252	**
fator F	13	109,9011	8,453929	54,7548	**
T x M	10	0,441594	0,044159	0,286013	n. s.
T x F	65	37,56556	0,577932	3,743175	**
M x F	26	32,47369	1,248988	8,089504	**
T x M x F	130	32,18579	0,247583	1,603557	**
erro	756	116,7235	0,154396		
TOTAL	1007	335,8054			
CV: 18%					

Nota: T = tempo; M = meio; F = fungo; * = 5%; ** = 1%; n. s. = não significativo

TABELA 17 – MÉDIAS PARA A INTERAÇÃO TEMPO X FUNGO PARA OS GRÃOS DE CAFÉ DA VARIEDADE IAPAR 59 COLETADOS DE ÁRVORE

Fungo/Tempo	0 dias	15 dias	30 dias	45 dias	60 dias	75 dias
<i>Aspergillus flavus</i>	2	2,083333	2	2	2,186339	2,284518
<i>Aspergillus fumigatus</i>	2,845522	2,394338	2,345522	2,370791	2,451184	2,615194
<i>Aspergillus ochraceus</i>	3,21753	2	3,648938	2,953233	3,755228	3,68102
<i>Aspergillus</i> sp	2,083333	2	2	2	2	2
<i>Botrytis</i> sp	2,117851	2,083333	2,083333	2,201184	2,166667	2,25
Dematiáceo	2	2	2	2	2	2
<i>Drechslera</i> sp	2	2	2,083333	2	2	2
<i>Fusarium</i> sp	2,083333	2	2	2	2	2,083333
Levedura	2,485702	2,857711	2,649712	2,804738	2,201184	2,166667
<i>Mycelia sterilia</i>	2	2	2	2	2,144338	2
<i>Penicillium chrysogenum</i>	2,166667	2,201184	2,345522	2,428855	2,691044	2,733045
<i>Rhizopus</i> sp	2	2	2,083333	2,25	2,367851	2,284518
Sinêmio	2	2	2	2	2	2
<i>Trichoderma</i> sp	2	2	2	2	2	2

**TABELA 18 – MÉDIAS PARA A INTERAÇÃO MEIO X FUNGO
PARA OS GRÃOS DE CAFÉ DA VARIEDADE
IAPAR 59 COLETADOS DE ÁRVORE**

Fungo/Meio	BDA	SAB.	DRBC
<i>Aspergillus flavus</i>	2	2,235428	2,041667
<i>Aspergillus fumigatus</i>	2,4964	2,426503	2,588373
<i>Aspergillus ochraceus</i>	3,568108	2,800448	3,259418
<i>Aspergillus</i> sp	2	2	2,041667
<i>Botrytis</i> sp	2,041667	2,409518	2
Dematiáceo	2	2	2
<i>Drechslera</i> sp	2,041667	2	2
<i>Fusarium</i> sp	2,083333	2	2
Levedura	2,924394	2,26011	2,398353
<i>Mycelia sterilia</i>	2	2	2,072169
<i>Penicillium chrysogenum</i>	3,057567	2,225592	2
<i>Rhizopus</i> sp	2	2	2,492851
Sinêmio	2	2	2
<i>Trichoderma</i> sp	2	2	2

TABELA 20 – RESULTADO PARA A COMPARAÇÃO DE MÉDIAS DA INTERAÇÃO TEMPO X FUNGO PARA GRÃOS DA VARIEDADE IAPAR 59 COLETADOS DE ÁRVORE

Tempo/Fungo	<i>A. flavus</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. ochraceus</i>	<i>Aspergillus</i> sp	<i>Botrytis</i> sp	Dematiáceo	<i>Drechslera</i> sp
0 dias	a	a	a	a	a	a	a
15 dias	b	b	b	a	a	a	a
30 dias	a	b	c	a	a	a	a
45 dias	a	b	d	a	ab	a	a
60 dias	c	b	c	a	ab	a	a
75 dias	c	c	c	a	b	a	a

Tempo/Fungo	<i>Fusarium</i> sp	Levedura	<i>M. sterilia</i>	<i>P. chrysogenum</i>	<i>Rhizopus</i> sp	Sinémio	<i>Trichoderma</i> sp
0 dias	a	a	a	a	a	a	a
15 dias	a	b	a	a	a	a	a
30 dias	a	c	a	b	a	a	a
45 dias	a	b	a	b	b	a	a
60 dias	a	d	b	c	b	a	a
75 dias	a	d	a	c	b	a	a

NOTA: Médias com a mesma letra não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey

TABELA 21 – RESULTADO PARA A COMPARAÇÃO DE MÉDIAS DA INTERAÇÃO MEIO X FUNGO PARA GRÃOS DA VARIEDADE IAPAR 59 COLETADOS DE ÁRVORE

Meio/Fungo	<i>A. flavus</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. ochraceus</i>	<i>Aspergillus</i> sp	<i>Botrytis</i> sp	Dematiáceo	<i>Drechslera</i> sp
BDA	a	a	a	a	a	a	a
SAB.	b	a	b	a	b	a	a
DRBC	a	b	c	a	a	a	a

Meio/Fungo	<i>Fusarium</i> sp	Levedura	<i>M. sterilia</i>	<i>P. chrysogenum</i>	<i>Rhizopus</i> sp	Sinémio	<i>Trichoderma</i> sp
BDA	a	a	a	a	a	a	a
SAB.	b	b	a	b	a	a	a
DRBC	b	c	b	c	b	a	a

NOTA: Médias com a mesma letra não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey

TABELA 22 - RESULTADO PARA A COMPARAÇÃO DE MÉDIAS DA INTERAÇÃO TEMPO X MEIO X FUNGO PARA GRÃOS DA VARIEDADE IAPAR 59 COLETADOS DE ÁRVORE

Tempo/ Fungo	<i>A. flavus</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. ochraceus</i>	<i>Aspergillus</i> sp	<i>Botrytis</i> sp	Dematiáceo	<i>Drechslera</i> sp	<i>Fusarium</i> sp	Levedura	<i>M. sterilia</i>	<i>P. chrysogenum</i>	<i>Rhizopus</i> sp	Sinêmio	<i>Trichoderma</i> sp
BDA														
0 dias	a	a	a b	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
15 dias	a	b	c	a	a	a	a	a	b	a	b	a	a	a
30 dias	a	b	a	a	a	a	a	a	c	a	b c	a	a	a
45 dias	a	c	b	a	a	a	a	a	a	a	c	a	a	a
60 dias	a	b	d	a	a	a	a	a	d a	d a	d	a	a	a
75 dias	a	d	d	a	a	a	a	a	d a	d a	e	a	a	a
SABOURAUD														
0 dias	a	a	a	a	a b	a	a	a	a	a	a b	a	a	a
15 dias	a	a	b	a	b	a	a	a	b	a	b	a	a	a
30 dias	a	a	c	a	b	a	a	a	b	a	a b	a	a	a
45 dias	a	a	b	a	a	a	a	a	c	a	a	a	a	a
60 dias	b	b	a	a	a b	a	a	a	a	a	a	a	a	a
75 dias	b	c	a	a	a b	a	a	a	a	a	b	a	a	a
DRBC														
0 dias	a	a	a	a	a	a	a	a	a b	a	a	a	a	a
15 dias	a	b	b	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
30 dias	a	a	c d	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
45 dias	a	c	c	a	a	a	a	a	b	a	a	b	a	a
60 dias	a	d	e a	a	a	a	a	a	a	b	a	c	a	a
75 dias	a	d	d e a	a	a	a	a	a	a	a	a	b c	a	a

NOTA: Médias com a mesma letra não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey

**TABELA 23 – RESULTADOS DA ANÁLISE FATORIAL PARA GRÃOS DA VARIEDADE IAPAR 59
COLETADOS DO SOLO**

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
tratamento	251	276,5411	1,101757	4,809669
fator T	5	2,912519		0,582504
fator M	2	3,570112		1,785056
fator F	13	138,0087		10,61605
T x M	10	1,300604		0,13006
T x F	65	40,61645		0,624868
M x F	26	45,45714		1,748352
T x M x F	130	44,67553		0,343658
erro	756	173,1779	0,229071	
TOTAL	1007	449,719		
CV: 21%				

Nota: T = tempo; M = meio; F = fungo; * = 5%; ** = 1%; n. s. = não significativo

TABELA 24 – MÉDIAS PARA A INTERAÇÃO TEMPO X FUNGO PARA OS GRÃOS DE CAFÉ DA VARIEDADE IAPAR 59 COLETADOS DO SOLO

Fungo/Tempo	0 dias	15 dias	30 dias	45 dias	60 dias	75 dias
<i>Aspergillus flavus</i>	2,0833	2	2,1179	2,2845	2,2622	2,1667
<i>Aspergillus fumigatus</i>	2,311	2,8652	2,4709	2,8239	3,2327	3,0366
<i>Aspergillus ochraceus</i>	3,2378	3,3896	3,9818	3,1274	3,452	3,1125
<i>Aspergillus sp</i>	2	2	2	2	2	2
<i>Botrytis sp</i>	2,0833	2,0833	2,0833	2,4634	2,8503	2,5664
Dematiáceo	2,1667	2,2012	2,2845	2,1179	2	2,1443
<i>Drechslera sp</i>	2	2	2	2	2	2
<i>Fusarium sp</i>	2,0833	2,0833	2	2,1179	2,2012	2,0833
Levedura	2,9607	2,5122	2,1667	2,0833	2	2
<i>Mycelia sterilia</i>	2	2	2,0833	2	2,2012	2,2012
<i>Penicillium chrysogenum</i>	2,1179	2,2012	2,5812	3,0879	2,5745	2,3679
<i>Rhizopus sp</i>	2	2,0833	2,0833	2,5985	2,6179	2,5887
Sinêmio	2	2,0833	2,1179	2	2	2
<i>Trichoderma sp</i>	2	2,1179	2	2	2	2

TABELA 25 – MÉDIAS PARA A INTERAÇÃO MEIO X FUNGO PARA OS GRÃOS DE CAFÉ DA VARIEDADE IAPAR 59 COLETADOS DO SOLO

Fungo/Meio	BDA	SAB.	DRBC
<i>Aspergillus flavus</i>	2	2,08333	2,37395
<i>Aspergillus fumigatus</i>	2,82569	2,71343	2,83095
<i>Aspergillus ochraceus</i>	3,66814	3,13722	3,34517
<i>Aspergillus</i> sp	2	2	2
<i>Botrytis</i> sp	2,62262	2,44243	2
Dematiáceo	2,13109	2	2,32618
<i>Drechslera</i> sp	2	2	2
<i>Fusarium</i> sp	2,125	2,15952	2
Levedura	2,48543	2,11384	2,26219
<i>Mycelia sterilia</i>	2,04167	2,20118	2
<i>Penicillium chrysogenum</i>	3,19802	2,26726	2
<i>Rhizopus</i> sp	2	2	2,98584
Sinêmio	2	2	2,10059
<i>Trichoderma</i> sp	2,05893	2	2

TABELA 27 – RESULTADO PARA A COMPARAÇÃO DE MÉDIAS DA INTERAÇÃO TEMPO X FUNGO PARA GRÃOS DA VARIEDADE IAPAR 59 COLETADOS DO SOLO

Tempo/Fungo	<i>A. flavus</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. ochraceus</i>	<i>Aspergillus</i> sp	<i>Botrytis</i> sp	Dematiáceo	<i>Drechslera</i> sp
0 dias	ab	a	a	a	a	a b	a
15 dias	a	b	b	a	a	a b	a
30 dias	abc	c	c	a	a	a	a
45 dias	d	b	a	a	b	b c	a
60 dias	cd	d	b	a	c	c	a
75 dias	bcd	e	a	a	b	a b c	a

Tempo/Fungo	<i>Fusarium</i> sp	Levedura	<i>M. sterilia</i>	<i>P. chrysogenum</i>	<i>Rhizopus</i> sp	Sinémio	<i>Trichoderma</i> sp
0 dias	ab	a	b	a	a	a	a
15 dias	ab	b	b	a	a	a	a
30 dias	b	c	a b	b	a	a	a
45 dias	ab	cd	b	c	b	a	a
60 dias	a	d	a	b	b	a	a
75 dias	ab	d	a	d	b	a	a

NOTA: Médias com a mesma letra não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey

TABELA 28 – RESULTADO PARA A COMPARAÇÃO DE MÉDIAS DA INTERAÇÃO MEIO X FUNGO PARA GRÃOS DA VARIEDADE IAPAR 59 COLETADOS DO SOLO

Meio/Fungo	<i>A. flavus</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. ochraceus</i>	<i>Aspergillus</i> sp	<i>Botrytis</i> sp	Dematiáceo	<i>Drechslera</i> sp
BDA	a	a	a	a	a	a	a
SAB.	a	b	b	a	b	b	a
DRBC	b	a	c	a	c	c	a

Meio/Fungo	<i>Fusarium</i> sp	Levedura	<i>M. sterilia</i>	<i>P. chrysogenum</i>	<i>Rhizopus</i> sp	Sinémio	<i>Trichoderma</i> sp
BDA	a	a	a	a	a	a	a
SAB.	a	b	b	b	a	a	a
DRBC	b	c	a	c	b	b	a

NOTA: Médias com a mesma letra não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey

TABELA 29 – RESULTADO PARA A COMPARAÇÃO DE MÉDIAS DA INTERAÇÃO TEMPO X MEIO X FUNGO PARA GRÃOS DA VARIETADE IAPAR 59 COLETADOS DO SOLO

Tempo/ Fungo	<i>A. flavus</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. ochraceus</i>	<i>Aspergillus</i> sp	<i>Botrytis</i> sp	Dematiáceo	<i>Drechslera</i> sp	<i>Fusarium</i> sp	Levedura	<i>M. sterilia</i>	<i>P. chrysogenum</i>	<i>Rhizopus</i> sp	Sinêmio	<i>Trichoderma</i> sp
BDA														
0 dias	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
15 dias	a	a	c	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	b
30 dias	a	b	b	a	a	b	a	a	b	a	b	a	a	a
45 dias	a	a	c	a	b	a	a	a	b	a	c	a	a	a
60 dias	a	c	a	a	b	a	a	a	b	a	b	a	a	a
75 dias	a	c	a	a	b	b	a	a	b	a	d	a	a	a
SABOURAUD														
0 dias	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
15 dias	a	b	b	a	a	a	a	a	b	a	b	a	a	a
30 dias	a	c	c	a	a	a	a	a	a	a	b	a	a	a
45 dias	a	c	a	a	b	a	a	b	b	a	c	a	a	a
60 dias	a	d	a	a	c	a	a	b	b	b	a	a	a	a
75 dias	a	b	d	a	c	a	a	a	b	b	a	a	a	a
DRBC														
0 dias	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
15 dias	a	c	b	a	a	a	a	a	b	a	a	a	a	b
30 dias	b	c	c	a	a	a	a	a	c	a	a	a	b	a
45 dias	c	d	a	a	a	a	a	a	c	a	a	b	a	a
60 dias	d	c	a	a	a	b	a	a	c	a	a	b	a	a
75 dias	a	c	b	a	a	b	a	a	c	a	a	b	a	a

NOTA: Médias com a mesma letra não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey