

**CHRISTIAN DYKSTRA**



**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS ASSOCIADOS AO  
CAFÉ DA VARIEDADE CATUAÍ EM DIFERENTES ESTÁDIOS DE  
MATURAÇÃO**

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

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

**CURITIBA**

**2004**

**CHRISTIAN DYKSTRA**

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS ASSOCIADOS AO  
CAFÉ DA VARIEDADE CATUAÍ EM DIFERENTES ESTÁDIOS DE  
MATURAÇÃO**

**CURITIBA  
2004**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente a Deus.

A todos os meus familiares, em especial meus pais, a quem amo muito e que sempre me apoiaram em minhas decisões.

Aos professores do curso de Biologia que foram responsáveis pela minha formação.

À amiga, professora e orientadora Ida Chapaval Pimentel pela sua dedicação e conhecimento na realização desta monografia, e pela sua ajuda em minha formação profissional.

Ao professor Juarez Gabardo, que me ajudou na análise dos dados.

Ao colaborador Dalton Reynaud dos Santos, que me auxiliou em diversos aspectos na elaboração do trabalho.

A todos os amigos e também colegas do curso de Biologia.

Enfim agradeço a todos aqueles que conviveram comigo durante o curso e que de alguma forma contribuíram para a minha formação.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES</b> .....	v
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	vi
<b>RESUMO</b> .....	vii
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	2
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	9
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	9
4.1 MEIOS DE CULTURA.....	9
4.1.1 Meio batata – Dextrose – Agar (BDA).....	9
4.2 SOLUÇÕES.....	10
4.2.1 Solução de “Tween 80” 0,1%.....	10
4.3 CORANTE E CLAREDOR.....	10
4.3.1 Lactofenol Azul de Algodão.....	10
4.3.2 Lactofenol de Amann.....	10
4.4 MATERIAL BIOLÓGICO.....	11
4.5 ISOLAMENTO DOS FUNGOS.....	11
4.6 PURIFICAÇÃO DOS ISOLADOS.....	11
4.7 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS.....	12
4.7.1 Técnica do microcultivo.....	13
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	13
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	14
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	21
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	22
<b>ANEXOS</b> .....	27

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – ISOLAMENTO DOS FUNGOS EM GRÃOS DE CAFÉ EM DIFERENTES ESTÁGIOS DE MATURAÇÃO (CEREJA, PASSAS E SECO NO PÉ).....12

GRÁFICO 1 – DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA DE FUNGOS DE CAFÉ DA VARIEDADE CATUAI, ISOLADOS NOS TRÊS ESTÁDIOS DE MATURAÇÃO (CEREJA, PASSAS E SECO NO PÉ).....18

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – FUNGOS ISOLADOS E FREQUENCIA RELATIVA (%) DA OCORRÊNCIA DE FUNGOS EM RELAÇÃO AO NÚMERO TOTAL DE SEMENTES DE CAFÉ DA VARIEDADE CATUAÍ, EM TRÊS ESTÁDIOS DE MATURAÇÃO DISTINTOS (CEREJA, PASSAS E SECO NO PÉ).....14

TABELA 2 – MÉDIA DA OCORRÊNCIA DOS FUNGOS *ASPERGILLUS CARBONARIUS*, *FUSARIUM* SP, *TRICHODERMA* SP, *PENICILLIUM* SP E *RHIZOCTONIA* SP EM GRÃOS DE FRUTOS DE CAFÉ DA VARIEDADE CATUAÍ EM 3 ESTÁDIOS DE MATURAÇÃO (CEREJA, PASSAS E SECO NO PÉ).....16

TABELA 3 – MÉDIA DA OCORRÊNCIA DOS FUNGOS *CURVULARIA* SP, *BIPOLARIS* SP, *ACREMINIUM* SP, *PHOMA* SP E FUNGOS NÃO IDENTIFICADOS EM GRÃOS DE FRUTOS DE CAFÉ DA VARIEDADE CATUAÍ EM 3 ESTÁDIOS DE MATURAÇÃO (CEREJA, PASSAS E SECO NO PÉ).....16

## RESUMO

Este trabalho visou o isolamento e a identificação de fungos de café da variedade Catuaí, procedentes da fazenda do IAPAR na cidade de Morretes, região litorânea do Paraná. Foram separados grãos de frutos em três estádios de maturação distintos. Colocaram-se 10 grãos de café por placa contendo meio BDA que foram incubadas em estufa de 3 a 5 dias a aproximadamente 28°C. Para identificação microscópica realizou-se a técnica do microcultivo. Cada amostra (estádio de maturação) foi composta por 400 grãos, totalizando 40 repetições por amostra. Foram isolados 9 gêneros de fungos, a saber: *Fusarium*, *Trichoderma*, *Curvularia*, *Bipolaris*, *Acremonium*, *Penicillium*, *Phoma*, *Rhizoctonia* e *Aspergillus*. O estágio cereja apresentou a menor frequência de fungos, diferindo de grãos passas e seco no pé. Grãos de frutos secos no pé e passas apresentaram alta frequência de *Fusarium* sp e foram os grãos a partir do qual se obteve uma bebida de pior qualidade, classificada pela prova da xícara como padrão de bebida “rio”. Grãos de frutos cereja apresentaram maior frequência de *Aspergillus carbonarius*, potencial produtor de micotoxinas.

PALAVRAS-CHAVE: café, estádios de maturação, fungos.

## 1. INTRODUÇÃO

O café é a bebida mais popular em todo o mundo. No Brasil, sua importância já data da época do império. A cultura estabeleceu-se no Brasil em 1727 com as primeiras exportações ocorrendo em 1731/32 e tornando-se expressivas a partir de 1802. Em 1849/50, a produção brasileira de café atingiu 40% da produção mundial. Chegou a contribuir isoladamente com 70% do valor de todas as exportações brasileiras no período de 1925/1929. Apesar da constante diversificação na pauta de exportações, o café constitui ainda hoje constitui um importante gerador de divisas, contribuindo com uma média anual de US\$ 2 bilhões para o nosso saldo comercial, nos últimos 10 anos (Embrapa, 2004).

A safra brasileira de 2003/2004 apresentou uma produção de 28.820 mil sacas de café, das quais 1.970 mil foram produzidas no Paraná. A segunda previsão da safra 2004/2005 de café no Brasil é de no mínimo 36.100 mil sacas e no máximo 40.465 mil sacas, das quais o Paraná será responsável pela produção de um mínimo de 2.350 mil sacas e um máximo de 2.550 mil sacas (ABIC, 2004).

A produção de café corresponde a grande parte das divisas brasileiras no comércio internacional e mesmo no comércio interno do país. O mercado de café sofre dificuldades com a qualidade de bebida devido a vários fatores relacionados aos tratamentos culturais.

A agricultura cafeeira brasileira ainda se caracteriza por utilizar defensivos agrícolas para o controle de pragas como *Hypothenemus hampei* entre outras, e por outro lado fatores ambientais favorecem o aparecimento de uma comunidade fúngica característica que contribui para a má qualidade da bebida como produto final devido aos metabólitos finais que interferem na classificação do café para sua circulação no comércio.

A coleta por derriça é uma prática cultural enraizada em nossa cultura cafeeira, mas atualmente a prática de coletas selecionadas de frutos em seus diversos estádios (cereja, passas e secos no pé) tem se difundido entre os produtores, fazendo com que produtos de boa qualidade se encontrem a disposição para uma faixa de mercado cada vez mais crescente.

Sendo assim, esse trabalho visa o isolamento, a identificação e a frequência de fungos em grãos processados provenientes de frutos de café em diferentes estádios de maturação, correlacionando a presença desses fungos com o sabor da bebida, além da

identificação dos fungos que tem potencial de produção de micotoxinas.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

O café tem com região de origem as montanhas etíopes no leste do continente africano onde plantas silvestres ainda existem em florestas primitivas. Sabe-se que os primeiros consumidores de café foram os etíopes que levaram o café à Arábia Saudita entre os séculos 13 e 15. O primeiro cultivo sistemático de café foi feito no Iêmen no Sul. Embora o consumo do café fosse proibido para os muçulmanos, pois se supunha que o café fosse tóxico, logo ele se espalhou para o mundo arábico. A bebida do café se estendeu do mundo arábico para a Turquia. O primeiro “coffee house” foi estabelecido em Constantinopla em 1554. Presumivelmente, o primeiro consumo de café na Europa se deu num “coffee house” na Itália, fundado em 1645 em Veneza. A Igreja, no entanto, em primeiro momento, desaprovou o seu consumo considerando-o como fermento do diabo, mas logo depois foi aprovado quando o papa Clemens VIII consumiu o café pela primeira vez e se entusiasmou com seu cheiro e sabor sendo que a partir daí se espalhou por toda a Europa (JOHN WILEY e SONS, 2002).

Até o fim do século 17 o café era apenas produzido na Arábia. Espiões holandeses, no entanto, roubaram grãos de café e o levaram para suas colônias no leste indiano. Ao mesmo tempo os holandeses levaram grãos de café ao jardim botânico de Amsterdã onde tentaram melhorar a qualidade do café com novas tecnologias de plantio. Em 1724, a cidade de Amsterdã presenteou um pequeno pé de café para Luiz XIV em Paris que o cultivou no Jardin des Plantes. Esta árvore serviu como base para a maioria das plantações ao redor no Mundo. Novas plantações de café foram fundadas em Martinique e Suriname em 1720, no Brasil em 1727, na Jamaica em 1730, nas Filipinas em 1740, em El Salvador em 1850 e na Guatemala em 1875 (JOHN WILEY e SONS, 2002).

As plantas de café são arbustos de até 4 m de altura, caule reto de casca cinzenta e rugosa. Copa cônica com ramos laterais pendentes. As folhas são onduladas nos bordos e de coloração verde-acinzentada quando jovens, verde-brilhante posteriormente. Possuem

flores brancas aglomeradas ao longo dos ramos, aromáticas e atrativas para abelhas. (BIBVIRT, 2004).

Possuem frutos com formas ovóides, verdes passando a vermelho e tornando-se preto de acordo com as fases de maturação. A casca é lisa e brilhante, contendo grãos de coloração acinzentada, branco-amarelada ou amarelo-esverdeada, envoltas por polpa branca, adocicada (BIBVIRT, 2004).

O cultivo se dá preferencialmente em regiões de clima ameno, não suportando geadas. Necessita de solos férteis, drenados e arejados. Desenvolve-se melhor em locais sombreados. Há muitas variedades e delas obtém-se os diversos sabores e aromas do café. Frutifica de maio a julho (BIBVIRT, 2004).

O café arábica é mais valorizado economicamente devido ao seu aroma e sabor. Ao longo dos séculos, diversas variedades foram plantadas em solo brasileiro, como o Bourbon. Atualmente as duas variedades de arábica mais cultivadas são Mundo Novo e Catuaí. A primeira tem esse nome porque teve origem na década de 1940, no município paulista de Mundo Novo, hoje chamado Urupês. Essa variedade foi criada pelo IAC (Instituto Agrônomo de Campinas). Uma das principais características do Mundo Novo é a alta produtividade de seus cafeeiros. Apesar dessa vantagem, o grande porte do Mundo Novo dificulta colheita. Devido a essa constatação, o IAC realizou novos estudos. O resultado foi o surgimento da variedade Catuaí, que significa "muito bom". Dentro desta variedade, existem duas linhagens: o Catuaí Vermelho e o Catuaí Amarelo.

A determinação da bebida do café é realizada através do teste sensorial, conhecido como "prova de xícara", que é uma prova subjetiva onde provadores treinados distinguem diferentes padrões de bebida. Esta é realizada com o café preparado para ser degustado, onde é avaliado quanto ao seu sabor e aroma. Tecnicamente, a classificação oficial do café pela bebida, denominados padrões de bebida, recebem as seguintes denominações: 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. São

denominações técnicas que mostram a variedade de sabor e qualidade e que interferem também na cotação do seu preço no mercado (CARVALHO, 1999).

Os compostos fenólicos estão presentes em todos os vegetais e compreendem um grupo heterogêneo de substâncias, umas com estruturas químicas relativamente simples e outras complexas, como taninos e ligninas. No café, esses compostos contribuem de maneira altamente significativa para o sabor e o aroma do produto final. Vários autores afirmam haver nos frutos de café alto teor desses componentes fenólicos, em particular de ácido clorogênico. Os compostos fenólicos são responsáveis pela adstringência dos frutos; no caso do café, interferem no seu sabor (PIMENTA e VILELA, 2002). Em trabalho realizado por CARVALHO et al. (1989) foram encontrados teores médios de 8,37 e 9,66% para frutos colhidos no estágio cereja e mistura de frutos, respectivamente. Segundo os autores, esses resultados mostram que os frutos verdes e semimaduros contribuíram para maior teor de compostos fenólicos totais dos frutos colhidos por derriça no pano.

CARVALHO et al. (1994) verificaram haver variações na atividade de polifenoloxidase, que permitem separar as classes de bebida com base nas atividades dessas enzimas, mostrando para o café de bebida "riado e rio" atividades inferiores a 55,99 u/min/g de amostra; nos cafés de bebida "dura", de 55,99 a 62,99 u/min/g de amostra; nos cafés de bebida "apenas mole", de 62,99 a 67,66 u/min/g de amostra; e nos cafés de bebida "estritamente mole", de 67,66 a 74,66 u/min/g de amostra. Constataram, assim, aumento significativo na atividade da polifenoloxidase à medida que o café se apresenta de melhor qualidade.

O *Hypothenemus hampei*, broca-do-café, ataca os frutos de todas as espécies de café dos diferentes estádios, desde os verdes até os secos. Os danos provocados diretamente, através da queda de frutos, perda de peso e do tipo na classificação, como indiretamente, resultam em grandes perdas na produtividade e qualidade do produto. A importância dos prejuízos causados pelos danos indiretos é devido ao fato do seu ataque proporcionar uma porta de entrada para microrganismos que se desenvolvem quando as condições são favoráveis, atingindo os grãos e alterando a qualidade do café (CHALFOUN et al., 1984).

A maior parte do café brasileiro produzido tem apresentado "gosto rio ou riado", o qual confere sabor desagradável ao produto. Sabor descrito como fenólico iodo ou medicinal e confere um forte aroma, o qual pode ser conferido pela presença e ação de

microrganismos, principalmente fungos e bactérias (DENTAN, 1989; LIARDON et al., 1989; LIARDON et al., 1991).

O café, assim como outras culturas, está sujeito a contaminação e conseqüente colonização por microrganismos durante diferentes fases de desenvolvimento, colheita, preparação, transporte e armazenamento. A ação prejudicial de microrganismos em relação à qualidade do produto final vai depender das condições ambientais assim como colheita e gerenciamento do produto. Estudos da microbiologia de grãos de café têm mostrado que os principais gêneros de fungos toxigênicos (*Aspergillus* sp, *Penicillium* sp e *Fusarium* sp) são contaminantes naturais do café e estão presentes desde o campo até o depósito (MISLIVEC et al., 1983; NAKAJIMA et al., 1997; SILVA et al., 2000).

A alta umidade relativa do ar e a alta temperatura podem acelerar a senescência dos frutos, propiciando infecção e crescimento de microrganismos, comprometendo a qualidade da bebida do café. As condições climáticas e a flora microbiana predominantes são consideradas alguns dos fatores responsáveis pela melhor ou pior qualidade do café (CHALFOUN, 1996).

Segundo CAMARGO et al. (1992) a umidade do ambiente pode levar à alteração da composição química da mucilagem do café e determinar o tipo de atividade microbiana e intensidade do processo fermentativo. Também temperaturas elevadas, superamadurecimento, passagem rápida do estágio verde para o seco (seco anormal), queda prematura dos frutos ao solo devido ao ataque de pragas e doenças e a prolongada permanência dos frutos secos na planta, são fatores favorecedores da fermentação e infecção microbiana, a qual interfere na bebida e qualidade de cafés (KRUG, 1947; BITTENCOURT, 1957; FRANCO, 1960; WOSIACKI, 1971; CHALFOUN et al, 1984; CARVALHO e CHALFOUN, 1985; 1989; MEIRELES, 1990).

Várias pesquisas têm demonstrado que as espécies de fungos encontradas com maior freqüência em cafés brasileiros pertencem aos gêneros *Cladosporium*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Colletotrichum*, *Rhizopus* e *Mucor* (KRUG, 1940; WOSIACK, 1971; CHALFOUN e CARVALHO, 1985; MEIRELLES, 1990; ALVES, 1996; FREITAS, 2000; BATISTA, 2000).

De acordo com SOUZA e CARVALHO (1997), a qualidade do café pode ser alterada por diversos fatores; dentre estes, a presença de microrganismos nas fases pré e pós-colheita tem importância fundamental no processo de degradação de componentes dos frutos, principalmente açúcares, afetando negativamente a qualidade final do produto. BITANCOURT (1957) observou que há necessidade de uma ruptura ou injúria na película dos frutos para que os microrganismos possam entrar no grão de café. Uma vez que os microrganismos adentrem os frutos do café, inicia-se o processo de fermentação e liberação de substâncias tóxicas, as quais irão penetrar no grão propriamente dito, alterando as suas qualidades. ALVES et al. (1996) observaram maior incidência do gênero *Fusarium* sp. nos frutos na fase cereja, passa, seco no pé, e no chão. *Cladosporium* sp., foi identificado em frutos passas e secos no pé e o gênero *Penicillium* sp. nos frutos coletados no chão e em grãos beneficiados armazenados. As espécies *Aspergillus niger* e *Aspergillus ochraceus* foram identificadas nos frutos passa, seco no pé e chão, mas a maior incidência ocorreu em grãos beneficiados. Houve relação entre os fungos *Fusarium*, *A. niger* e *A. ochraceus* com bebida de qualidade ruim, enquanto a presença de *Cladosporium cladosporioides*, principalmente nos grãos beneficiados, esteve sempre associada à bebida de boa qualidade. CHAULFON et al. (1997), examinando a microflora existente em grãos beneficiados de café provenientes de diversos municípios da região sul de Minas Gerais, constataram que em 100% dos grãos analisados houve contaminação externa (MARTINS et al., 2001).

Quanto à contaminação interna dos grãos, esse percentual foi significativamente menor (23%). Os fungos componentes da microflora dos grãos de café beneficiados foram *Fusarium* sp., *Penicillium* sp., *Aspergillus niger* e *Aspergillus ochraceus*. NERY-SILVA et al. (1998) realizaram avaliações de microrganismos presentes em grãos beneficiados e frutos de café nas fases pré e pós-colheita, relacionando-os com a qualidade final de bebida. Na fase pré-colheita, os fungos identificados foram *Alternaria alternata*, *Cercospora coffeicola*, *Cladosporium cladosporioides*, *Fusarium roseum* e *Colletotrichum gloeosporioides*. Nas avaliações pós-colheita foram observados os mesmos fungos, com exceção de *Alternaria alternata*, porém todos com baixa incidência. Ainda nas avaliações de pós-colheita, foram identificados fungos dos gêneros *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp., evidenciando o fato de serem fungos de armazenamento. As características químicas avaliadas permitiram aos autores classificar o tipo de bebida como "Mole", confirmando os

resultados obtidos por outros autores no que diz respeito à associação de *Cladosporium cladosporioides*, principalmente na fase de pré-colheita, com qualidade melhor de bebida. LOPES et al. (1999) avaliaram os frutos secos e armazenados em coco provenientes de sete cultivares diferentes de café, na região sul de Minas Gerais. Foram identificados os seguintes fungos: *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus*, *Fusarium roseum*, *Fusarium* sp., *Penicillium* sp. e *Cladosporium* sp. Dentre eles, *A. niger* foi o que apresentou maior ocorrência, evidenciando alguma forma de resistência em determinadas cultivares. Em experimento realizado por CHAULFON et al. (1999), foi observada alta incidência de *Fusarium roseum*, *Penicillium* sp., *Aspergillus niger* e *Aspergillus ochraceus* em contaminação interna dos grãos beneficiados de café. Esses fungos são comprovadamente danosos à qualidade final da bebida; desse modo, os autores ressaltam a importância da identificação dos metabólitos produzidos por esses fungos, além dos problemas de manejo nas fases de pré e pós-colheita, que permitem a invasão dos tecidos internos dos grãos de café. TANIWAKI et al. (2000) encontraram *Aspergillus ochraceus* e *Aspergillus carbonarius* em amostras de café coletadas em terreiro e na tulha, sendo este último encontrado somente nas amostras provenientes do oeste do Estado de São Paulo. Esses dois fungos são potenciais produtores de ocratoxina A, entretanto as análises mostraram que os níveis desta toxina ficaram sempre abaixo do limite aceitável (MARTINS et al., 2001).

Estudos realizados por CABRERA et al. (2004) com *Aspergillus ochraceus* durante o armazenamento do café demonstraram que as condições ambientais tais como a umidade e a variação da temperatura em ciclos de 12 horas influenciam na produção de ocratoxina A (OTA). Em umidades relativas mais altas a produção de OTA foi maior após diferentes dias de incubação. Em temperaturas alternadas a produção de OTA foi maior que em temperatura constante.

Deve-se considerar que o desenvolvimento de fungos toxigênicos e a produção de metabólitos tóxicos depende, entre outros fatores, da composição química do substrato (SCUSSEL, 1998).

BUCHANAN et al. (1981) estudando os efeitos da cafeína sobre o crescimento dos fungos *Aspergillus ochraceus* e seis espécies toxigênicas de *Aspergillus* e *Penicillium*, verificaram que a cafeína teve pequeno efeito sobre o crescimento inicial dos fungos, mas

quando esses entraram na fase estacionária de crescimento, houve um decréscimo na massa micelial, proporcional à dose de cafeína testada. Por outro lado, BUCHANAN et al. (1983) sugeriram que pesquisas prévias sobre a produção de aflatoxina e ocratoxina A sugerem que enquanto a cafeína pode inibir ambos, crescimento do fungo e produção de micotoxina, os dois processos podem não estar diretamente relacionados.

Por exemplo, com *A parasiticus*, *A ochraceus* e *A versicolor*, ambos crescimento e síntese de toxina foram extremamente afetados, enquanto o crescimento de *P citrinum* foi inibido, os efeitos antimicotoxigênicos foram limitados primariamente ao retardamento da síntese. Inversamente, *P urticae* foi relativamente resistente à inibição do crescimento, mas a produção de patulina foi acentuadamente suprimida pela cafeína (CHALFOUN et al., 2000).

Todas espécies do gênero *Aspergillus* tiveram seu crescimento micelial significativamente reduzido por concentrações crescentes de cafeína, com uma tendência a uma maior inibição nas maiores concentrações, aos 10 dias após a inoculação (CHALFOUN et al., 2000).

De acordo com CHALFOUN et al. (2000), após 10 dias, observou-se uma tendência, de significativo aumento no crescimento micelial, principalmente nas concentrações inferiores de cafeína, o que pode ser atribuído, entre outros fatores, à capacidade de degradação da cafeína pelos fungos testados.

De acordo com CHALFOUN et al. (2000), o fungo *Cladosporium cladosporioides* mostrou-se totalmente inibido pelas diferentes concentrações de cafeína, tal fato justifica a baixa frequência desse fungo em cafés beneficiados indicando a baixa capacidade do fungo de invasão no interior dos grãos e o fato de que o mesmo parece não afetar a qualidade do café conforme CARVALHO et. al; ALVES, (1996).

O fungo *Fusarium* sp foi totalmente inibido pelas doses de 1,0% e 2,0% de cafeína encontradas respectivamente em *Coffea arabica* e *Coffea canephora* justificando, a grande redução de incidência de fungos desse gênero em grãos beneficiados em relação a fungos de gêneros como *Aspergillus*, que são classificados como fungos de armazenamento (CHALFOUN et al., 2000).

Quanto maior for o tempo de permanência do café na lavoura (na árvore ou no chão), após a maturação, maior será a incidência de grãos ardidos e pretos, considerados, juntamente com os verdes, os piores defeitos do café. Dessa forma, a colheita deve ser iniciada quando a maior parte dos frutos (90%) estiver madura e antes que se inicie a queda desses frutos. Esse período de colheita acontece, em média, sete meses após a floração, a qual, por sua vez, ocorre por ocasião das primeiras chuvas (SILVA, 1999).

Em trabalho realizado por PIMENTA e VILELA (2003) demonstrou-se que com a elevação no tempo de espera para secagem houve um aumento na infecção por *Fusarium* sp, *Aspergillus niger* e *Aspergillus ochraceus* nos frutos antes da secagem, diminuição da infecção por *Cladosporium* sp nos frutos e grãos, *Penicillium* sp e *Fusarium* sp nos grãos, com *Aspergillus niger* e *Aspergillus ochraceus* não mostrando variação definida nos grãos, porém, com valores elevados em ambos. Considerando-se os níveis de ochratoxina A, não foi detectada presença em nenhum dos tempos de espera para secagem analisados.

### 3. OBJETIVOS

- Isolar e identificar fungos associados aos grãos de café em diferentes estádios de maturação (cereja, passas e seco no pé) da variedade Catuaí, produzido fazenda do Instituto Agrônomo do Paraná na cidade de Morretes, na região litorânea do Estado do Paraná.

### 4. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 4.1 MEIOS DE CULTURA

##### 4.1.1 Meio batata – Dextrose – Agar (BDA)

BDA.....	39g
Água destilada.....	1000mL

O meio foi preparado de acordo com a indicação do fabricante constado no rótulo. Posteriormente foi esterilizado em autoclave a 121°C por 20 minutos.

## 4.2 SOLUÇÕES

### 4.2.1 Solução de “Tween 80” 0,1%

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

## 4.3 CORANTE E CLAREADOR

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

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

Os cristais de fenol foram fundidos me banho-maria, sendo os compostos adicionados em seguida. Esperou-se 24 horas e a solução foi filtrada.

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

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

#### 4.4 MATERIAL BIOLÓGICO

Os fungos foram isolados de amostras compostas por grãos de café da variedade Catuaí. Os frutos foram coletados na fazenda do Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR) na cidade de Morretes, Estado do Paraná, na safra 2004/2005.

Posteriormente sofreram despolpa e foram secos em peneiras, na cidade de Curitiba. Foram obtidas três amostras, cada uma referente a um estágio de maturação. Foi separada em 400 grãos no estágio de cereja, passas e seco no pé totalizando 1200 grãos.

#### 4.5 ISOLAMENTO DOS FUNGOS

A determinação da população fúngica foi realizada pela contagem dos fungos que contaminaram os grãos. O método consistiu em se colocar 10 grãos em placas de Petri, contendo meio BDA (Agar-Batata-Dextrose) adicionado do antibiótico Tetraciclina (100µg/ml) para inibir o crescimento de bactérias.

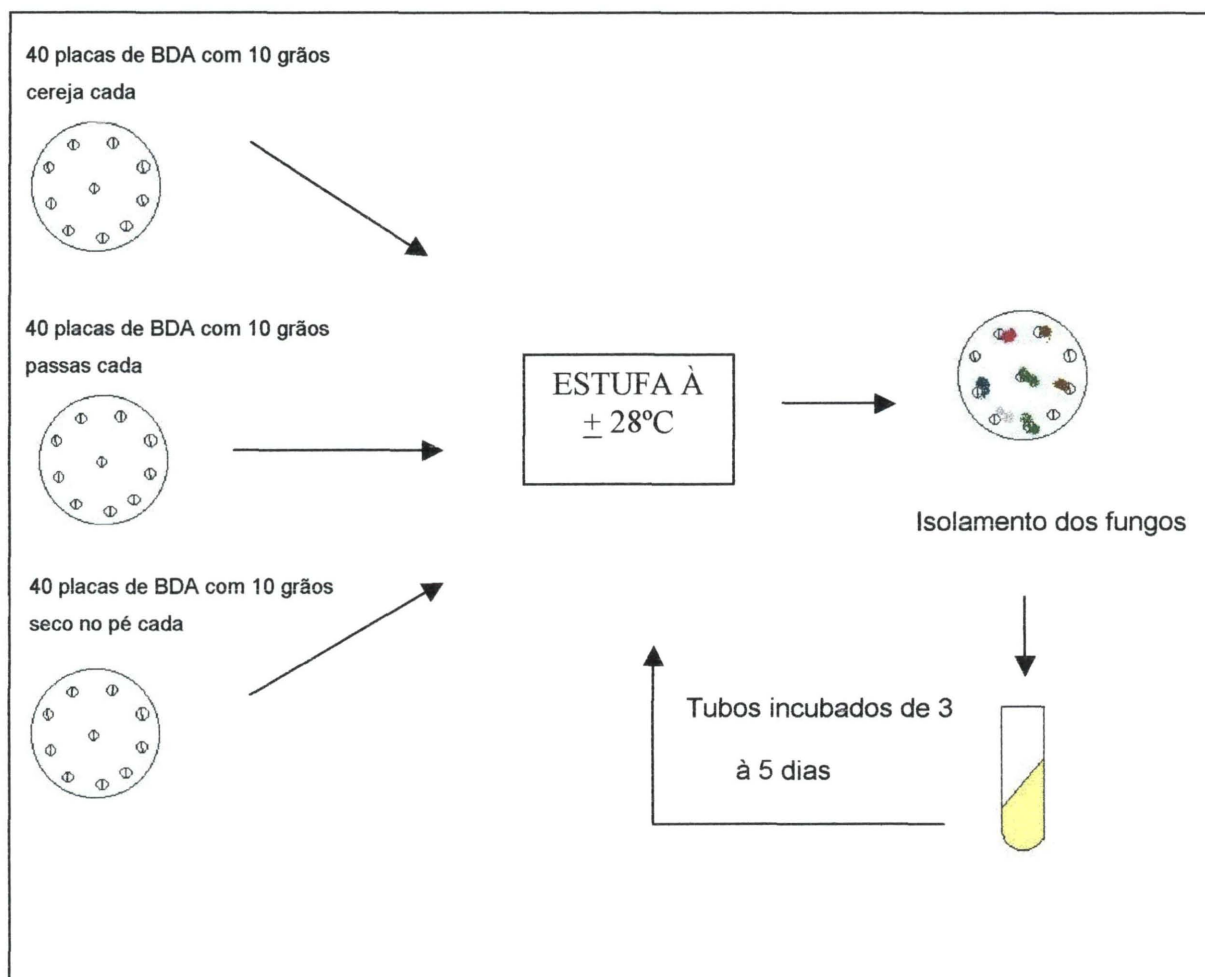
Após a distribuição dos grãos, as placas foram incubadas em estufa, a uma temperatura em torno de 28° C de 3 a 5 dias. As leituras foram realizadas a partir do terceiro dia, ou até que houvesse o desenvolvimento das colônias fúngicas.

O isolamento dos fungos foi realizado repicando-se as colônias em tubos de ensaio de 18cm X 18mm. Em seguida os tubos foram incubados em estufa com temperatura em torno de 28°C num período de 3 a 5 dias. Em seguida os tubos foram estocados em geladeira para a futura identificação.

#### 4.6 PURIFICAÇÃO DOS ISOLADOS

Os isolados foram primeiramente purificados em solução de “Tween 80” 0,1%. Este método consistiu em retirar um pouco do micélio do fungo isolado e colocá-lo em um tubo de ensaio contendo 2,0ml de “tween 80” 0,1% esterilizado. Em seguida o tubo foi agitado em um agitador de tubos por 3 minutos e depois adicionado em placa de Petri contendo meio de cultura BDA, numa quantidade de 100ul. A técnica de semeadura foi utilizada para uniformização da solução por toda a placa. As placas foram incubadas à 28°C em estufa incubadora por aproximadamente 7 dias (dependente da taxa de germinação dos esporos).

FIGURA 1 – ISOLAMENTO DOS FUNGOS EM GRÃOS DE FRUTOS DE CAFÉ DA VARIEDADE CATUAÍ EM TRÊS DIFERENTES ESTÁGIOS DE MATURAÇÃO (CEREJA, PASSAS E SECO NO PÉ).



#### 4.7 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS

A identificação dos fungos foi realizada mediante a observação macroscópica de suas colônias e microscópicas de suas estruturas de reprodução sexuada e assexuada, de acordo com BARNETT (1987), complementada por SILVEIRA (1981). Para tanto, foi realizada a técnica do microcultivo (KERN e BLEVINS, 1999).

#### 4.7.1 Técnica do microcultivo:

Para esta técnica foram utilizadas placas de Petri esterilizadas, contendo em seu interior uma lâmina e um pedaço de algodão. Um cubo de aproximadamente  $1\text{cm}^3$  de meio de cultura BDA foi cortado e colocado sobre a lâmina contida no interior da placa. Repicou-se o fungo em todos os lados do cubo, o qual foi posteriormente coberto por uma lamínula esterilizada. O algodão no interior foi umedecido com água destilada esterilizada e a placa foi incubada em estufa incubadora por 7 a 14 dias a aproximadamente  $28^\circ\text{C}$ . Após o tempo determinado, a lamínula foi retirada e colocada sobre outra lâmina limpa contendo uma gota de Lactofenol azul de algodão ou Lactofenol de Amann, sendo as bordas vedadas com esmalte. As lâminas preparadas foram observadas em microscópio óptico.

#### 4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey, teste com o qual se faz uma comparação entre as médias obtidas para verificar se os dados obtidos apresentam ou não diferenças significativas entre eles (PIMENTEL GOMES, 1985).

Neste experimento, no qual utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado (DIC), foram comparados três tratamentos referentes ao estágio de maturação do café (cereja, passas e seco no pé) tendo como variável o número de fungos. Foram também comparados os fungos dentro de cada estágio de maturação. As repetições em cada tratamento eram compostas por 10 grãos de café. Foram analisados 400 grãos para cada estágio de maturação (tratamento), ou seja, 40 repetições, totalizando 120 repetições.

Os dados foram transformados para  $\log(x+2)$  para a realização da análise de variância.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi isolado um total de 592 fungos dos grãos de café oriundos de frutos de três diferentes estádios de maturação. No estágio cereja foram isolados 151 fungos, separados em 6 gêneros distintos, no estágio passas foram isolados 205 fungos de 9 diferentes gêneros e no estágio seco no pé, um total de 236 fungos pertencentes a 4 gêneros distintos. Os fungos isolados de grãos de frutos seco no pé foram *Fusarium* sp, *Rhizoctonia* sp, *Trichoderma* sp e *Aspergillus carbonarius*, em grãos de frutos passas foram *Fusarium* sp, *Trichoderma* sp, *Curvularia* sp, *Bipolaris* sp, *Acremonium* sp, *Penicillium* sp, *Phoma* sp, *Rhizoctonia* sp e *Aspergillus carbonarius*. Em grãos de frutos cereja foram isolados: *Aspergillus carbonarius*, *Fusarium* sp, *Trichoderma* sp, *Penicillium* sp, *Rhizoctonia* sp e *Curvularia* sp (TABELA 1).

TABELA 1 – FUNGOS ISOLADOS E FREQUÊNCIA RELATIVA (%) DA OCORRÊNCIA DE FUNGOS EM RELAÇÃO AO NÚMERO TOTAL DE SEMENTES DE CAFÉ DA VARIEDADE CATUAÍ, EM TRÊS ESTÁDIOS DE MATURAÇÃO DISTINTOS (CEREJA, PASSAS E SECO NO PÉ).

FUNGOS	Cereja		Passas		Seco no pé	
	N	%	N	%	N	%
<i>A carbonarius</i>	46	11,50	10	2,50	5	1,25
<i>Fusarium</i> sp	35	8,75	101	25,25	172	43,00
<i>Trichoderma</i> sp	12	3,00	32	8,00	12	3,00
<i>Penicillium</i> sp	13	3,25	4	1,00	-	-
<i>Rhizoctonia</i> sp	11	2,75	3	0,75	33	8,25
<i>Curvularia</i> sp	2	0,50	11	2,75	-	-
<i>Bipolaris</i> sp	-	-	12	3,00	-	-
<i>Acremonium</i> sp	-	-	8	2,00	-	-
<i>Phoma</i> sp	-	-	2	0,50	-	-
Não identificados	32	8,00	22	5,50	14	3,50
<i>Total</i>	151	37,75	205	51,25	236	59,00
<i>Nº de gêneros</i>	6		9		4	

N = nº de fungos isolados em amostra contendo 400 grãos de café.

Os tratamentos foram analisados estatisticamente por análise de variância, demonstrando haver diferença significativa no número total de fungos entre os estádios de maturação cereja, passas e seco no pé (ANEXO A). Através do teste de Tukey, pelo qual se fez a comparação das médias entre cada estágio de maturação, observou-se que os grãos cereja, que apresentaram menor incidência de fungos (TABELA 1), apresentaram

diferenças significativas com grãos passas e seco no pé, sendo que estes dois últimos não diferiram entre eles (ANEXO L). Para PIMENTA (1995), o estágio cereja representa o ponto ótimo de maturação do café, em que toda composição química dos frutos encontra em seu valor máximo, principalmente açúcares e pectinas, que se encontram presentes na casca, mucilagem e sementes e podem contribuir para uma melhor qualidade do produto.

Determinou-se a qualidade da bebida de café das amostras através da realização da “prova de xícara”, realizado no Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR), com sede em Londrina.

A determinação da bebida do café realizada através do teste sensorial, conhecido como “prova de xícara” é uma prova subjetiva onde provadores treinados distinguem diferentes padrões de bebida. Esta é realizada com o café preparado para ser degustado, onde é avaliado quanto ao seu sabor e aroma. Tecnicamente, a classificação oficial do café pela bebida, denominados padrões de bebida, recebem as seguintes denominações: 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. São denominações técnicas que mostram a variedade de sabor e qualidade e que interferem também na cotação do seu preço no mercado (CARVALHO, 1999). Classificou-se, no Instituto Agrônomo do Paraná, a bebida de café oriundo de grãos de frutos em estágio cereja, das amostras em estudo, como “duro” com sabor de velho. A bebida feita a partir dos grãos passas e seco no pé das amostras analisadas foram classificadas como padrão de bebida “rio”. O padrão de bebida “duro” do café cereja pode estar relacionado à presença de fungos, que diminuem a qualidade dos grãos e conseqüentemente da bebida do café. O padrão de bebida “rio” do café, oriundo dos grãos de café passas e seco no pé, representa uma pior qualidade do café, que pode estar relacionado com a maior incidência de fungos observados nestes dois estádios, comparando-as com a amostra de grãos de frutos de café cereja.

Diversos autores realizaram trabalhos demonstrando que a maior parte do café brasileiro produzido tem apresentado “gosto rio ou riada”, o qual confere sabor

desagradável ao produto. Sabor descrito como fenólico iodo ou medicinal e confere um forte aroma, o qual pode ser conferido pela presença e ação de microrganismos, principalmente fungos e bactérias (DENTAN, 1989; LIARDON et al., 1989; LIARDON et al., 1991).

Realizou-se também a análise variância para cada gênero (ANEXOS B à K) entre os três diferentes estádios de maturação, sendo posteriormente realizado o teste de Tukey para comparação entre as médias (TABELA 2 e 3).

TABELA 2 – MÉDIA DA OCORRÊNCIA DOS FUNGOS *ASPERGILLUS CARBONARIUS*, *FUSARIUM* SP, *TRICHODERMA* SP, *PENICILLIUM* SP E *RHIZOCTONIA* SP EM GRÃOS DE FRUTOS DE CAFÉ DA VARIEDADE CATUAÍ EM 3 ESTÁDIOS DE MATURAÇÃO (CEREJA, PASSAS E SECO NO PÉ).

Estádio de maturação	FUNGOS				
	<i>A carbonarius</i>	<i>Fusarium</i> sp	<i>Trichoderma</i> sp	<i>Penicillium</i> sp	<i>Rhizoctonia</i> sp
Cereja	0,481 a	0,443 c	0,351 b	0,351a	0,347 b
Passas	0,342 b	0,627 b	0,429 a	0,317 a b	0,314 b
Seco no pé	0,323 b	0,753 a	0,353 b	0,301 b	0,439 a
CV %	24,88	28,26	27,19	22,08	23,1

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

TABELA 3 – MÉDIA DA OCORRÊNCIA DOS FUNGOS *CURVULARIA* SP, *BIPOLARIS* SP, *ACREMINIUM* SP, *PHOMA* SP E FUNGOS NÃO IDENTIFICADOS EM GRÃOS DE FRUTOS DE CAFÉ DA VARIEDADE CATUAÍ EM 3 ESTÁDIOS DE MATURAÇÃO (CEREJA, PASSAS E SECO NO PÉ).

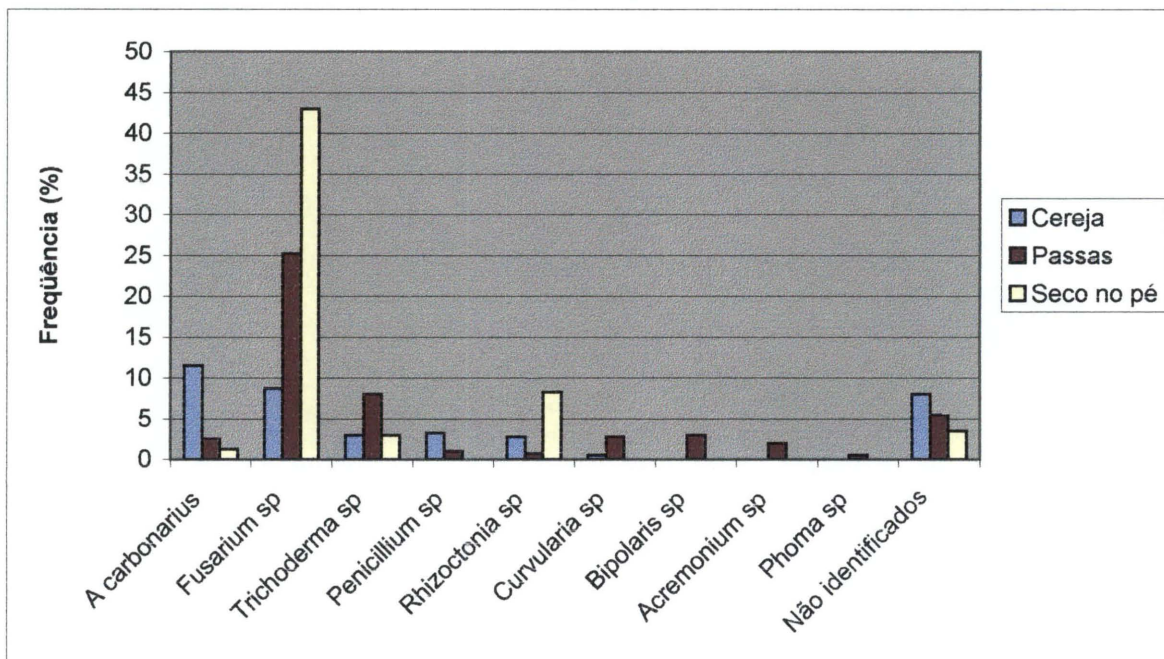
Estádio de maturação	FUNGOS				
	<i>Curvularia</i> sp	<i>Bipolaris</i> sp	<i>Acremonium</i> sp	<i>Phoma</i> sp	Não identificados
Cereja	0,310 b	0,301 b	0,301 b	0,301 a	0,431 a
Passas	0,347 a	0,351 a	0,333 a	0,310 a	0,385 a
Seco no pé	0,301 b	0,301 b	0,301 b	0,301 a	0,353 a
CV %	17,69	16,95	15,49	7,38	30,97

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

Nos três estádios de maturação foram isolados *Aspergillus carbonarius*, encontrado com 11,50% de frequência em grãos de frutos cereja, 2,50% em grãos de frutos passa e 1,25% em grãos de frutos seco no pé. (TABELA 1 e GRÁFICO 1). Com relação à presença

de *Aspergillus carbonarius*, grãos de frutos cereja apresentaram diferenças significativas dos grãos de frutos passas e dos grãos de frutos secos no pé (TABELA 2). Dentro do estádio cereja, *Aspergillus carbonarius* foi o fungo com maior frequência, apenas não apresentando diferença significativa com *Fusarium* sp. O *Aspergillus carbonarius* é um potencial produtor de ocratoxina A (OTA), uma micotoxina nefrotóxica e nefrocarcinogênica (PITT, 2000), a qual já foi detectada em diversos alimentos, como cereais, nozes, vinhos, cerveja e também café. A ocorrência da OTA em sementes de café já foi observada por diversos autores, mas várias inconsistências são encontradas em literatura no que diz respeito à influência do processamento do café na concentração de OTA (PITTET *et al.*, 1996); um recente estudo mostrou que mais de 80% da OTA encontrada em grãos de café é destruída durante o seu processamento sob condições industriais (BLANC *et al.*, 1998). Além disso, deve-se considerar que o desenvolvimento de fungos toxigênicos e a produção de metabólitos tóxicos depende, entre outros fatores, da composição química do substrato (SCUSSEL, 1998), já que certas substâncias como a cafeína pode inibir substancialmente a produção de micotoxinas. Também de acordo com VINING (1990), a formação do metabólito secundário está sujeito ao controle fisiológico geral que responde a fatores ambientais. Há muitas evidências que o metabolismo secundário tem menor prioridade que o crescimento na hierarquia da regulação. Quando um meio de cultura é rico, com nutrientes balanceados, microorganismos tipo selvagem não realizam o metabolismo secundário ou seu potencial é reduzido.

GRÁFICO 1 – DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA DE FUNGOS DE CAFÉ DA VARIEDADE CATUAÍ, ISOLADOS NOS TRÊS ESTÁDIOS DE MATURAÇÃO (CEREJA, PASSAS E SECO NO PÉ).



*Fusarium sp*, apresentou uma frequência de 43,00% em grãos de frutos seco no pé, 25,25% em grãos de frutos passas e 8,75% em grãos de frutos cereja (TABELA 1 e GRÁFICO 1). Todos os estádios diferiram significativamente entre eles (TABELA 2). Foi o fungo com maior frequência em grãos de frutos passas e seco no pé e a segunda maior frequência em grãos de frutos cereja, apresentando diferenças com todos os fungos dentro de cada estágio de maturação, exceto com *Aspergillus carbonarius* no estágio de frutos cereja. Esta alta frequência em grãos de frutos seco no pé pode se dar devido ao fato de os fungos do gênero *Fusarium* adaptarem-se à escassez de substrato, visto que este já não se encontra em abundância neste estágio de maturação. ALVES et al. (1996) observaram alta incidência de *Fusarium sp* nos frutos na fase cereja, passa, seco no pé, e no chão e observou que houve relação entre os fungos *Fusarium*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus ochraceus* com bebida de qualidade ruim. Neste experimento pode-se verificar também que houve relação de *Fusarium sp* com bebida de qualidade ruim, visto que grãos passas e seco no pé apresentaram alta frequência de fungos do gênero *Fusarium* e foram classificados como um

padrão de bebida “rio”. Estudos da microbiologia de grãos de café têm mostrado que os principais gêneros de fungos toxigênicos (*Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*) são contaminantes naturais do café e estão presentes desde o campo até o depósito (MISLIVEC et al., 1983; NAKAJIMA et al., 1997; SILVA et al., 2000). De acordo com RYU et al. (2000), mudanças drásticas na temperatura podem causar estresse metabólico em algumas espécies de *Fusarium*, resultando em aumento na produção da micotoxina fumonisina.

*Rhizoctonia* sp foi encontrado com maior frequência (8,25%) em grãos de frutos secos no pé (TABELA 1 e GRÁFICO 1), com diferenças significativas entre os outros dois estádios. Grãos do estádio cereja e passas não apresentaram diferenças entre eles (TABELA 2). Esta frequência (8,25%) foi a segunda maior evidenciada neste estádio de maturação, diferindo significativamente de todos os outros fungos neste estádio de maturação. Não foram encontrados em literatura estudos que demonstrem a presença de *Rhizoctonia* sp e uma possível relação com a qualidade da bebida do café. *Rhizoctonia* sp é reportada como agente causador da doença rizoctoniose cuja ação se dá somente em plantas na fase de viveiro ou até um ano após o plantio e que acaba geralmente matando o cafeeiro.

*Phoma* sp, *Acremonium* sp e *Bipolaris* sp foram apenas observados em grãos de frutos passas com baixa frequência (TABELA 1), todos eles apresentando diferença significativa de *Fusarium* sp e *Trichoderma* sp. Não foram encontrados trabalhos que relacionassem *Phoma* sp, *Acremonium* sp ou *Bipolaris* sp com a qualidade da bebida do café. O fungo *Phoma* sp além de ser encontrado em frutos, pode ser encontrados em galhos e folhas do cafeeiro. Em decorrência do ataque de phoma, tem início uma intensa queda de folhas, queda de frutos novos e ressecamento de ramos.

*Penicillium* sp obteve frequência de 3,25% em grãos de frutos cereja e 1,00% em grãos de frutos passas (TABELA 1). Observou-se apenas diferença significativa entre cereja e seco no pé (TABELA 2). Apresentou diferenças significativas com *Fusarium* sp e *Trichoderma* sp no estádio de grãos passas e com *Fusarium* sp e *Aspergillus carbonarius* em grãos cereja. Alves et al. (1996) encontrou o gênero *Penicillium* em frutos coletados no chão e em café beneficiado e armazenado, demonstrando o fato de *Penicillium* sp ser um fungo de armazenamento. Dessa forma esta baixa frequência pode ser explicada pelo fato de estes grãos não terem sido armazenados.

*Curvularia* sp apresentou uma frequência de 2,75% em grãos de frutos passas e

0,50% em grãos de frutos cereja (TABELA 1). Observou-se uma diferença significativa dos grãos de frutos em estágio passas com cereja e seco no pé (TABELA 3). Dentro do estágio passas observou-se diferenças com *Fusarium* sp e *Trichoderma* sp e no estágio cereja apresentou diferenças com *Aspergillus carbonarius* e *Fusarium* sp. Não foram encontrados estudos que relatem haver uma relação entre o sabor da bebida do café e a presença de *Curvularia* sp.

Por fim *Trichoderma* sp, que foi observado com uma frequência de 3,00% em grãos de frutos cereja, 8,00% em grãos de frutos passas e 3,00% em grãos de frutos seco no pé (TABELA 1). Com relação à presença de *Trichoderma* sp, grãos de frutos passas apresentaram diferenças significativas com grãos de frutos cereja e seco no pé (TABELA 2). Dentro do estágio passas, é o fungo com a segunda maior frequência, apresentando diferenças significativas com os outros fungos identificados. Algumas espécies de *Trichoderma* têm sido reportados como parasitas de outros fungos, competindo agressivamente por nutrientes e produzindo antibióticos. (KLEIN e EVELEIGH, 1998). Não foram encontrados estudos relacionados à presença de *Trichoderma* sp e sua relação com sabor da bebida do café.

## 6. CONCLUSÕES

- O estágio cereja apresentou diferenças significativas com o estágio passas e seco no pé com relação ao total de fungos isolados em cada estágio de maturação do café, apresentando a menor frequência de fungos isolados e obtendo a melhor qualidade de bebida.
- Grãos do estágio cereja apresentaram a maior frequência de *Aspergillus carbonarius*, potencial produtor de ocratoxina A.
- Observou-se uma relação entre a alta frequência do gênero *Fusarium* e qualidade do café em grãos passas e seco no pé, uma vez que bebidas preparadas a partir destas mesmas amostras foram classificadas como padrão de bebida “rio”.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIC. Estatísticas Produção agrícola. Disponível em: <http://www.abic.com.br>. Acesso em: 27 Set. 2004.

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

ALVES, E.; CASTRO, H.A. GIANASE, L. **Dinâmica de população fúngica associada ao café (*Coffea arabica* L.) nas fases pré e pós colheita, na região de Lavras e sua relação com a qualidade da bebida**. In: Congresso Brasileiro de Fitopatologia, XXIX, Campo Grande, 1996. Fitopatologia Brasileira, Brasília, vol. 21 (suplemento), p. 345. 1996.

BARNETT, H. L. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 2<sup>nd</sup> ed. Minneapolis: Burgess, 1962

BATISTA, L.R. **Identificação, potencial toxigênica e produção de micotoxinas de fungos associados a grãos de café (*Coffea arabica* L.)**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2000. 188p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos).

BLANC, M., PITTET, A., MUNOZ-BOX, R., VIANI, R., 1998. **Behavior of ochratoxin A during green coffee roasting and soluble coffee manufacture**. J. Agric. Food Chem. 46, 673-675.

BITANCOURT, A.A. **O tratamento das cerejas de café para melhorar a bebida**. O Biológico, São Paulo, vol. 23, n. 1, p. 1-11. 1957.

BUCHANAN, R. L.; HARRY, M. A.; GEALT, M. A. **Caffeine inhibition of steigmatocystin, citrinin, and patulin production**. Journal of Food Science, Chicago, v. 48, p. 1226-1228, 1983.

CABRERA, H.P.; TANIWAKI, M.H.; MENEZES, H.C.; IAMANAKA, B.T. **The production of ochratoxin A by *Aspergillus ochraceus* in raw coffee at different equilibrium relative humidity and under alternating temperatures**. Food Control. Inglaterra: , v.15, p.531 - 535, 2004.

CAMARGO, A.P.; SANTINATO, R.; CORTEZ, J. G. **Aptidão climática para a qualidade da bebida nas primeiras regiões cafeeiras de arábica no Brasil**. In: Congresso brasileiro de pesquisas cafeeiras, 18, 1992, Araxá. Anais... Rio de Janeiro: MIC/IBC, 1992. p. 70-74.

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

CARVALHO, V.D.; CHALFOUN, S.M.; CHAGAS, S.J. de R. **Relação entre classificação do café pela bebida e composição físico química, química e microflora do**

**grão beneficiado.** In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 15., 1989, Maringá. Resumos... Rio de Janeiro: MIC/IBC, 1989. p.25-26.

CARVALHO, V.D.; CHAGAS, S.J.R.; CHALFOUN, S.M.; BOTREL, N.; JUSTE JUNIOR, E.S.G. **Relação entre a composição físico-química e química do grão beneficiado e qualidade de bebida do café.** Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v.29, n.3, p.449-454, mar. 1994.

CARVALHO, V. D. de; CHALFOUN, S.M **Cafeicultura, Tecnologias de produção, gerenciamento e comercialização:** Colheita, preparo e armazenamento 1ª edição, Lavras: D4 videographics, 1999. CD-ROM

CHALFOUN, S.M.; SOUZA, J.C. & CARVALHO, V.D. de. **Relação entre a incidência da broca, *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867) (Coleoptera: Scolytidae) e microorganismos em grãos de café.** In: Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras, 11, Londrina, Anais, Londrina, p.149-150. 1984. Anais.

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

CHAULFON, S.M.; CHAGAS, S.J.R.; CARVALHO, V.L.; SILVA, R.A.; PEREIRA, M.C. **Microflora associada a grãos beneficiados de café (*Coffea arabica* L.) com e sem desinfecção.** In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 23., 1997, Manhuaçu, (Anais...), Rio de Janeiro, MARA/PROCAFE/PNFC, P. 168-169. 1997.

CHAULFON, S.M.; CHAGAS, S.J.R.; PEREIRA, M.C. **Determinação da microbiota associada externa e internamente a grãos beneficiados de café.** Summa Phytopathologica, Jaboticabal, vol. 25, n. 4, p. 369-372. 1999.

CHALFOUN, S.M., PEREIRA, M.C., ANGÉLICO, C. L. **Efeito da cafeína (1,3,7 - trimethylxchanthina) sobre o crescimento micelial de fungos associados ao café.** Revista Brasileira de Armazenamento. Viçosa-MG: , v.1, p.50 - 53, 2000.

CRUZ, L.C.H. **Micologia Veterinária.** Itaguaí: UFRJ-Imprensa Universitária, 1982.

DENTAM, E. **Cafés riotés: etude microscopique du processus d'infection.** In: INTERNATIONAL SCIENTIFIC COLLOQUIUM ON COFFEE, 13, 1989, Paipa. Proceedings... Paipa: ASIC, 1989. p. 127-144.

EMBRAPA. **Consórcio Economia cafeeira** Disponível em: <http://www.embrapa.br/cafe> Acesso em 26 Set. 2004.

FRANCO, C.M. **A eliminação da substancia pécica do café despolpado é causada por microorganismos.** Bragantina, Campinas, v. 19, n. 38, p. 621-626, 1960.

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

- KERN, M.E.; BLEVIS, K.S. **Micologia Médica**. 2<sup>a</sup> ed. São Paulo: Editora Premier, p.256, 1999.
- KLEIN, D., EVELEIGH, D.E., 1998. **Ecology of Trichoderma**. In: Kubicek, C.P., Harman, G.E. (Eds.), *Trichoderma and Gliocladium; Basic Biology, Taxonomy and Genetics*, vol. 1. Taylor & Francis, London, pp. 57–74.
- KRUG, H.P. **Cafés duros II - Um estudo sobre a qualidade dos cafés de varrição**. Revista do Instituto do café, do Estado de São Paulo, São Paulo, v. 15, p. 1393-1396, 1940.
- KRUG, H.P. A origem dos cafés duros. **Boletim da Agricultura**, São Paulo, v. 48, p. 397-406, 1947.
- LIARDON, R.; BRAENDLIN, N.; SPADONE, J.C. Multidisciplinary study of rio flavours in Brazil green coffee beans. In: COLLOQUE SCIENTIFIC INTERNATIONAL SUR LE CAFÉ, 13, 21-25 août. 1989, Paris. **Annales...** Paris: ASIC, 1989. p. 117-126.
- LIARDON, R. BRAENDLIN, N. SPADONE, J.C. Biogenesis of rio flavours impact compound: tricoloroanisol. In: COLLOQUE SCIENTIFIC INTERNATIONAL SUR LE CAFÉ, 14, 14- 19 juillet 1991, San Francisco. **Annales...** Paris: ASIC, 1991. p. 608-614.
- LOPES, L.M.V.; PEREIRA, R.G.F.A.; MENDONÇA, J.M.A.; MENDES, A.N.G. **Variação da ocorrência de fungos em grãos de sete cultivares de café (Coffea arabica L.) em três épocas durante a colheita**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEIRAS, 25., 1999, Franca (Anais...), Rio de Janeiro, MAA/PROCAFE, p. 144-145. 1999.
- MARTINS, A. N., SILVEIRA, A P., SILVA, R. J. N. Avaliação da microbiota presente em café armazenado e recém beneficiado. In: Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, 2001, Vitória. **Anais do II Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil**. Brasília: EMBRAPA Café – MINASPLAN, 2001.
- MEIRELLES, A.M.A. **Ocorrência e controle da microflora associada aos frutos de café (Coffea arabica L.) provenientes de diferentes localidades do estado de Minas Gerais**. Lavras: Escola Superior de Agricultura de Lavras, 1990. 71p. (Dissertação -estrado em Agronomia).
- MISLIVEC, P.B., BRUCE, V.R., GIBSON, R., 1983. **Incidence of toxigenic and other molds in green coffee beans**. Journal of Food Protection 46, 969–973.
- NAKAJIMA, M., TSUBOUCHI, H., MIYABE, M., UENO, Y., 1997. **Survey of aflatoxin B1 and ochratoxin A in commercial green coffee beans by high-performance liquid chromatography linked with immunoaffinity chromatography**. Food and Agricultural Immunology 9, 77– 83.
- NERY-SILVA, F.A.; FREITAS, R.A.; MACHADO, J.C.; SOUZA, S.M.C. **População fúngica associada a frutos de café (Coffea arabica L.) durante as fases de pré e pós colheita e sua relação com a qualidade de bebida**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEIRAS, 24., 1998, Poços de Caldas (Anais...), Rio de Janeiro,

MAA/PROCAFE, p. 202-203. 1998.

NETO, P.A.S.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. **Microrganismos endofíticos: Interação com Plantas e Potencial Biotecnológico.** Revista Biotecnologia, ano 5, no 29, nov/dez, 2002.

BIBLIOTECA NACIONAL DO ESTUDANTE DE LÍNGUA PORTUGUESA. **Especiais Frutas no Brasil Café.** Disponível em: <http://www.bibvirt.futuro.usp.br/>. Acesso em 26 Set. 2004.

PIMENTA, C.J. **Qualidade do café (*Coffea arabica*. L) colhido em diferentes estádios de maturação.** Lavras:UFLA, 1995. 93p. (Dissertação - Mestrado em Ciências Alimento).

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.** Revista Ciência e Agrotecnologia. Editora UFLA:, v.27, n.6, p.530 - 532, 2003.

PIMENTA, C. J., VILELA, E.R. **Qualidade do café (*Coffea arabica* L.) colhido em sete épocas diferentes na região de Lavras – MG.** Ciência e Agrotecnologia. Lavras: , v.26, p.1481 - 1491, 2002.

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

PITT, J.I., 2000. **Toxigenic fungi: which are important?** Medical Mycology 38 (Suppl. 1), 17– 22.

PITTET, A., TORNARE, D., HUGGETT, A., VIANI, R., 1996. **Liquidchromatographic determination of ochratoxin A in pure and adulterated soluble coffee using an immunoaffinity column cleanup procedure.** J. Agric. Food Chem. 44, 3564–3569.

RYU, D., MUNIMBAZI, C., BULLERMAN, L. (1999). **Fumonisin B1 production by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* as affected by cycling temperatures.** Journal of Food Protection, 62, 1456–1460.

SCUSSEL, V.M. **Micotoxinas em alimentos.** Florianópolis: Insular, 1998. 144 p.

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

SILVA, J.S. **Colheita, secagem e armazenamento do café.** In: I ENCONTRO SOBRE PRODUÇÃO DE CAFÉ COM QUALIDADE, 1., 1999, Viçosa, MG. Anais... Viçosa, 1999. p.39-80.

SILVA, C.F., SCHWAN, R.F., DIAS, E.S., WHEALS, A.E., 2000. **Microbial diversity during maturation and natural processing of coffee cherries of *Coffea arabica* in Brazil.** International Journal of Food Microbiology 60, 251– 260.

SOUZA, S.M.C. de & CARVALHO, V.L. de **Efeito de microrganismos na qualidade da bebida de café.** Informe Agropecuário, Belo Horizonte, vol. 18, n. 187, p. 21-26. 1997.

TANIWAKI, M.H.; IAMANAKA, B.T.; VICENTINI, M.C. **Fungos produtores de ocratoxina e ocratoxina A em cafés brasileiros.** In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DE CAFÉS DO BRASIL, I., 2000, Poços de Caldas (Resumos Expandidos), Brasília, EMBRAPA-Café/MINASPLAN p. 720-722. 2000.

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

WILEY, J.; SONS. **Coffee flavor Chemistry.** Chemistry & Industry n. 24, p. 26-28, 2002.

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

**ANEXOS**

ANEXO A – ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO NÚMERO TOTAL DE FUNGOS ISOLADOS EM RELAÇÃO AOS DIFERENTES ESTÁDIOS DE MATURAÇÃO DO CAFÉ (CEREJA, PASSAS E SECO NO PÉ).

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamento	2	0,336	0,168	10,185**
Resíduo	117	1,932	0,017	
Total	119	2,269		

CV % = 15,66

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

ANEXO B – ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O FUNGO *ASPERGILLUS CARBONARIUS* ISOLADO NOS DIFERENTES ESTÁGIOS DE MATURAÇÃO (CEREJA, PASSAS E SECO NO PÉ) DO CAFÉ, VARIEDADE CATUAÍ.

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamento	2	0,594	0,297	32,858**
Resíduo	117	1,058	0,009	
Total	119	1,652		

CV % = 24,88

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

ANEXO C – ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O FUNGO *FUSARIUM* SP ISOLADO NOS DIFERENTES ESTÁGIOS DE MATURAÇÃO (CEREJA, PASSAS E SECO NO PÉ) DO CAFÉ, VARIEDADE CATUAÍ.

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamento	2	1,938	0,969	32,894**
Resíduo	117	3,447	0,029	
Total	119	5,386		

CV % = 28,26

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

ANEXO D – ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O FUNGO *TRICHODERMA* SP ISOLADO NOS DIFERENTES ESTÁGIOS DE MATURAÇÃO (CEREJA, PASSAS E SECO NO PÉ) DO CAFÉ, VARIEDADE CATUAÍ.

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamento	2	0,158	0,079	7,510**
Resíduo	117	1,234	0,011	
Total	119	1,392		

CV % = 27,19

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

ANEXO E – ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O FUNGO *PENICILLIUM* SP ISOLADO NOS DIFERENTES ESTÁGIOS DE MATURAÇÃO (CEREJA, PASSAS E SECO NO PÉ) DO CAFÉ, VARIEDADE CATUAÍ.

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamento	2	0,052	0,026	5,137**
Resíduo	117	0,596	0,005	
Total	119	0,648		

CV % = 22,08

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

ANEXO F – ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O FUNGO *RHIZOCTONIA* SP ISOLADO NOS DIFERENTES ESTÁGIOS DE MATURAÇÃO (CEREJA, PASSAS E SECO NO PÉ) DO CAFÉ, VARIEDADE CATUAÍ.

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamento	2	0,333	0,166	23,237**
Resíduo	117	0,838	0,007	
Total	119	1,170		

CV % = 23,08

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

ANEXO G – ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O FUNGO *CURVULARIA* SP ISOLADO NOS DIFERENTES ESTÁGIOS DE MATURAÇÃO (CEREJA, PASSAS E SECO NO PÉ) DO CAFÉ, VARIEDADE CATUAÍ.

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamento	2	0,047	0,024	7,433**
Resíduo	117	0,373	0,003	
Total	119	0,420		

CV % = 17,69

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

ANEXO H – ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O FUNGO *BIPOLARIS* SP ISOLADO NOS DIFERENTES ESTÁGIOS DE MATURAÇÃO (CEREJA, PASSAS E SECO NO PÉ) DO CAFÉ, VARIEDADE CATUAÍ.

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamento	2	0,066	0,033	11,302**
Resíduo	117	0,339	0,003	
Total	119	0,405		

CV % = 16,95

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

ANEXO I – ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O FUNGO *ACREMONIUM* SP ISOLADO NOS DIFERENTES ESTÁGIOS DE MATURAÇÃO (CEREJA, PASSAS E SECO NO PÉ) DO CAFÉ, VARIEDADE CATUAÍ.

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamento	2	0,027	0,014	5,847**
Resíduo	117	0,273	0,002	
Total	119	0,300		

CV % = 15,48

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

ANEXO J – ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O FUNGO *PHOMA* SP ISOLADO NOS DIFERENTES ESTÁGIOS DE MATURAÇÃO (CEREJA, PASSAS E SECO NO PÉ) DO CAFÉ, VARIEDADE CATUAÍ.

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamento	2	0,002	0,001	2,053
Resíduo	117	0,059	0,001	
Total	119	0,061		

CV % = 7,38

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

ANEXO K – ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA OS FUNGOS NÃO IDENTIFICADOS ISOLADOS NOS DIFERENTES ESTÁGIOS DE MATURAÇÃO (CEREJA, PASSAS E SECO NO PÉ) DO CAFÉ, VARIEDADE CATUAÍ.

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamento	2	0,123	0,061	4,221
Resíduo	117	1,704	0,015	
Total	119	1,827		

CV % = 30,97

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

ANEXO L - MÉDIA DA OCORRÊNCIA DO TOTAL DE FUNGOS EM GRÃOS DE FRUTOS DE CAFÉ DA VARIEDADE CATUAÍ EM 3 ESTÁDIOS DE MATURAÇÃO (CEREJA, PASSAS E SECO NO PÉ).

Estádio de Maturação	Total de Fungos
Cereja	0,747 a
Passas	0,843 b
Seco no pé	0,871 b
CV %	15,66

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