

FÁTIMA CHIEPPE PARIZZI

Incidência de Fungos da Pré-colheita ao Armazenamento de Café

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, para obtenção do título de “Doctor Scientiae”.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2005**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

P234i
2005

Parizzi, Fátima Chieppe, 1960-
Incidência de fungos da pré-colheita ao armazenamento
de café / Fátima Chieppe Parizzi. – Viçosa : UFV, 2005.
x, 70f. : il. ; 29cm.

Orientador: Lêda Rita D'Antonino Faroni.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Café - Qualidade. 2. Café - Doenças e pragas.
3. Espectroscopia de infravermelho. 4. Ocratoxinas.
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 633.734657

FÁTIMA CHIEPPE PARIZZI

Incidência de Fungos da Pré-colheita ao Armazenamento de Café

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, para obtenção do título de “Doctor Scientiae”.

APROVADA: 31 de março de 2005

Dr. Raul Narciso Carvalho Guedes
(Conselheiro)

Dr. Onkar Dev Dhingra
(Conselheiro)

Dr. Pedro Amorim Berbert

Dr. Flávio Meira Borém

Dr^a Lêda Rita D’Antonino Faroni
(Orientadora)

**À vocês que eu continuo amando tanto:
Paulo, esposo e amigo de todos os momentos;
Lucas e Paulinha, nossos filhos, nossa bênção;
João e Salete, meus pais, meu exemplo.**

AGRADECIMENTOS

Ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA por oportunizar a realização do curso.

À Universidade Federal de Viçosa - UFV por permitir a constante renovação de conhecimentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pela concessão da bolsa de estudos PDEE e viabilizar a realização de um sonho.

Ao Grain Marketing and Production Research Center – GMPRC pela oportunidade e acolhida.

À minha orientadora, aos meus conselheiros, aos demais professores, aos colegas de trabalho e de estudo, aos funcionários da UFV, do MAPA e do GMPRC, aos colaboradores temporários, aos amigos de longa data, aos novos amigos conquistados nesta empreitada, à toda a minha família, o meu sincero agradecimento por tudo que vocês foram capazes de fazer por mim durante a realização deste trabalho. Cada um de vocês teve uma participação mais que especial em todos os momentos, da intenção à concretização.

MUITO OBRIGADA! THANK YOU VERY MUCH!

A todos vocês:

Lêda, Dhingra, Raul, Tom Pearson, Pedro Berbert, Flávio Borém, Francisco, José Helvécio, Juarez, Calil, Maria Eliana, Ernandes, Carlos Romero, José Roberto, Marco Aurélio, Wederson, Adriano, Flávio, Alberto, Sílvia, Geraldinho, Catitu, Inhame, Edna, Marcos, Dona Maria, Sr. Galinário, José Leonardo, José Roberto Rodrigues, Israel, Eugênia, Fábio Fernandes, Guimarães, Amadeu, Luiz Antonio, José Alves, Solange Matos, Valdete Lopes, Gilcemir, Neiva, Graça Nemer, Nina Rosa, Maria Luisa, José Maurício, José Orlando, Luiz Roberto, Sara Chaulfon, Dona Aparecida e Sr. Eugênio, Pedro e Patrícia, Carla e Mateus, Carola e Michael, Aninha e Flávio, Cris e Robson, Felipe e Sil, Silvana e Toninho, Tito e Sandra, Eduardo e Cláudia, Beto e Titita, Murilinho, Murilo e Beatriz, Yani, Dona Terezinha, Ulisses, César, Alexandra, Cristina Chaves, Izabel, Míriam e Gilberto, Márcia e Olimpio, Vanira e Sérvio Túlio, Beth e Humberto, Tatá e Carlos, Moni e Fernando, Duni e Ana, Kenia e Wilton, Marli, Imaculada, Luciano, Dona Rita, Mercês e Hermínio, Daniel Brabec, Elizabeth Maghirang, Lisa Mathew, Michael Tilley, Feng Xie, Donald Wicklow, Floyd Dowell, Paul Armstrong, Marsha, JoAnne, Jeffrey Lord, Duane Walker, Elane Walker, Hulya Akdogan, Donald Koeltzow, Adriene, Caren, Mônica Pirozi, Renata, Júnior, George e Michelle, Frank e Tânia, Maria, Zé e Valéria, Cida e Gustavo, Adelisa e Nicholas, José Márcio e Joan.

BIOGRAFIA

FÁTIMA CHIEPPE PARIZZI, filha de João Batista Chieppe e de Luiza Salete Duarte, nasceu na cidade de Ouro Fino, Estado de Minas Gerais, em 23 de julho de 1960.

Em julho de 1982 graduou-se em Engenharia Agrônômica pela Universidade Federal de Viçosa.

Trabalhou na Escola Superior de Ciências Agrárias de Rio Verde-ESUCARV (atual FESURV) no período de setembro a dezembro de 1982.

Em janeiro de 1983 ingressou no Ministério da Agricultura mediante concurso público realizado em Campo Grande-MS, estando atualmente lotada na Superintendência Federal de Agricultura em Minas Gerais, junto à Representação Regional em Viçosa-MG, onde executa atividades relacionadas à padronização e classificação de produtos vegetais.

Em dezembro de 1992 concluiu o mestrado em Engenharia Agrícola, na área de Pré-processamento e Armazenamento de Produtos Agrícolas pela Universidade Federal de Viçosa, iniciado em abril de 1990.

Em abril de 2001 iniciou o doutorado em Engenharia Agrícola na Universidade Federal de Viçosa.

ÍNDICE

	Página
RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
Introdução Geral	1
Literatura Citada	5
ARTIGO 1 - Incidência de fungos na pré-colheita e processamento do café	
Resumo	9
Abstract	10
INTRODUÇÃO	11
MATERIAL E MÉTODOS	13
Identificação da área experimental	13
Obtenção das amostras	14
Determinação do conteúdo de água	16
Detecção e identificação de fungos	16
Análise de ochratoxina A (OTA)	16
Delineamento experimental	16
Análise dos dados	16
RESULTADOS	17
DISCUSSÃO	25
LITERATURA CITADA	27
ARTIGO 2 - Incidência de fungos e seus efeitos sobre a qualidade do café durante o armazenamento	
Resumo	31
Abstract	32
INTRODUÇÃO	33
MATERIAL E MÉTODOS	36
Identificação da área experimental	36

Identificação do produto e obtenção das amostras	36
Determinação do conteúdo de água	37
Deteção e identificação de fungos	37
Análise de ochratoxina A (OTA)	37
Análise da acidez do óleo	38
Análise da acidez titulável total	38
Condutividade elétrica	38
Classificação física e degustação (prova de xícara)	38
Delineamento experimental	38
Análise dos dados	38
RESULTADOS	39
DISCUSSÃO	46
LITERATURA CITADA	49
 ARTIGO 3 - Espectroscopia de infra-vermelho próximo na identificação de defeitos e fungos em grãos de café	
Resumo	54
Abstract	55
INTRODUÇÃO	56
MATERIAL E MÉTODOS	58
Identificação do produto	58
Obtenção das amostras	59
Inoculação dos grãos com <i>Aspergillus ochraceus</i>	59
Obtenção dos dados espectrais	59
Análise dos dados espectrais	61
RESULTADOS	61
DISCUSSÃO	65
LITERATURA CITADA	66
 CONCLUSÕES GERAIS	70

RESUMO

PARIZZI, Fátima Chieppe, D.S., Universidade Federal de Viçosa, março de 2005. **Incidência de fungos da pré-colheita ao armazenamento de café.** Orientadora: Lêda Rita D'Antonino Faroni. Conselheiros: Onkar Dev Dhingra e Raul Narciso Carvalho Guedes.

As maiores preocupações dos países produtores de café estão voltadas, atualmente, para a qualidade intrínseca do produto, especialmente quanto à isenção de contaminantes, tais como as micotoxinas. A adoção da Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle – APPCC na cadeia agroprodutiva do café é uma das medidas preventivas recomendadas, cujos princípios baseiam-se na avaliação sistemática dos perigos e na identificação dos Pontos Críticos de Controle (PCC). Objetivando a obtenção de informações que subsidiem a adoção da APPCC, estudou-se a incidência de fungos toxigênicos e de ochratoxina A (OTA) nas etapas de pré-colheita e processamento do café colhido em três áreas topograficamente diferentes e submetido à pré-secagem em terreiros de cimento e de chão e complementação da secagem em leito fixo. Amostras do produto foram coletadas antes da colheita, na saída do lavador, durante a secagem nos terreiros e ao ser transferido para o secador. Na detecção de fungos, a casca e o grão foram plaqueados separadamente, depois da desinfecção superficial dos frutos. O produto beneficiado, acondicionado em sacos de jutas, foi armazenado por 180 dias e amostrado para avaliações qualitativas, mediante análises de incidência de fungos, índice de OTA, conteúdo de água, acidez total do grão, acidez do óleo, condutividade elétrica, classificação física e qualidade de bebida. Na análise estatística dos dados foram usadas as análises de variáveis canônicas (CVA), de variância por medida repetida e de correlação canônica. Este estudo foi complementado com a execução de análises espectrais do café, com vistas ao desenvolvimento de discriminadores, na faixa do infravermelho próximo (NIR), para identificação de grãos de café intactos e com defeitos e de grãos de café intactos e colonizados por *Aspergillus ochraceus*. Os dados espectrais foram classificados por análise discriminante, com seleção de variáveis por *stepwise*. Os resultados obtidos nas etapas de pré-colheita e processamento indicaram que o tipo de terreiro afetou a incidência de todas as espécies de fungos e que a separação das partes do fruto foi significativa para *A. ochraceus* e Grupo Nigri no café secado no terreiro de cimento e *A. flavus* no café secado no terreiro de chão. De um modo geral, a incidência fungos no café foi

considerada baixa e mostrou uma correlação negativa com a redução do conteúdo de água, atribuída ao comportamento xerofítico das espécies estudadas. Durante o armazenamento observou-se que o conteúdo de água, a acidez do óleo e a acidez do grão foram afetadas pelo tempo de armazenamento, pela área de plantio e pelo tipo de terreiro utilizado na secagem. A condutividade elétrica e o número de defeitos mostraram uma correlação positiva com a incidência de fungos, principalmente *Penicillium* sp., *Fusarium* sp e espécies do Grupo Nigri. A incidência de fungos foi baixa, não favorecendo a contaminação do produto por OTA. A variação do número de defeitos não afetou a tipificação, a coloração e a qualidade de bebida do café. Os resultados obtidos na análise espectral mostraram que aproximadamente 95% dos grãos foram corretamente classificados em intactos e danificados. Na classificação dos defeitos em categorias observou-se uma redução no percentual de acertos que ficou entre 55 e 60% para os grãos com defeitos gerais, quebrados e brocados e em torno de 75% para os grãos com defeitos graves. Para os grãos de café inoculados, 100% dos grãos intactos (controle) foram classificados corretamente e na identificação da contaminação fúngica os resultados obtidos foram 77 e 75% para grãos severamente e levemente infectados, respectivamente. As curvas obtidas para os dois grupos de amostras mostrou a distinção do comportamento espectral dos grãos sadios e dos grãos danificados ou inoculados, observados pelos valores médios da absorvância ($\log 1/R$). Em conformidade com outros estudos, os resultados indicaram que o café não se constitui em bom substrato à colonização fúngica. Entretanto, a constituição biológica do endosperma e a presença do inóculo podem representar fatores de predisposição à formação de OTA, cabendo, assim, a adoção de medidas preventivas durante a produção e processamento do café, bem como a implementação de técnicas e métodos rápidos de controle de qualidade, que possam atender às exigências do mercado e à dinâmica da comercialização.

ABSTRACT

PARIZZI, Fátima Chieppe, D.S., Universidade Federal de Viçosa, March 2005. **Fungi incidence from the coffee pre-harvest to the storage.** Adviser: Lêda Rita D'Antonino Faroni. Committee Members: Onkar Dev Dhingra and Raul Narciso Carvalho Guedes.

Nowadays the most important concern of coffee country producers is the product quality, mainly the absence of contaminants such as mycotoxins. The adoption of Hazard Analyses of Critical Control Points – HACCP by the coffee chain production is one of the recommended preventive procedures. Their principles establish a current evaluation of hazards and a complete identification of Critical Control Points (CCP). In order to obtain information that subside the HACCP adoption, the incidence of toxigenic fungi and ochratoxin A (OTA) were studied from the pre-harvest procedures to the storage of coffee beans harvested on the cloth from three topographically distinct areas. At first, it was sun-dried on cement and ground floors. The drying was completed on mechanical dryer by low temperature. The product was sampled before the harvest, after passing the washing tank, during the sun-drying and before the mechanical drying. On the fungi detection test, beans and coffee peels were incubated separately after superficial disinfection. After dehulling, coffee beans on jute bags were stored during 180 days and sampled for qualitative analysis of fungi incidence, OTA level, moisture content, free fatty acids, total titrable acidity, electrical conductivity, grading and beverage quality. The data were submitted to canonical variable analysis (CVA), repeated measures analysis of variance and canonical correlations. This study was complemented by spectral analysis of coffee beans carried out to evaluate the potential of near infra-red (NIR) detection for identification of damage and fungi contamination on coffee beans. The spectral data were classified by discriminate analysis using *stepwise* selection. From the pre-harvest to the dehulling process, it was observed that the type of floor affected the fungi incidence for all fungi species. The separation of coffee fruit parts on Blotter test affected both *A. ochraceus* and Nigri Group incidence on the product dried on the cement floor, as well as *A. flavus* incidence on coffee dried on ground floor. The fungi incidence was considered low and showed a negative correlation with the reduction of coffee bean moisture. This probably happened due to the xerophilic behavior of the fungi species. There was no contamination by OTA on husk and coffee beans samples. During the storage period, it was

observed that storage time, cultivated area and the type of sun-drier floor affected the moisture content, free fatty acids and total titrable acidity. Electrical conductivity and green coffee defects were a positively correlated with fungi incidence, mainly of *Penicillium* sp., *Fusarium* sp and the Nigri Group species. The fungi incidence was considered low, not resulting in contamination of coffee beans by OTA. Variation on green coffee defects did not affect the grade, color and beverage quality of coffee. On spectral analysis, it was verified that about 95% of the beans were correctly classified as intact and damaged. It was observed a reduction in the percentage for damaged beans when they were classified by categories. Only about 55 to 60% of damaged beans were correctly classified as slightly damaged, broken and insect damaged and about 75% on severely damaged. The results obtained for inoculated beans indicate a good accuracy and 100% of control beans were correctly distinguished. For inoculated bean categories, the results were 77 and 75% for severely and slightly infected beans, respectively. Plots of average spectra indicate differences on spectrum behavior for intact and damaged or inoculated beans which could be observed by the average absorbance values ($\log 1/R$). In agreement with similar studies, the results indicate that green coffee is a poor substrate for fungi development, although the biological endosperm structure and the inoculum presence can favor the OTA production. Therefore, it is necessary the use of correct preventive procedures during coffee production and preparation, as well as fast quality control systems against contamination in order to attend the requirements of the trade and consumers.

Introdução Geral

Para atender ao consumo mundial, estimado em 400 bilhões de xícaras, são produzidas, anualmente, em torno de 6,8 milhões de toneladas (113,5 milhões de sacas) de café, considerado um dos produtos agrícolas mais comercializados no mundo (ICO, 2004; Feria-Moralez, 2002).

Embora a produção de café esteja distribuída em mais de 50 países, o consumo doméstico, pelos países produtores, representa apenas 30% da produção global. Isso significa que, aproximadamente, quatro milhões de toneladas (80 milhões de sacas) de café em grãos são, anualmente, destinados aos países consumidores, resultando em movimentações comerciais na faixa de 12 a 15 bilhões de dólares. Estima-se que metade desses valores retornem aos produtores e representam, senão a única, talvez a mais importante fonte de renda para muitas famílias, resultando, segundo levantamentos da Organização das Nações Unidas para Alimentos e Agricultura-FAO, em 25 milhões de empregos diretos e em até 100 milhões, se consideradas as áreas industrial e distribuidora (Castilho, 2001; Duris, 2002; ICO, 2004).

O café, apesar de ser amplamente consumido em países de clima temperado, está sujeito, nos locais de produção, a condições tropicais, durante as etapas de colheita, processamento e armazenamento por períodos variáveis, além de mudanças bruscas de umidade e temperatura durante o transporte até aos locais de industrialização e consumo final. Tais fatores podem favorecer o desencadeamento de processos físicos, químicos e biológicos que afetam a qualidade e comprometem a utilização do café (Mabbett, 2002).

A contaminação por fungos é apontada como um dos principais fatores de riscos para os produtos agrícolas, visto que algumas espécies podem produzir metabólitos secundários, altamente tóxicos, denominados micotoxinas (Levi *et al.*, 1974; Kuiper-Goodman, 1996; Buchelli *et al.*, 1998; Frank, 1999; Heilmann *et al.*, 1999; Anklam *et al.*, 2002; Buchelli & Taniwaki, 2002; Batista *et al.*, 2003).

Com propriedades carcinogênicas, nefrotóxicas, teratogênicas, imunotóxicas e provavelmente, neurotóxicas, a ochratoxina A (OTA) é uma micotoxina produzida por fungos do gênero *Aspergillus*, nas regiões tropicais e *Penicillium*, em regiões de clima temperado (Kuiper-Goodman, 1996; Heilmann *et al.*, 1999; Mantle & Chow, 2000; Petzinger & Ziegler, 2000). A OTA tem recebido uma atenção crescente em todo o mundo por representar um sério risco à saúde humana e animal, sobretudo pelo aumento dos registros de casos de contaminação em alimentos tais como café, cerveja, vinho, suco de uva e leite (Mislevic, *et al.*, 1983; Nakajima *et al.*, 1997; Téren *et al.*, 1997; Bucheli *et al.*, 1998; Jorgensen, 1998; Abarca *et al.*, 2001; Joosten *et al.*, 2001).

Enquanto que para as aflatoxinas já se encontram disponíveis modelos que permitem avaliar os riscos de contaminação, bem como outras ferramentas, como a descrição do ciclo do *Aspergillus flavus* e a identificação das fontes de inóculos primário e secundário, para a OTA as pesquisas são ainda incipientes, não apresentando sequer as informações conclusivas sobre as espécies de fungos responsáveis pela produção dessa toxina (Wicklowsky, 1983, 1995; Castilho, 2001; Duris, 2002).

Os primeiros relatos de contaminação de café por OTA associaram a micotoxina à presença de *Aspergillus ochraceus* nas amostras analisadas (Levi *et al.*, 1974). Estudos recentes avaliando a ocorrência e a distribuição de fungos toxigênicos, da colheita à secagem do café, constataram que *A. ochraceus* foi a espécie mais relevante para a produção de OTA (Taniwaki *et al.*, 2003).

Embora prescindam de estudos adicionais, outras pesquisas vêm indicando que as espécies *A. carbonarius* e *A. niger* são fontes potenciais de produção de OTA em café (Mislevic *et al.*, 1983; Téren *et al.*, 1997; Bucheli *et al.*, 2000; Joosten *et al.*, 2001; Urbano *et al.*, 2001; Taniwaki *et al.*, 2003).

Quanto às condições favoráveis à colonização fúngica e à produção de OTA, os relatórios técnicos, elaborados por organismos internacionais, enfatizam a necessidade de adoção, pelos países produtores de café, de medidas urgentes capazes de permitir o conhecimento dos mecanismos de contaminação e infecção fúngica e da correlação destes com a produção de OTA (Frank & Frisvard, 1999; Urbano *et al.*, 2001).

Estudando o efeito de diferentes condições de armazenamento na produção de OTA e na qualidade de bebida do café cru, das espécies *Coffea arabica* e *C. canephora*, procedentes da Tailândia, do Togo e da Colômbia, Bucheli *et al.* (1998) constataram que a contaminação do produto não resultou do armazenamento, tendo, possivelmente, ocorrido durante as etapas de colheita e secagem do produto. Corroborando, parcialmente, a suposição destes autores, Taniwaki *et al.* (2003), ao estudarem a presença de fungos e a fonte de contaminação de OTA em café, cultivado em quatro regiões brasileiras e colhido em diferentes estágios de maturação, observaram que o café cereja retirado da planta apresentava uma taxa média de infecção muito baixa quando comparada com as do produto recolhido do solo, seco no terreiro ou armazenado, indicando que a infecção por fungos toxigênicos e a produção de OTA, ocorriam depois da colheita. Investigando as possíveis causas da contaminação, esses autores verificaram que os pontos críticos identificados estavam relacionados com as condições climáticas dos locais de cultivo e com os processos de secagem utilizados, que poderiam favorecer a contaminação do produto durante o armazenamento.

O processo de contaminação do café ainda não está bem explicado. As possíveis hipóteses atribuem-na à presença natural do fungo no solo, que constitui uma fonte natural de inóculo, associada a deficiências nutricionais da planta, que poderiam favorecer a infecção ou a criação de uma fonte de inóculo secundário (Mantle & Chow, 2000; Moraes *et al.*, 2003). Esta fonte iria colonizar o produto nas fases de processamento, principalmente nos lavadores e durante o processo de fermentação e de secagem (Frank, 1999; Urbano *et al.*, 2001; Taniwaki *et al.*, 2003).

A secagem constitui-se em um ponto crítico, uma vez que o elevado teor de água do café, em torno de 60% no momento da colheita, favorece a contaminação por agentes patogênicos, devendo, portanto, ser iniciada no mesmo dia da colheita, imediatamente depois da saída do produto do lavador (Bucheli *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2000; Pimenta & Vilella, 2001; Bucheli & Taniwaki, 2002).

O processo de secagem mais utilizado pelos cafeicultores brasileiros combina a secagem artificial com a secagem em terreiros, locais em que o café permanece até atingir o estado de meia-seca, caracterizado pela redução do conteúdo de água para valores em torno de 35 a 40% base úmida (b.u.), com a complementação da secagem em secadores mecânicos. Esses procedimentos não devem ultrapassar quatro dias, a fim de evitar fermentações e contaminações que possam prejudicar a qualidade do café (Frank, 1999; Bucheli *et al.*, 2000; Moraes *et al.*, 2003).

O efeito das condições climáticas, do índice de maturação dos frutos e dos sistemas de secagem nos mecanismos de formação de OTA foram estudados e indicaram que a susceptibilidade à contaminação tendia a ser maior para os frutos mais maduros (Bucheli *et al.*, 1998). A incidência de defeitos e a presença de matérias estranhas e impurezas foram apontadas como sendo as principais fontes de contaminação, uma vez que os índices de OTA não foram influenciados pelo tipo de terreiro utilizado na secagem dos frutos. O reumidecimento do produto durante a secagem resultou em aumentos significativos nos índices de OTA, indicando que a ocorrência de chuvas e a não adoção de medidas que visem proteger o produto no terreiro, podem resultar em altos riscos de contaminação (Bucheli *et al.*, 2000). Entretanto, outros relatos sobre a influência dos processos de colheita e de secagem na incidência de OTA concluíram que o estágio de maturação dos frutos não interferiram no índice de contaminação, mas as maiores concentrações de OTA foram observadas no produto colhido diretamente sobre o chão e no café de varrição. Complementarmente, o tipo de piso dos terreiros de secagem são fatores determinantes de contaminação, sendo que a utilização de terreiros de cimento contribuíram para a redução dos índices de OTA (Moraes *et al.*, 2003).

Independentemente da região e da espécie cultivada, as informações disponíveis demonstram que as condições impróprias de colheita, a precariedade dos sistemas de secagem e a inadequação dos sistemas de armazenamento são fatores relevantes no processo de contaminação do café por OTA (Urbano *et al.*, 2001).

Durante o armazenamento, podem ocorrer alterações físicas, químicas e biológicas que, inevitavelmente, irão afetar a qualidade do produto. Tais alterações vêm sendo estudadas, principalmente, mediante a análise dos parâmetros físico-químicos, dentre eles a acidez, a atividade da polifenoloxidase, os compostos fenólicos, o índice de coloração e a condutividade elétrica (Amorim, 1978; Carvalho *et al.*, 1994; Godinho *et al.*, 2000; Arêdes, 2002)

Os fatores biológicos, como a presença de fungos nos frutos e nos grãos de café, podem também alterar a qualidade do produto, uma vez que o amplo potencial enzimático dos fungos favorece a transformação, em nutrientes, da matéria orgânica presente no substrato, alterando a composição química e as propriedades físicas do café (Pimenta & Vilella, 2001; Batista *et al.*, 2003).

O conhecimento destas transformações podem ser aproveitados na implementação de métodos rápidos e precisos de avaliação qualitativa do produto, uma vez que o exame visual, previsto nos procedimentos de classificação dos produtos agrícolas, apresenta fragilidades quanto à consistência dos resultados informados. A inspeção visual isoladamente é insuficiente, pois muitos produtos isentos de sintomas de infecção perceptíveis a olho nu podem apresentar elevados índices de contaminação por micotoxinas. Similarmente, grãos visivelmente infectados por fungos, podem não conter contaminantes. (Hirano *et al.*, 1998; Dowell *et al.*, 1999; Heilmann *et al.*, 1999; Pasikatan & Dowell, 2001).

A utilização complementar de tecnologias baseadas no comportamento espectral dos materiais biológicos, tem permitido a diferenciação entre produtos sadios e contaminados por fungos e micotoxinas, principalmente milho, trigo e amendoim, analisados em espectrômetros de infra-vermelho próximo (NIR) (Hirano *et al.*, 1998; Pearson *et al.*, 2001; Dowell *et al.*, 2002; Pearson *et al.*, 2004). A utilização desta tecnologia vem sendo estudada na análise de bebidas, grãos, extratos e pós de café, visando identificar a composição de misturas (*blends*) das espécies *C. arabica* e *C. canephora* (Kemsley *et al.*, 1995; Briandet *et al.*, 1996; Downey, 1996; Downey & Spengler, 1996; Downey & Boussion, 1996). Entretanto, os parâmetros atuais de comercialização do café têm incluído não apenas as características organolépticas relacionadas às preferências de cada mercado, mas acima de tudo aquelas voltadas à sanidade e qualidade do produto oferecido ao consumidor.

Diante deste quadro, o presente trabalho objetivou identificar a incidência de fungos e de OTA na cadeia agroprodutiva do café, avaliar os seus efeitos sobre a qualidade do café durante

o armazenamento e verificar a viabilidade de utilização da espectroscopia de infra-vermelho próximo na avaliação da qualidade do café.

As informações obtidas foram sistematizadas em três artigos. O Artigo 1 refere-se ao estudo da incidência de fungos e de OTA nas etapas de pré-colheita e processamento do café, observando-se a localização da área de plantio, o tipo de terreiro utilizado na secagem e a parte do fruto infectada. No Artigo 2 estudou-se o efeito da incidência de fungos e de OTA na qualidade do café durante o armazenamento, pela avaliação de parâmetros físico-químicos e sensoriais dos grãos. O Artigo 3 avaliou a utilização da espectroscopia de infra-vermelho próximo (NIR) na identificação de defeitos e de grãos contaminados por fungos no café beneficiado.

Literatura Citada

- Abarca, M. L.; Accensi, F.; Bragulat, M. R.; Cabañes, F. J. Current importance of ochratoxin A – Producing *Aspergillus* spp.. **Journal of Food Protection**. 64(6):903-906, 2001.
- Amorim, H. V. **Aspectos bioquímicos e histoquímicos do grão do café verde relacionados com a deterioração de qualidade**. Piracicaba:ESALQ, 1978. 85p. Tese de Livre-docência.
- Anklam, E.; Stroka, J.; Boenke, A. Acceptance of analytical methods for implementation of EU legislation with focus on mycotoxins. **Food Control**. 13:173-183, 2002.
- Arêdes, E. M. **Avaliação das perdas de matéria seca e de qualidade do café (*Coffea arabica* L.) beneficiado e armazenado em importantes municípios produtores da Zona da Mata Mineira e em Alegre-ES**. Viçosa: UFV, 2002. 39p. Tese Mestrado.
- Batista, L. R.; Chalfoun, S. M.; Prado, G.; Schwan, R. F.; Wheals, A. E. Toxigenic fungi associated with processed (green) coffee beans (*Coffea arabica* L.). **International Journal of Food Microbiology**. 85:293-300, 2003.
- Briandet, R.; Kemsley, E. K.; Wilson, R. H. Discrimination of Arabica and Robusta in instant coffee by Fourier transform infrared spectroscopy and chemometrics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 44(1):170-174, 1996.
- Bucheli, P.; Meyer, I.; Pittet, A.; Vuataz, G.; Viani, R. Industrial storage of green robusta coffee under tropical conditions and its impact on raw material quality and ochratoxin A content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 46(11):4507-4511, 1998.
- Bucheli, P.; Kanchanomai, C.; Meyer, I.; Pittet, A. Development of ochratoxin A during robusta (*Coffea canephora*) coffee cherry drying. **Journal of Agricultural Food Chemistry**. 48(4): 1358-1362, 2000.

- Bucheli, P., Taniwaki, M.H. Research on the origin, and on the impact of post-harvest handling and manufacturing on the presence of ochratoxin A in coffee. **Food Additives and Contaminants**. 19(7):655-665, 2002.
- Carvalho, V. D.; Chagas, S. J. R.; Chalfoun, S. M.; Botrel, N.; Juste Jr., E. S. G. Relação entre a composição físico-química e química do grão de café beneficiado e a qualidade de bebida do café. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, 29(3):449-454, 1994.
- Castilho, J. A. B. Metodologias técnicas e gerenciais capazes de ajudar na prevenção da ochratoxina A ao longo de toda a cadeia produtiva do café. **Revista Brasileira de Armazenamento**. Especial Café (2):11-21, 2001.
- Dowell, F. E.; Ram, M. S.; Seitz, L. M. Predicting scab, vomitoxin, and ergosterol in single wheat kernels using near-infrared spectroscopy. **Cereal Chemistry**, 76(4):573-576, 1999.
- Dowell, F.E.; Pearson, T. C.; Maghirang, E. B.; Xie, F.; Wicklow, D. T. Reflectance and transmittance spectroscopy applied to detecting fumonisin in single corn kernels infected with *Fusarium verticillioides*. **Cereal Chemistry**, 79(2):222-226, 2002.
- Downey, G. Authentication of coffee bean variety by near-infrared reflectance spectroscopy of dried extract. **Journal of Science and Food Agricultural**. 71:41-49, 1996.
- Downey, G.; Spengler, B. Compositional analysis of coffee blends by near infrared spectroscopy. **Irish Journal of Agricultural and Food Research**. 35:179-188, 1996.
- Downey, G.; Boussion, J. Coffee authentication by near infrared spectroscopy. In: **Near Infrared Spectroscopy: The Future Waves**, 410-415. A. M. C. Davies and P. C. Williams, eds Chichester, U.K.: NIR Publications, 1996b.
- Duris, D. Coffee and ochratoxin contamination. In: Hanak, E.; Boutrif, E.; Fabre, P.; Pineiro, M. (Scientific Editors). **Food Safety Management in Developing Countries**. Montpellier, France, 2002. p.1-5.
- Feria-Morales, A. M. Examining the case of green coffee to illustrate the limitations of grading systems/expert tasters in sensory evaluation for quality control. **Food Quality and Preferences**. 13:355-367, 2002.
- Frank, J. M. Modeling and HACCP tools for coffee quality improvement. **Workshop: Micotoxinas em café**. Belo Horizonte/MG, 7p.,1999.
- Frank, J.M.; Frisvad, J.C. Mycological considerations of coffee production consenquential to a HACCP plan for mould prevention. In Workshop: Micotoxinas em Café, 1999, **Anais ...** Belo Horizonte, MG, 7p.
- Godinho, R. P.; Vilella, E. R.; Oliveira, G. A.; Chagas, S. J. R. Variações na cor e na composição química do café (*Coffea arabica* L.) armazenado em coco e beneficiado. (**Revista Brasileira de Armazenamento**. Viçosa, Especial Café (1):38-43, 2000.
- Heilmann, W.; Rehfeldt, A. G.; Rotzoll, F. Behavior and reduction of ochratoxin A in green coffee beans in response to various processing methods. **European Food Research and Technology**. 209:297-300, 1999.

- Hirano, S.; Okawara, N.; Narazaki, S. Near infra red detection of internally moldy nuts. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**. 62(1):102-107, 1998.
- International Coffee Organization. **ICO Annual Review 2002/2003**. Available on <http://www.ico.org/frameset/icoset.htm>. Access in 06.16.2004.
- Joosten, H. M. L. J.; Goetz, J.; Pitter, A.; Schellenberg, M.; Bucheli, P. Production of ochratoxin A by *Aspergillus carbonarius* on coffee cherries. **International Journal of Food Microbiology**. 65:39-44, 2001.
- Jørgensen, K. Survey of pork, poultry, coffee, beer and pulses for ochratoxin A. **Food Additives and Contaminants**. 15(5):550-554, 1998.
- Kemsley, E. K.; Ruault, S.; Wilson, R. H. Discrimination between *Coffea arabica* and *Coffea canephora* variant *robusta* beans using infrared spectroscopy. **Food Chemistry**. 54:321-326, 1995.
- Kuiper-Goodman, T. Risk assessment of ochratoxin A: an update. **Food Additives and Contaminants**. 13(Supplement):53-57, 1996.
- Levi, C. P.; Trenk, H. L.; Mohr, H. K. Study of the occurrence of ochratoxin A in green coffee beans. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**. 57(4):866-870, 1974.
- Mabbett, T. Storing up problems? **Coffee & Cocoa International**, September, 2002.
- Mantle, P. G.; Chow, A. M. Ochratoxin formation in *Aspergillus ochraceus* with particular reference to spoilage of coffee. **International Journal of Food Microbiology**. 56:105-109, 2000.
- Mislivec, P. B.; Bruce, V. R.; Gibson, R. Incidence of toxigenic and other molds in green coffee beans. **Journal of Food Protection**. 46(11):969-973, 1983.
- Moraes, M. L. P.; Luchese, R. H. Ochratoxin A on green coffee: influence of harvest and drying processing procedures. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 51:6824-5828, 2003.
- Nakajima, M.; Tsubouchi, H.; Miyabe, M.; Ueno, Y. Survey of aflatoxin B₁ and ochratoxin A in commercial green coffee beans by high-performance liquid chromatography linked with immunoaffinity chromatography. **Food and Agricultural Immunology**. 9:77-83, 1997.
- Pasikatan, M. C.; Dowell, F. E. Sorting systems based on optical methods for detecting and removing seeds infested internally by insects or fungi: A review. **Applied Spectroscopy Reviews**. 36(4): 399-416, 2001.
- Pearson, T. C.; Wicklow, D. T.; Maghirang, E. B.; Xie, F.; Dowell, F. E. Detecting aflatoxin in single corn kernels by transmittance and reflectance spectroscopy. **Transactions of the American Society of Agricultural Engineers**. 44(5):1247-1254, 2001.
- Pearson, T. C.; Wicklow, D. T.; Pasikatan, M. C. Reduction of aflatoxin and fumonisin contamination in yellow corn by high-speed dual-wavelength sorting. **Cereal Chemistry**. 81(4):490-498, 2004.

- Petzinger, E.; Ziegler, K. Ochratoxin A from a toxicological perspective. **Journal Veterinary Pharmacology Therapy**. 23:91-98, 2000.
- Silva, C. F.; Schwan, R. F.; Dias, E. S.; Wheals, A. E. .Microbial diversity during maturation and natural processing of *Coffea arabica* in Brazil. **International Journal of Food Microbiology**. 60:251-260, 2000.
- Taniwaki, M.H.; Pitt, J.I.; Teixeira, A.A.; Iamanaka, B.T. The source of ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to processing methods. **International Journal of Food Microbiology**. 82:173-179, 2003.
- Téren, J.; Palágyi, A.; Varga, J. Isolation of ochratoxin producing *Aspergilli* from green coffee beans of different origin. **Cereal Research Communications**. 25(3/1):303-302, 1997.
- Urbano, G. R.;Taniwaki, M. H.; Leitao, M. F. De F.; Vicentini, M. C. Occurrence of ochratoxin A – Producing fungi in raw Brazilian coffee. **Journal of Food Protection**. 64(8):1226-1230, 2001.
- Wicklow, D. T. (1983).Taxonomic features and ecological significance of sclerotia. In: Diener, U.L. (Ed.) **Aflatoxin and *Aspergillus flavus* in corn**. Opelika, Alabama: Southern Cooperative Series Bulletin 279, Craftmaster Printers, Inc., 112p., 1983.
- Wicklow, D. T. The mycology of stored grain: an ecological perspective. In: JAYAS, D. et al. (Ed.) **Stored-Grain Ecosystems**, New York: Marcel Dekker, Inc., p.197-249, 1995.

Incidência de fungos na pré-colheita e processamento do café

RESUMO – Os programas de monitoramento da qualidade do café têm buscado a obtenção de um produto isento de fungos e micotoxinas, cuja incidência resulta na rejeição do produto pelo consumidor. A implementação desses programas requer o conhecimento prévio dos mecanismos de infecção fúngica e de produção da ochratoxina A (OTA) no café, que ainda não estão definitivamente esclarecidos. Na busca de informações que possam subsidiar o setor cafeeiro na adoção de sistemas de controle eficientes, o presente estudo objetivou identificar os fatores que favorecem a contaminação do café por fungos e OTA da pré-colheita ao beneficiamento. O produto, colhido por derriça no pano em três áreas topograficamente distintas, foi submetido à secagem em terreiros de cimento e de chão, com complementação do processo em secadores mecânicos a baixa temperatura. O produto foi amostrado antes da colheita, na saída do lavador, durante a secagem nos terreiros e ao ser transferido para o secador. Na detecção dos fungos *Aspergillus ochraceus*, *A. flavus*, espécies do Grupo Nigri, *Penicillium* sp. e *Fusarium* sp., pelo teste de Blotter com desinfecção superficial dos frutos, a casca e os grãos foram plaqueados separadamente. Os resíduos do beneficiamento e o café beneficiado foram submetidos à análise de OTA. Verificou-se que o tipo de terreiro afetou a incidência de todas as espécies de fungos e que a separação das partes do fruto foi significativa para *A. ochraceus* e Grupo Nigri no café secado no terreiro de cimento e *A. flavus* no café secado no terreiro de chão. De um modo geral, a incidência fungos no café foi considerada baixa e mostrou uma correlação negativa com a redução do conteúdo de água, atribuído ao comportamento xerofítico das espécies estudadas. Nos resíduos do beneficiamento e no café beneficiado não foi detectada contaminação por OTA. Os resultados obtidos indicaram que, apesar do café não se constituir um bom substrato à colonização fúngica, a presença do inóculo pode representar riscos se não forem adotados cuidados básicos durante a colheita e processamento do café.

PALAVRAS-CHAVE: Café, ochratoxina, fungos, pontos críticos de controle.

Fungi incidence on coffee pre-harvesting and processing

ABSTRACT – Monitoring programs of coffee quality have focused on the absence of fungi and mycotoxins, which incidences results on no acceptance of the product by consumers. The management of these programs requires previous knowledge of fungi infection mechanisms and ochratoxin A (OTA) production in coffee. Despite of many efforts the cause and effect relationship of these roles have not been demonstrated yet. Therefore, the identification and characterization of the factors that contribute to coffee contamination by fungi and OTA remains an important tool for taking preventive measures to reduce the risks of such incidences in green coffee, since the harvest until the dehulling. This study was conducted in order to obtain information that allows the use of this kind of control system by the coffee commodity. The coffee was harvested on the cloth from three topographically distinct areas. At first, it was sun-dried on cement and ground floors. The drying was completed on mechanical dryer by low temperature. The product was sampled before the harvest, after passing the washing tank, during the sun-drying and before the mechanical drying. *Aspergillus ochraceus*, *A. flavus*, Nigri Group species, *Penicillium* sp. and *Fusarium* sp. were detected after superficial disinfection by Blotter test. During this process beans and coffee peels were incubated separately. After the dehulling procedure, husks and coffee were analyzed by OTA level. It was observed that the type of floor affected the fungi incidence for all species. The separation of coffee fruit parts on Blotter test affected both *A. ochraceus* and Nigri Group incidence on the product dried on the cement floor, as well as *A. flavus* incidence on coffee dried on ground floor. In general, the fungi incidence was considered low and have shown a negative correlation with the reduction of moisture content. This probably happened due to the xerophilic behavior of the fungi species. There was no contamination by OTA on husk and coffee beans samples. It was conclude that the coffee can be a poor substrate for fungi development, although the coffee contamination can occur on the inoculum presence if some special cares during harvest and preparing of coffee do not take place.

KEY WORDS: Coffee, ochratoxin, fungi, critical control points.

INTRODUÇÃO

Como a maioria dos produtos agrícolas, o café também está sujeito à infestação por fungos nas diversas fases de desenvolvimento, colheita, processamento e armazenamento, que podem causar fermentações e alterações importantes na qualidade do produto, principalmente aquelas relacionadas à contaminação por micotoxinas (Silva *et al.*, 2000; Batista *et al.*, 2003).

No café, a partir do primeiro relato de ocorrência natural de ochratoxina A (OTA) descrito por Levi *et al.* (1974), novas informações vêm sendo obtidas, indicando a contaminação do produto em concentrações variáveis de 0,2 a 360 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (Levi, 1980; Micco *et al.*, 1989; Studer-Rohr *et al.*, 1995; Bucheli *et al.*, 1998; Heilmann *et al.*, 1999; Bucheli *et al.*, 2000; Mantle & Chow, 2000; Romani *et al.*, 2000; Abarca *et al.*, 2001; Joosten *et al.*, 2001; Leoni *et al.*, 2001; Urbano *et al.*, 2001; Duris, 2002; Moraes *et al.*, 2003; Taniwaki *et al.*, 2003).

As informações disponíveis sobre a origem da contaminação do café por OTA são incipientes (Mantle & Chow, 2000). Inicialmente atribuída apenas ao *Aspergillus ochraceus*, a produção de OTA em café pode também ocorrer na presença de outros fungos, em especial o *A. niger* e *A. carbonarius* (Téren *et al.*, 1997; Bucheli *et al.*, 2000; Joosten *et al.*, 2001). Entretanto, a presença desses fungos, embora tenha uma relação direta com a produção de OTA em café, não indica, necessariamente, contaminações significativas dessa toxina (Frank, 1999; Urbano *et al.*, 2001; Taniwaki *et al.*, 2003; Suárez-Quiroz *et al.*, 2004).

De acordo com Moraes *et al.* (2003), na implementação de medidas de controle que possam prevenir a infestação fúngica e a contaminação por OTA, os pontos considerados mais críticos incluem o período imediatamente antes da colheita, quando o cafeeiro está sujeito a um estresse hídrico e portanto mais susceptível à colonização por fungos, e durante a colheita, quando deve-se evitar que os frutos entrem em contato direto com o solo, pois este é uma importante fonte de contaminação.

Além desses cuidados, devem ser adotadas medidas visando prevenir a formação da OTA durante a secagem, principalmente quanto à escolha do local apropriado e a adoção de procedimentos que permitam uma rápida redução do teor de água (Bucheli *et al.*, 1998; Bucheli *et al.*, 2000; Romani *et al.*, 2001; Urbano *et al.*, 2001; Moraes *et al.*, 2003).

O efeito de diferentes métodos de processamento do café no desenvolvimento de fungos e produção de OTA foram avaliados por Suárez-Quiroz *et al.* (2004), os quais verificaram que a ocorrência de fungos toxigênicos não foi afetada pelo tipo de método utilizado na

preparação do café para a secagem. Nas diversas fases do processamento, os autores verificaram que no café beneficiado, além de não ter sido detectada a contaminação por OTA, a incidência de fungos foi menor do que a observada no pergaminho e no café cereja. Antes da secagem, a incidência de fungos no café foi considerada baixa, sendo que resultados similares foram obtidos por outros autores (Frank, 1999; Bucheli *et al.*, 2000). Este comportamento, atribuído à presença de bactérias, leveduras e outros fungos, que adaptados às condições de alta umidade, provavelmente, inibiram o desenvolvimento das espécies de fungos toxigênicas, não ocorreu no estudo realizado por Urbano *et al.* (2001) com amostras de café obtidas em diferentes regiões produtoras de café no Brasil.

A Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle - APPCC, conhecida internacionalmente como HACCP, é um sistema de controle recomendado pela FAO (Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura), cujos princípios baseiam-se na determinação e avaliação sistemática dos perigos nos alimentos, mediante a identificação dos Pontos Críticos de Controle (PCC) e a adoção de medidas para controlá-los (Frank, 1999; Frank & Frisvard, 1999; Castilho, 2001; Corrêa & Silva, 2002; Mabbet, 2002).

A utilização do sistema APPCC pelo setor cafeeiro depende de um completo entendimento do sistema de produção, mediante o estabelecimento de um modelo prévio, que requer o amplo conhecimento sobre os métodos e parâmetros de processamento, aspectos biológicos e as interações entre os diversos componentes do sistema. Para atingir tais objetivos, os segmentos envolvidos no agronegócio café, juntamente com a FAO e OIC (Organização Internacional do Café) vêm investindo nos últimos cinco anos, cerca de 6 bilhões de dólares em projetos de melhoria da qualidade do café, enfocando sobretudo a redução dos índices de contaminação por OTA, que é o grande desafio a ser vencido pelos países produtores (Mabbet, 2002; ICO, 2004)

Na busca de informações que possam subsidiar a adoção, pela cadeia agroprodutiva do café, de sistemas de controle reconhecidamente eficientes, torna-se relevante o papel das universidades e instituições de pesquisa na realização de estudos aplicados à realidade da cafeicultura nacional. Dessa forma, o presente trabalho objetivou a identificação de fungos e de OTA na pré-colheita e processamento do café, considerando a localização topográfica das áreas de plantio e o tipo de terreiro utilizado para a secagem do produto.

MATERIAL E MÉTODOS

Identificação da área experimental

O produto foi obtido de uma propriedade produtora de café (*Coffea arabica* L.) cultivada com a variedade Catuaí Vermelho, localizada no município de Teixeira, MG (20°39'06"S, 42°51'22"W), onde foram selecionados três talhões em diferentes localizações topográficas.

O primeiro talhão, denominado de Área 1 (A1), ocupa a parte mais alta da propriedade e contém 19.740 plantas, com densidade de plantio de 4.160 plantas ha⁻¹. A Área 2 (A2), localizada numa encosta de morro totaliza 8.000 pés de café, com 5.100 plantas ha⁻¹. Ambas as lavouras foram formadas há 26 anos e foram recepadas no ano anterior à execução deste trabalho. A Área 3 (A3), com dez anos de plantio, é composta por 7.000 pés, apresentando densidade de 7.100 plantas ha⁻¹ (Figura 1).

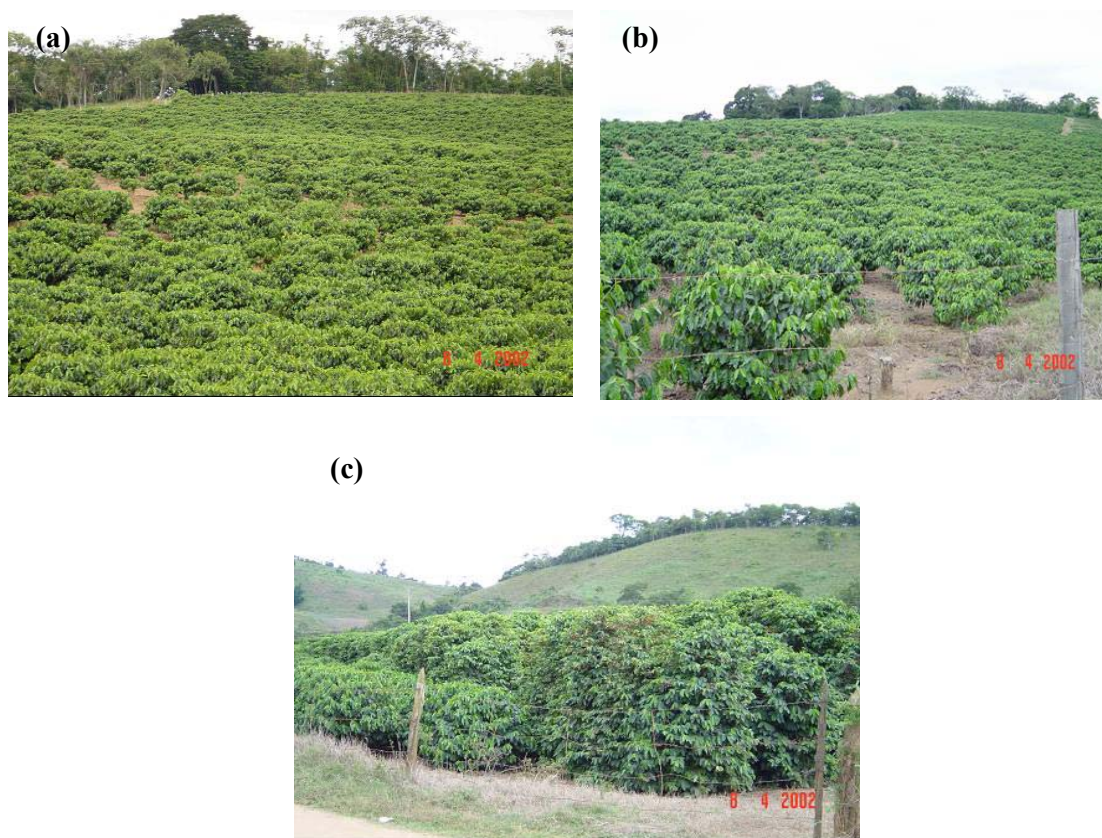


Figura 1. Vista parcial das áreas experimentais: (a) Área 1, (b) Área 2 e (c) Área 3

Obtenção das amostras

Cada talhão foi colhido separadamente, por derriça no pano. Depois de passar pelo lavador, somente os grãos verdes e cerejas foram utilizados na obtenção de dois lotes de igual tamanho. Um lote foi espalhado em terreiro de cimento e o outro em terreiro de chão batido (Figura 2), sendo revolvido de 10 a 12 vezes por dia, mantendo-se a espessura da camada em 5 cm. Atingido o conteúdo de água da meia-seca, em torno de 35% base úmida (b.u.) e mantendo-se a individualidade dos lotes por talhão origem e pelo tipo de terreiro utilizado, a secagem foi completada em um secador mecânico de camada fixa, com múltiplas câmaras de secagem com fundo de chapa metálica perfurada, onde o café recebia o fluxo de ar aquecido a 40 °C (Figura 3), sendo revolvido a cada três horas, até que o conteúdo de água do produto atingisse 13% b.u..



Figura 2. Vista dos terreiros de secagem do café: (a) terreiro de chão e (b) terreiro de cimento

O produto foi amostrado nas seguinte épocas: antes da colheita, na saída do lavador, durante a secagem nos terreiros e na meia-seca. As amostras obtidas antes da colheita foram compostas por frutos de café retirados diretamente da planta com índices de maturação variáveis. Depois da passagem pelo lavador, o café foi amostrado durante o descarregamento nos terreiros, retirando-se em torno de 200 g de frutos de cada caçamba. A amostragem nos terreiros foi feita durante o revolvimento do produto e a obtenção da amostra na meia-seca ocorreu no momento em que o café foi transferido para o secador mecânico. Em cada coleta a quantidade de amostra obtida foi de aproximadamente 2 kg.

Em todas as etapas, as amostras foram adequadamente homogeneizadas, acondicionadas, identificadas e transportadas para o Laboratório de Grãos localizado na Área

do Armazenamento do Departamento de Engenharia Agrícola-DEA/UFV, para análise do conteúdo de água e para a Clínica de Doenças de Plantas do Departamento de Fitopatologia-DFP/UFV para identificação de fungos.



Figura 3. Vista dos secadores mecânicos

Concluída a secagem do produto, os lotes de café em coco foram beneficiados individualmente por processo mecânico, utilizando-se um equipamento que permitia a coleta dos resíduos do beneficiamento (Figura 4). As amostras deste material e do café beneficiado foram submetidas à análise de OTA e a cada lote, a beneficiadora foi lavada e desinfetada com hipoclorito de sódio a 6%.



Figura 4. Equipamento utilizado no beneficiamento e coleta dos resíduos do café

Determinação do conteúdo de água

A determinação do conteúdo de água foi realizado em dois estágios. No primeiro estágio, as amostras de café foram distribuídas em bandejas de alumínio. O sistema bandeja-amostra, previamente pesado, foi mantido, por um período de 24 h, sobre estufas de secagem. Computada a massa das amostras neste estágio, a umidade final foi calculada ao final do segundo estágio, que consistiu na secagem, pelo método padrão-estufa a 103 °C por 72 horas (ASAE, 2003), de subamostras obtidas no primeiro estágio.

Deteção e identificação de fungos

Utilizou-se o método de plaqueamento em caixas gerbox, com papel tipo Blotter umedecido com água destilada e esterilizada. Os frutos foram desinfetados superficialmente por imersão, durante 1 min, em solução de hipoclorito de sódio a 2%. Em ambiente asséptico os frutos foram abertos para que as cascas e os grãos fossem plaqueados separadamente e, posteriormente, incubadas a 25 °C, durante 7 dias (Dhingra & Sinclair, 1996). Utilizando-se um microscópio estereoscópico, os grãos e cascas infectados foram contados e os resultados expressos em porcentagem. As espécies *A. ochraceus*, *A. flavus* e as pertencentes ao Grupo Nigri foram identificadas de acordo com Klich (2000).

Análise de Ochratoxina A (OTA)

As amostras de resíduos e de café beneficiado foram encaminhadas ao Laboratório de Controle de Qualidade e Segurança Alimentar-LACQSA do Ministério da Agricultura, localizado em Belo Horizonte, MG, para análise de OTA, utilizando-se a metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) estabelecida na Instrução Normativa SDA/MA Nº 09 de 24.04.2000 (Brasil, 2000). Os resultados foram expressos em $\mu\text{g kg}^{-1}$ e constaram em Laudos de Análise emitidos por aquela instituição.

Delineamento experimental

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três repetições. Os tratamentos foram estabelecidos em arranjo fatorial 3 x 2 x 2 (três áreas de plantio: A1, A2 e A3; dois tipos de terreiros: cimento e chão; duas partes do fruto: grão e casca).

Análise dos dados

Para verificar as possíveis associações lineares da incidência de fungos no grão e na casca do café entre as áreas de plantio monitoradas foi usada a análise de variáveis canônicas

(CVA), que permitiu a ordenação gráfica das mesmas, de acordo com a resposta obtida na comparação entre os grupos dos tratamentos (PROC CANDISC; SAS Institute, 2001).

As diferenças entre os tratamentos na incidência de cada espécie ou grupo de fungos pesquisados foram determinadas pela análise de variância por medida repetida (PROC ANOVA com especificação PROFILE; SAS Institute, 2001) considerando cada época de amostragem, da pré-colheita ao processamento do café. Este procedimento foi usado porque o produto era amostrado em épocas diferentes no mesmo lote.

Os dados sobre a contaminação fúngica foram usados em análise de correlação canônica (parcial), por meio do procedimento PROC CANCORR (SAS Institute, 2001), para testar a relação entre o conteúdo de água do café nas diferentes épocas de amostragem e a incidência de fungos.

RESULTADOS

A análise das variáveis canônicas CVA para as áreas de plantio (A1, A2 e A3) e partes do fruto de café (grão e casca) indicou diferenças significativas entre os tratamentos, considerando as espécies de fungos identificadas (Wilks' lambda = 0,271; $F = 6,15$; $gl_{(num/den)} = 25/365,56$; $p < 0,0001$). Dentre os cinco eixos calculados, apenas o primeiro foi significativo e explicou 89,0% dos dados (Tabela 1). Baseando-se no coeficiente canônico (entre estrutura canônica), as espécies que mais contribuíram para a divergência entre os tratamentos foram as do Grupo Nigri e *Fusarium* sp. de forma positiva e *A. flavus* de forma antagônica, na explicação do conjunto de dados.

Tabela 1. Eixos canônicos e coeficientes (agrupados na estrutura canônica) da incidência de fungos na casca e no grão do café colhido nas áreas 1, 2 e 3

Variáveis (espécies de fungos)	Eixos canônicos				
	1	2	3	4	5
Grupo Nigri	0,99	-0,04	0,00	-0,05	0,06
<i>A. flavus</i>	-0,95	0,25	-0,02	0,10	0,15
<i>Fusarium</i> sp.	0,94	0,04	0,05	0,30	-0,09
<i>A. ochraceus</i>	0,36	0,93	-0,06	-0,02	-0,04
<i>Penicillium</i> sp.	0,14	0,61	0,77	-0,12	0,00
F	6,15	1,44	0,55	0,48	0,56
gl (numerador; denominador)	25; 365,56	16; 303,09	9; 302,09	4; 202	1; 102
P	<0,0001*	0,1234	0,8367	0,7473	0,4543
Correlação canonical ao quadrado	0,66	0,16	0,03	0,01	0,01

* Significativo a 5% pelo teste de F.

Mesmo sendo significativo apenas o primeiro eixo, o diagrama de ordenação derivado da análise das variáveis canônicas foi plotado com os dois primeiros eixos e mostrou uma significativa distinção entre a Área 3 e as demais, Áreas 1 e 2, que foram agrupadas (Figura 5). Pelo agrupamento pode-se observar, ainda, que a incidência de fungos nas áreas 1 e 2 foi afetada pela separação das partes do fruto do café.

Os dados da análise de medida repetida permitiram a interpretação do comportamento individual de cada espécie ou grupo de fungos em relação à área de plantio e à parte do fruto afetada, assim como as interações observadas dentro e entre estes fatores, durante as etapas de pré-colheita e processamento. Três hipóteses são testadas em cada análise de variância: o “paralelismo”, a “horizontalidade” e os “níveis” (Von Ende, 1993). Neste estudo, o paralelismo é testado pela significância da interação entre o tempo x parte do fruto, sendo o tempo representado pelas épocas de amostragem. Quando a interação não é significativa, as curvas do efeito do tratamento ao longo do tempo são paralelas. A horizontalidade é testada pelo efeito do tempo, que, não sendo significativo, indica que a variável medida não alterou durante as épocas estudadas e a representação gráfica seria uma reta paralela ao eixo do tempo. O teste dos níveis permite avaliar o efeito do tratamento, que neste caso é a parte do fruto de café. Os testes da horizontalidade e dos níveis tornam-se pouco relevantes, quando a interação tempo x tratamento for significativa.

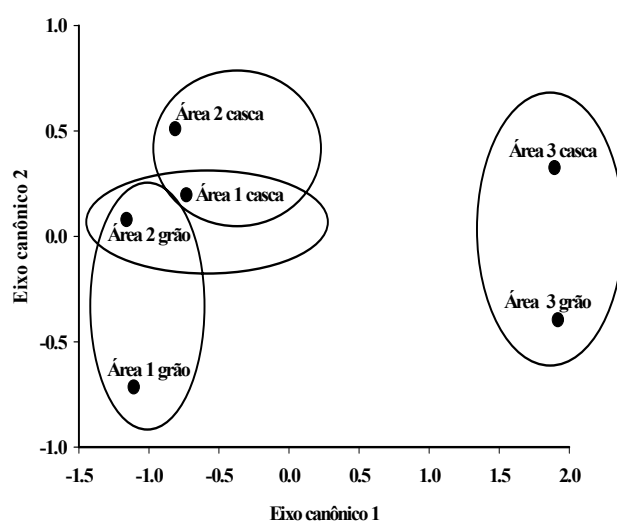


Figura 5. Diagrama de ordenação (CVA) mostrando a discriminação no grão e na casca do café e nas áreas de plantio. Tratamentos dentro do mesmo círculo não diferem significativamente pelo Teste F ($P < 0,05$) baseado na distância de Mahalanobis (D^2) entre as médias

Na execução das análises com medidas repetidas, os dados obtidos para o produto secado no terreiro de cimento foram analisados, separadamente, daqueles obtidos para o

produto secado no terreiro de chão, uma vez que o tipo de terreiro utilizado teve efeito significativo sobre a incidência de fungos no grão e na casca do café, pelo Teste de F, a 5% de probabilidade. Para o café secado no terreiro de cimento (Tabela 2), houve efeito significativo da interação época de amostragem x área para todas as espécies de fungos avaliadas, enquanto

Tabela 2. Análise de variância multivariada, com medidas repetidas, da incidência de fungos na casca e no grão, nas etapas de pré-colheita e processamento do café, proveniente das Áreas 1, 2 e 3 e submetido à secagem em terreiros de cimento. Efeitos são computados entre as parcelas (a) e nas parcelas (b)

<i>Aspergillus ochraceus</i>					
Fonte de variação		F	Graus de Liberdade		<i>p</i>
(a) Entre parcelas					
Parte do fruto		25,70	1		0,0002 *
Área		9,08	2		0,0030 *
(b) Nas parcelas					
	Wilk's lambda	F	Graus de liberdade		<i>p</i>
			Numerador	Denominador	
Época de amostragem	0,2721	10,70	3	12	0,0010 *
Época x parte do fruto	0,4663	4,58	3	12	0,02 *
Época x área	0,2963	3,35	6	24	0,0153 *
<i>Aspergillus flavus</i>					
Fonte de variação		F	Graus de Liberdade		<i>p</i>
(a) Entre parcelas					
Parte do fruto		0,56	1		0,046*
Área		61,09	2		<0,0001*
(b) Nas parcelas					
	Wilk's lambda	F	Graus de liberdade		<i>p</i>
			Numerador	Denominador	
Época de amostragem	0,0470	81,20	3	12	<0,0001*
Época x parte do fruto	0,5578	3,17	3	12	0,06
Época x área	0,0078	41,36	6	24	<0,0001*
Grupo Nigri					
Fonte de variação		F	Graus de Liberdade		<i>p</i>
(a) Entre parcelas					
Parte do fruto		1,41	1		0,25
Área		172,84	2		<0,0001*
(b) Nas parcelas					
	Wilk's lambda	F	Graus de liberdade		<i>P</i>
			Numerador	Denominador	
Época de amostragem	0,0352	109,75	3	12	<0,0001*
Época x parte do fruto	0,7793	1,13	3	12	0,37
Época x área	0,0067	44,73	6	24	<0,0001*

* Significativo a 5% pelo Teste F.

<i>Penicillium sp</i>					
Fonte de variação	F		Graus de Liberdade		<i>p</i>
(a) Entre parcelas					
Parte do fruto		0,45		1	0,51
Área		0,78		2	0,47
(b) Nas parcelas					
	Wilk's lambda	F	Graus de liberdade		<i>p</i>
			Numerador	Denominador	
Época de amostragem	0,1909	16,95	3	12	<0,0001*
Época x parte do fruto	0,6436	2,22	3	12	0,13
Época x área	0,3021	3,28	6	24	0,01*

<i>Fusarium sp</i>					
Fonte de variação	F		Graus de Liberdade		<i>p</i>
(a) Entre parcelas					
Parte do fruto		1,14		1	0,30
Área		44,35		2	<0,0001*
(b) Nas parcelas					
	Wilk's lambda	F	Graus de liberdade		<i>p</i>
			Numerador	Denominador	
Época de amostragem	0,0938	3,66	3	12	<0,0001*
Época x parte do fruto	0,5099	3,85	3	12	0,03*
Época x área	0,1433	6,57	6	24	0,0003*

* Significativo a 5% pelo Teste F.

que a interação da época de amostragem x parte do fruto foi significativa somente para *A. ochraceus* e *Fusarium sp*.

Este comportamento encontra-se graficamente mostrado na Figura 6, em que a incidência de fungos do Grupo Nigri e *Penicillium sp*. estão representadas somente pela curva das áreas, uma vez que não houve diferenças significativas entre os valores médios de contaminação observados na casca e no grão. Para o *A. flavus*, embora a interação época de amostragem x parte do grão não tenha sido significativa na análise estatística dentro das parcelas, verificou-se que entre as parcelas houve efeito da parte do fruto na incidência deste fungo. Observou-se, ainda, que para todas as espécies de fungos estudadas, houve efeito do tempo, representado neste trabalho pelas épocas de amostragem do café, da pré-colheita ao processamento.

A incidência das espécies de fungos *A. ochraceus*, *Fusarium sp*. e *Penicillium sp*. mostrou pequenas variações durante o período estudado, apresentando uma tendência a redução, ao contrário do comportamento observado para as espécies *A. flavus* e as do Grupo Nigri, cujos valores mostraram um ligeira tendência a elevação no decorrer do período estudado (Figura 6).

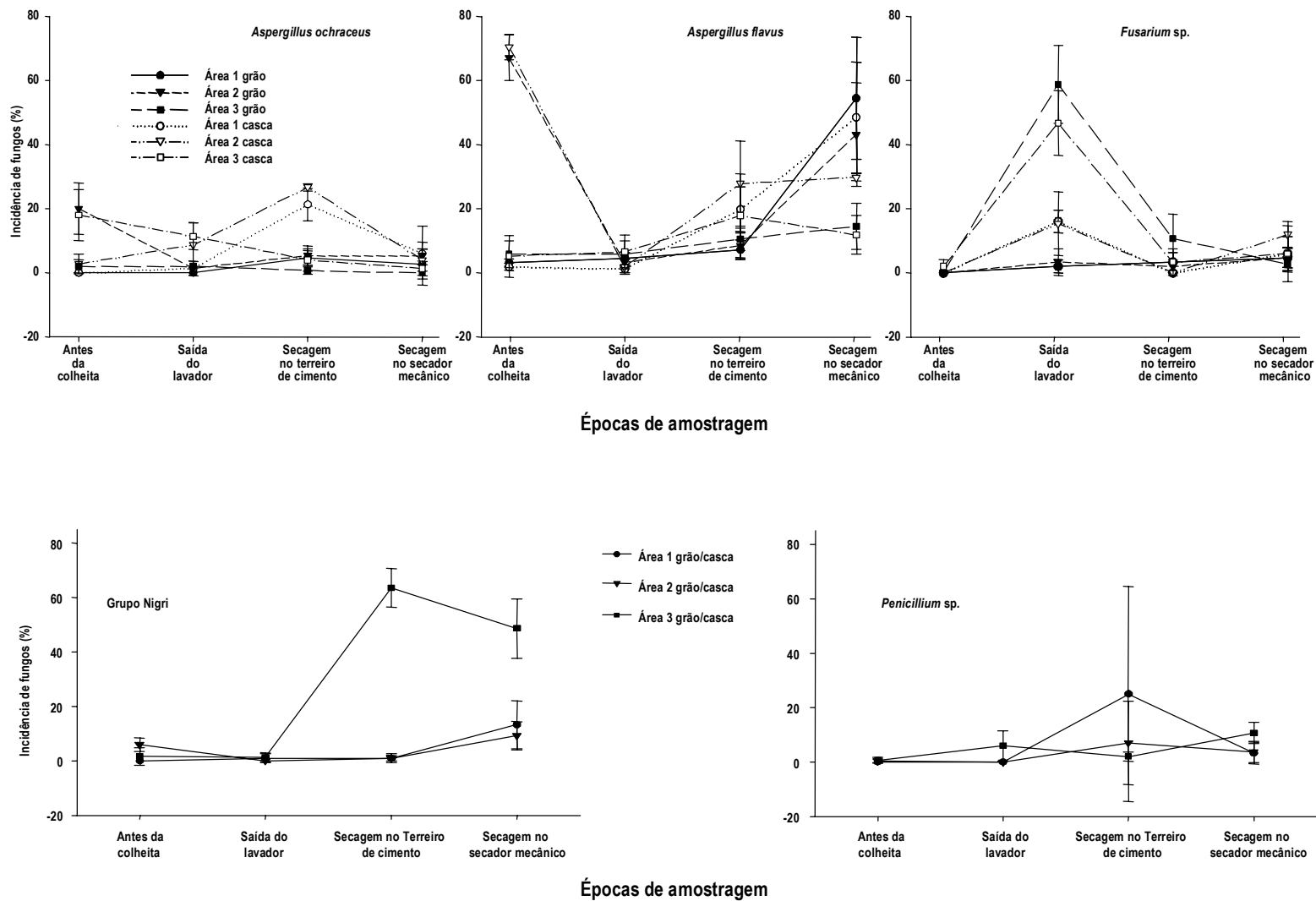


Figura 6. Incidência de fungos no grão e na casca do café obtido nas Áreas 1, 2 e 3 e submetido à secagem em terreiros de cimento

Para o produto secado no terreiro de chão, a interação época de amostragem x parte do fruto foi significativa somente para o *A. flavus*, mas a interação época de amostragem x área, foi significativa para todas as espécies estudadas (Tabela 3).

Tabela 3. Análise de variância multivariada, com medidas repetidas, da incidência de fungos na casca e no grão, nas etapas de pré-colheita e processamento do café, proveniente das Áreas 1, 2 e 3 e submetido à secagem em terreiros de chão. Efeitos são computados entre as parcelas (a) e nas parcelas (b)

<i>Aspergillus ochraceus</i>					
Fonte de variação	F		Graus de Liberdade		<i>p</i>
(a) Entre parcelas					
Parte do fruto		7,99		1	0,01*
Área		4,96		2	0,02*
(b) Nas parcelas					
	Wilk's lambda	F	Graus de liberdade		<i>P</i>
			Numerador	Denominador	
Época de amostragem	0,4313	5,27	3	12	0,01*
Época x parte do fruto	0,7465	1,36	3	12	0,30
Época x área	0,3749	2,53	6	24	0,04*
<i>Aspergillus flavus</i>					
Fonte de variação	F		Graus de Liberdade		<i>P</i>
(a) Entre parcelas					
Parte do fruto		0,06		1	0,81
Área		92,80		2	<0,0001*
(b) Nas parcelas					
	Wilk's lambda	F	Graus de liberdade		<i>P</i>
			Numerador	Denominador	
Época de amostragem	0,0395	97,19	3	12	<0,0001*
Época x parte do fruto	0,4816	4,31	3	12	0,02*
Época x área	0,0028	71,03	6	24	<0,0001*
Grupo Nigri					
Fonte de variação	F		Graus de Liberdade		<i>P</i>
(a) Entre parcelas					
Parte do fruto		0,12		1	0,73
Área		224,47		2	<0,0001*
(b) Nas parcelas					
	Wilk's lambda	F	Graus de liberdade		<i>P</i>
			Numerador	Denominador	
Época de amostragem	0,0285	136,18	3	12	<0,0001*
Época x parte do fruto	0,9124	0,38	3	12	0,76
Época x área	0,0101	35,85	6	24	<0,0001*

* Significativo a 5% pelo Teste F.

<i>Penicillium sp</i>					
Fonte de variação					
	F	Graus de Liberdade		<i>P</i>	
(a) Entre parcelas					
Parte do fruto	0,00	1		0,96	
Área	18,33	2		0,0001*	
(b) Nas parcelas					
	Wilk's lambda	F	Graus de liberdade		<i>P</i>
			Numerador	Denominador	
Época de amostragem	0,1377	25,04	3	12	<0,0001*
Época x parte do fruto	0,7005	1,71	3	12	0,21
Época x área	0,0528	13,40	6	24	<0,0001*

<i>Fusarium sp</i>					
Fonte de variação					
	F	Graus de Liberdade		<i>P</i>	
(a) Entre parcelas					
Parte do fruto	0,85	1		0,37	
Área	19,91	2		<0,0001*	
(b) Nas parcelas					
	Wilk's lambda	F	Graus de liberdade		<i>P</i>
			Numerador	Denominador	
Época de amostragem	0,1000	35,98	3	12	<0,0001*
Época x parte do fruto	0,9498	0,21	3	12	0,88
Época x área	0,1315	7,03	6	24	0,0002*

* Significativo a 5% pelo Teste F.

A incidência de todas espécies de fungos estudadas foram afetadas pela época de amostragem e comportaram-se de modo semelhante ao verificado para o produto secado no terreiro de cimento, conforme ilustrado na Figura 7.

Existe correlação negativa e significativa entre a incidência de fungos *A. ochraceus*, *A. flavus*, Grupo Nigri, *Penicillium sp.* e *Fusarium sp.* e o conteúdo de água do café ($r = 0,60$; $P < 0,0001$). Este resultado foi obtido pela análise de correlação canônica (parcial) entre o grupo de variáveis formado pela contaminação fúngica causada no café por cada uma das espécies estudadas e uma variável única, o conteúdo de água do café, da pré-colheita à meia-seca, (Tabela 4).

Para as espécies do Grupo Nigri e para o *A. flavus*, que são os principais constituintes do par canônico, baseado nos valores das correlações e coeficientes canônicos, a redução do conteúdo de água favoreceu a tendência de elevação da incidência destes fungos no café. Durante este período, o conteúdo de água do café variou de 68% b.u. na saída dos lavadores a 35% b. u. na meia-seca, quando o produto foi conduzido dos terreiros para o secador.

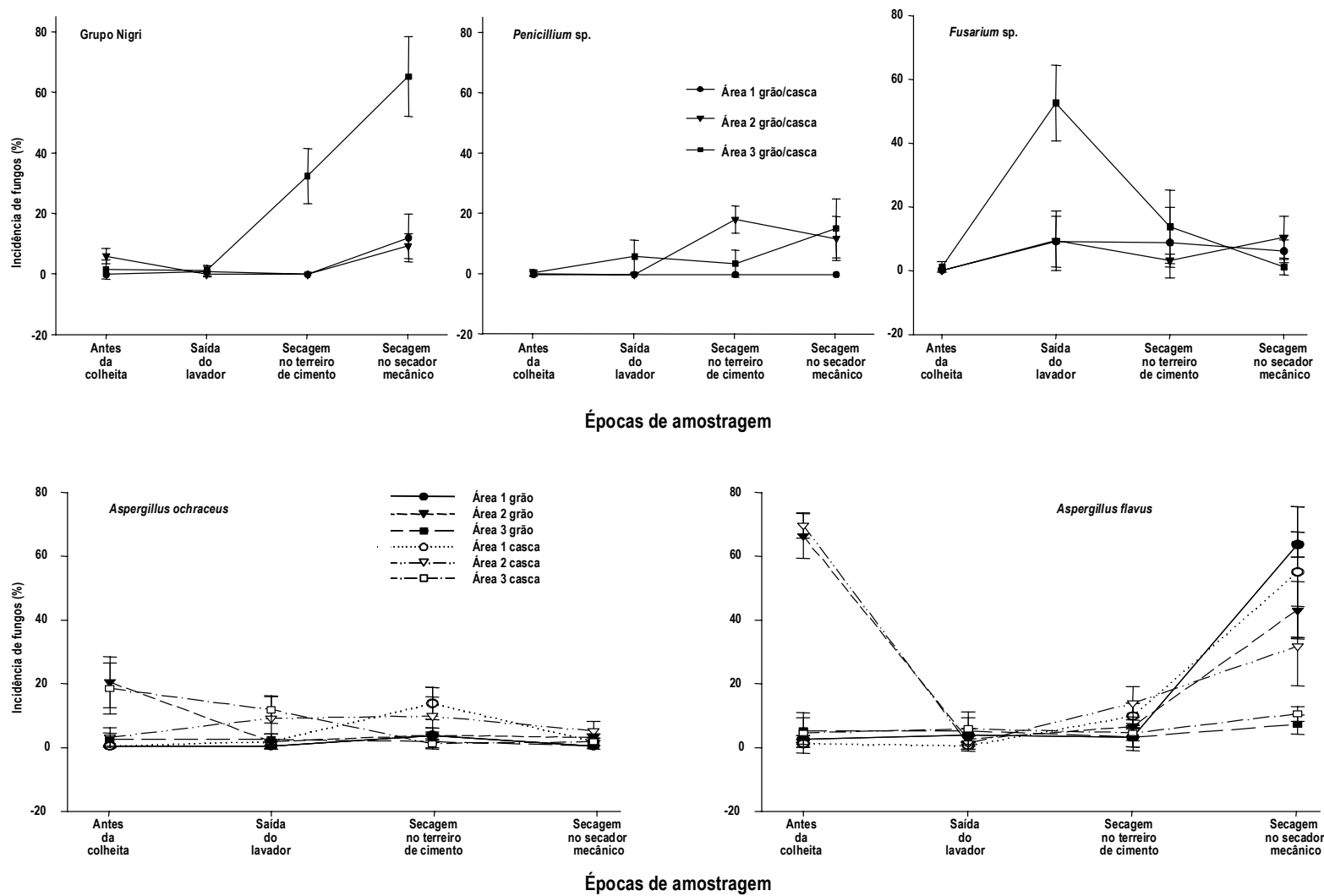


Figura 7. Incidência de fungos no grão e na casca do café obtido nas Áreas 1, 2 e 3 e submetido à secagem em terreiros de chão

Tabela 4. Correlação canônica (parcial) e par canônico entre a incidência de diferentes espécies de fungos na casca e no grão e o conteúdo de água do café nas etapas de pré-colheita e processamento.

Variáveis	Primeiro par canônico	
	Coefficiente	Correlação
Grupo Nigri	0,7351	0,76
<i>A. flavus</i>	0,5341	0,50
<i>Penicillium</i> sp.	0,2986	0,33
<i>Fusarium</i> sp	-0,1626	-0,36
<i>A. ochraceus</i>	-0,0678	-0,19
Umidade	-1,00	-1,00
<i>r</i>	0,60	
F aproximado	11,70	
Graus de liberdade (num.; den.)	5; 102	
P	< 0,0001*	

* Significativo a $P < 0,05$.

Os resultados da análise de OTA nos resíduos do beneficiamento do café em coco e no café beneficiado mostraram que, para as três áreas estudadas, os tipos de terreiros utilizados na secagem não favoreceram a contaminação do produto por OTA (Tabela 5).

Tabela 5. Índice de ochratoxina A (OTA) nos resíduos do beneficiamento e no café beneficiado, cultivado nas Áreas 1, 2 e 3 e submetido à secagem em terreiros de cimento e de chão

Tratamento	Índice de ochratoxina A ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	
	Resíduos do beneficiamento	Café beneficiado
Área 1 terreiro	Nd	Nd
Área 1 chão	Nd	Nd
Área 2 terreiro	Nd	Nd
Área 2 chão	Nd	Nd
Área 3 terreiro	Nd	0,36
Área 3 chão	Nd	Nd
Nd = não detectável, pelo método utilizado, cujo limite de detecção é $0,12 \mu\text{g.kg}^{-1}$ (Brasil, 2000)		

DISCUSSÃO

Mesmo diante dos inúmeros relatos de ocorrência de OTA no café, faltam informações definitivamente esclarecedoras sobre a origem, os mecanismos e as condições sob as quais este contaminante é produzido. O entendimento destas questões pode viabilizar a adoção de

medidas preventivas que contribuam para a redução dos índices de contaminação (Bucheli & Taniwaki, 2002). O objetivo deste trabalho foi obter informações complementares que possam auxiliar na descrição da rota de contaminação do café por OTA, mediante a identificação de fungos toxigênicos da pré-colheita ao processamento do café. Dentre as inúmeras espécies de fungos com relatos de ocorrência no café, foram enfatizadas as seguintes espécies do gênero *Aspergillus*: *A. ochraceus*, citado como a principal causa de OTA em café (Micco *et al.*, 1989; Mantle & Chow, 2000; Taniwaki *et al.*, 2003); *A. flavus*, considerada a mais importante espécie micotoxigênica associada à contaminação de produtos agrícolas armazenados (Christensen & Kaufmann, 1974); as espécies *A. niger* e *A. carbonarius*, por serem consideradas potencialmente produtoras de OTA em café (Mislevic *et al.*, 1983; Téren *et al.*, 1997; Joosten *et al.*, 2001; Suárez-Quiroz *et al.*, 2004), sendo que a incidência das mesmas, foi computada de forma conjunta no Grupo Nigri. Complementarmente, efetuou-se a análise de incidência de *Penicillium* sp. e *Fusarium* sp., por serem espécies fúngicas comumente identificadas no café e que podem competir por substrato com espécies do gênero *Aspergillus* (Silva *et al.*, 2000; Pimenta & Chalfoun, 2001).

A composição do principal eixo canônico no diagrama CVA mostrou o agrupamento das Áreas 1 e 2 distinto da Área 3, o que pode ser explicado pela proximidade e pela semelhança dos tratos culturais, principalmente a densidade de plantio e idade das áreas 1 e 2. A separação das partes do fruto interferiu na infecção fúngica do café proveniente das áreas 1 e 2, sendo que a casca apresentou maior susceptibilidade à colonização fúngica sugerindo que a mesma funciona como uma barreira de proteção ao grão nas etapas de processamento do café. O antagonismo entre os fungos do Grupo Nigri e o *A. flavus*, observado na composição do eixo canônico, provavelmente, reflete a competição entre as espécies de *Aspergillus*, descrita por Christensen & Kaufmann (1974), os quais sugerem uma escala de sobrevivência atribuída à sucessão ecológica natural das espécies.

A diferenciação do comportamento da incidência de fungos no café secado no terreiro de cimento e no terreiro de chão corrobora, em parte, os resultados obtidos por Moraes *et al.* (2003), os quais mencionaram que o contato do produto com o solo, durante a secagem, favorece a colonização fúngica, visto que os resultados obtidos neste trabalho não confirmam os efeitos do tipo de terreiro na formação de OTA no café. Porém, naquele experimento observou-se que a contaminação foi favorecida pelo sistema de colheita utilizado, uma vez que o produto secado diretamente no chão, foi colhido por derriça também no chão, sem a proteção dos panos comumente recomendadas. Neste caso, a fonte de contaminação do produto pode ser atribuída à presença do inóculo no solo, principalmente, pela mistura dos

frutos recém-colhidos com o “café de varrição”, que são os frutos excessivamente maduros que se desprendem naturalmente do cafeeiro e são recolhidos no momento da colheita.

A correlação negativa verificada entre as espécies de fungos identificadas e o conteúdo de água do café durante as etapas estudadas pode ser atribuída à característica xerofítica das espécies de *Aspergillus* analisadas, classificadas como fungos de armazenamento, cujas condições consideradas ótimas para o desenvolvimento incluem o conteúdo de água do produto entre 13 e 18% b.u. ($a_w < 0,85$) (Christensen & Kaufmann, 1974). O elevado conteúdo de água do café cereja é um bom substrato para outros fungos tais como *Cladosporium* sp., *Fusarium* sp, *Alternaria* sp. e *Penicillium* sp., além de bactérias e leveduras que, adaptados a tais condições, são capazes de inibir o desenvolvimento das espécies de fungos toxigênicas (Bucheli & Taniwaki, 2002; Taniwaki *et al.*, 2003).

Observou-se neste estudo que para as espécies de fungos potencialmente produtoras de OTA, os pontos críticos ocorreram durante a secagem nos terreiros e na transferência do produto para o secador, épocas em que a incidência das espécies do Grupo Nigri e *A. ochraceus* mostraram uma tendência a elevação.

De um modo geral, a incidência de fungos observada no café foi considerada baixa, principalmente das espécies *Aspergillus*, sendo que resultados similares foram obtidos em outros estudos realizados na Tailândia (Bucheli *et al.*, 2000), Etiópia, Índia, Indonésia, Kenia e Venezuela (Frank, 1999), no México (Suárez-Quiroz *et al.*, 2004) e no Brasil (Frank, 1999; Silva *et al.*, 2000; Pimenta & Chalfoun, 2001; Batista *et al.*, 2003; Taniwaki *et al.*, 2003). Isto vem sendo atribuído ao fato de que o café não seria um bom substrato à colonização fúngica, mas a constituição biológica do endosperma e a presença do inóculo podem representar fatores de predisposição à formação de OTA (Mantle & Chow, 2000; Taniwaki *et al.*, 2004), principalmente quando favorecidos por descuidos excessivos na manipulação do café durante a colheita, processamento e secagem (Urbano *et al.*, 2001). Os cuidados adotados na execução deste estudo, os quais incluíram a colheita sobre pano, o descarte do café bóia e o adequado monitoramento do produto nos terreiros permitem explicar os baixos índices observados de contaminação por fungos e por OTA.

LITERATURA CITADA

- Abarca, M. L.; Accensi, F.; Bragulat, M. R.; Cabañes, F. J. Current importance of ochratoxin A – Producing *Aspergillus* spp.. **Journal of Food Protection**. 64(6):903-906, 2001.
- American Society of Agricultural Engineers. **ASAE Standards**. ASAE S352.2, 2003, p.593.

- Batista, L. R.; Chalfoun, S. M.; Prado, G.; Schwan, R. F.; Wheals, A. E. Toxigenic fungi associated with processed (green) coffee beans (*Coffea arabica* L.). **International Journal of Food Microbiology**. 85:293-300, 2003.
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Aprova os Métodos Analíticos de Referência para Análise de Micotoxinas em Produtos, Subprodutos e Derivados de Origem Vegetal. Instrução Normativa n. 09 de 24.04.2000, **Diário Oficial da União** 30.03.00, Seção 1, p. 38-41, Brasília, DF.
- Bucheli, P.; Meyer, I.; Pittet, A.; Vuataz, G.; Viani, R. Industrial storage of green robusta coffee under tropical conditions and its impact on raw material quality and ochratoxin A content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 46(11):4507-4511, 1998.
- Bucheli, P.; Kanchanomai, C.; Meyer, I.; Pittet, A. Development of ochratoxin A during robusta (*Coffea canephora*) coffee cherry drying. **Journal of Agricultural Food Chemistry**. 48(4): 1358-1362, 2000.
- Bucheli, P., Taniwaki, M.H. Research on the origin, and on the impact of post-harvest handling and manufacturing on the presence of ochratoxin A in coffee. **Food Additives and Contaminants**. 19(7):655-665, 2002.
- Castilho, J. A. B. Metodologias técnicas e gerenciais capazes de ajudar na prevenção da ochratoxina A ao longo de toda a cadeia produtiva do café. **Revista Brasileira de Armazenamento**. Especial Café (2):11-21, 2001.
- Christensen, C. M.; Kaufmann, H. H. Microflora. In: Christensen, C. M. (ed). **Storage of Cereal Grains and Their Products**. St. Paul, Minnesota: AACC, 1974. cap. 4, p.158-192.
- Corrêa, T.B.S.; Silva, O.F. APPCC na melhoria da qualidade do café. In: Zambolim, L. (Ed.) **O estado da arte de tecnologias na produção de café**. Viçosa: UFV, Departamento de Fitopatologia, 2002. p. 559-567
- Dhingra, O. D.; Sinclair, J.B. **Basic Plant Pathology Methods** - Secadond edition, 434pp, CRC Press, 1996.
- Duris, D. Coffee and ochratoxin contamination. In: Hanak, E.; Boutrif, E.; Fabre, P.; Pineiro, M. (Scientific Editors). **Food Safety Management in Developing Countries**. Montpellier, France, 2002. p.1-5.
- Frank, J. M. Modeling and HACCP tools for coffee quality improvement. **Workshop: Micotoxinas em café**. Belo Horizonte/MG, 7p.,1999.
- Frank, J.M.; Frisvad, J.C. Mycological considerations of coffee production consenquential to a HACCP plan for mould prevention. In Workshop: Micotoxinas em Café, 1999, **Anais ...** Belo Horizonte, MG, 7p.
- Heilmann, W.; Rehfeldt, A. G.; Rotzoll, F. Behavior and reduction of ochratoxin A in green coffee beans in response to various processing methods. **European Food Research and Technology**. 209:297-300, 1999.

- International Coffee Organization. **ICO Annual Review 2002/2003**. Available on <<http://www.ico.org/frameset/icoset.htm>>. Access in 06.16.2004.
- Joosten, H. M. L. J.; Goetz, J.; Pitter, A.; Schellenberg, M.; Bucheli, P. Production of ochratoxin A by *Aspergillus carbonarius* on coffee cherries. **International Journal of Food Microbiology**. 65:39-44, 2001.
- Klich, M. A. **Identification of common *Aspergillus* species**. USDA, ARS, Southern Regional Research Center, New Orleans, Louisiana, USA, 116p., 2000.
- Leoni, L. A. B.; Furlani, R. P. Z.; Soares, L. M. V. S.; Oliveira, P. L. C. Ochratoxin in Brazilian green coffee. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. 21(1):105-107, 2001.
- Levi, C. P.; Trenk, H. L.; Mohr, H. K. Study of the occurrence of ochratoxin A in green coffee beans. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists..** 57(4):866-870, 1974.
- Levi, C. P. Mycotoxin in coffee. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists..** 63(6):1282-1285, 1980.
- Mabbett, T. Storing up problems? **Coffee & Cocoa International**, September, 2002.
- Mantle, P. G.; Chow, A. M. Ochratoxin formation in *Aspergillus ochraceus* with particular reference to spoilage of coffee. **International Journal of Food Microbiology**. 56:105-109, 2000.
- Mantle, P. G. Uptake of radiolabelled ochratoxin A from soil by coffee plants. **Phytochemistry**. 53:377-378, 2000.
- Mantle, P. G. Risk assessment and the importance of ochratoxins. **International Biodeterioration & Biodegradation**. 50:143-146, 2002.
- Micco, C.; Grossi, M.; Miraglia, M.; Brera, C. A study of the contamination by ochratoxin A of green and roasted coffee beans. **Food Additives and Contaminants**. 6(3):333-339, 1989.
- Mislivec, P. B.; Bruce, V. R.; Gibson, R. Incidence of toxigenic and other molds in green coffee beans. **Journal of Food Protection**. 46(11):969-973, 1983.
- Moraes, M. L. P.; Luchese, R. H. Ochratoxin A on green coffee: influence of harvest and drying processing procedures. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 51:6824-5828, 2003.
- Pimenta, C. J.; Chalfoun, S. M. Composição microbiana associada ao café em coco e beneficiado colhido em diferentes estádios de maturação. **Ciências Agrotécnicas**. 25(3):677-682, 2001.
- Romani, S.; Sacchetti, G.; López, C. C.; Pinnavaia, G. G.; Rosa, M. D. Screening on the occurrence of ochratoxin A in green coffee beans of different origins and types. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 48(8):3616-3619, 2000.

- SAS Institute. SAS user's guide: Statistics, version 8.2, 6th ed. **SAS Institute**, Cary, NC. Todd and Browde, 2001.
- Silva, C. F.; Schwan, R. F.; Dias, E. S.; Wheals, A. E. .Microbial diversity during maturation and natural processing of *Coffea arabica* in Brazil. **International Journal of Food Microbiology**. 60:251-260, 2000.
- Studer-Rohr, I.; Dietrich, D. R.; Schlatter, J.; Schlatter, C. The occurrence of ochratoxin A in coffee. **Food Chemistry Toxicology**. 33(5): 341-355, 1995.
- Suárez-Quiroz, M.; González-Rios, O.; Barel, M.; Guyot, B.; Schorr-Galindo, S.; Guiraud, J. P. Study of ochratoxin A – producing strains in coffee processing. **International Journal of Food Science and Technology**. 39:501-507, 2004.
- Taniwaki, M.H.; Pitt, J.I.; Teixeira, A.A.; Iamanaka, B.T. The source of ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to processing methods. **International Journal of Food Microbiology**. 82:173-179, 2003.
- Téren, J.; Palágyi, A.; Varga, J. Isolation of ochratoxin producing *Aspergilli* from green coffee beans of different origin. **Cereal Research Communications**. 25(3/1):303-302, 1997.
- Urbano, G. R.;Taniwaki, M. H.; Leitaó, M. F. De F.; Vicentini, M. C. Occurrence of ochratoxin A – Producing fungi in raw Brazilian coffee. **Journal of Food Protection**. 64(8):1226-1230, 2001.
- Von Ende, C. N. Repeated-measures analysis: growth and other time-dependent measures. In: Scheiner, S. M. & Gurevitch, J. (eds.). **Design and Analysis of Ecological Experiments**. New York: Chapman & Hall, 1993. Chapter 6, p.113-137.

Incidência de fungos e seus efeitos sobre a qualidade do café durante o armazenamento

RESUMO – Nas etapas de pós-colheita, o café em grãos pode ser infectado por fungos que, além de contaminar o produto com micotoxinas, causam alterações físico-químicas, que podem afetar a qualidade do produto. Objetivando a obtenção de informações sobre os efeitos da contaminação do café por fungos e ochratoxina A (OTA), no presente trabalho foram avaliados o teor de água, a acidez total do grão, a condutividade elétrica, a acidez do óleo, a incidência de fungos, o índice de OTA e os demais parâmetros incluídos na classificação e degustação do café durante o armazenamento. O produto, colhido por derriça no pano em três áreas topograficamente distintas, foi submetido à secagem em terreiros de cimento e de chão, com complementação do processo em secadores mecânicos a baixa temperatura. O café beneficiado, acondicionado em sacos de juta, foi armazenado por 180 dias e amostrado periodicamente para avaliações qualitativas. Verificou-se que o conteúdo de água, a acidez do óleo e a acidez do grão foram afetadas pelo tempo de armazenamento, pela área de plantio e pelo tipo de terreiro utilizado na secagem. A condutividade elétrica e o número de defeitos mostraram uma correlação positiva com a incidência de fungos, principalmente *Penicillium* sp., *Fusarium* sp e espécies do Grupo Nigri. De modo geral, a incidência de fungos foi considerada baixa, não resultando em contaminação do produto por OTA. A variação do número de defeitos não afetou a tipificação, a coloração e a qualidade de bebida do café. A adoção de cuidados preventivos na colheita e pré-processamento, previne a infestação por fungos, favorecendo a manutenção da qualidade do café durante o armazenamento.

PALAVRAS-CHAVE: Armazenamento café, ochratoxina, fungos café.

Fungi incidence and their effects on coffee quality during the storage

ABSTRACT – At post harvest period, coffee beans can be infected by fungi which can contaminate the product with mycotoxins and cause physical and chemical changes that can affect the product quality. In order to obtain information about the mechanisms and effects of contamination on coffee by fungi and ochratoxin A (OTA), this work evaluated the moisture content, total titrable acidity, electrical conductivity, free fatty acids, molds incidence, OTA level, and the other parameters on coffee grading and beverage quality during the storage. Coffee fruits were harvested by manual picking from three areas located on different topographic conditions and partly sun-dried on the ground and on the concrete floor. The drying was concluded on a mechanical drier using low temperature. Coffee beans were package in jute bags and stored for 180 days. During this period they were being sampled for qualitative analysis. It was observed that the moisture content, fatty free acids and total titrable acidity were affected by storage time, cultivated area and the type of sun-drier floor. Electrical conductivity and green coffee defects have shown a positive correlation with fungi incidence, mainly *Penicillium* sp., *Fusarium* sp and Nigri Group species. In general fungi incidence was considered low, not resulting in contamination of coffee beans by the OTA. Variation on green coffee defects did not affect the grade, color and beverage quality of coffee. It was concluded that some preventive cares must take place on coffee production chain, mainly on harvest and handling in order to avoid fungi infection and maintain the desirable coffee quality during storage.

KEY WORDS: Coffee storage, ochratoxin, coffee molds.

INTRODUÇÃO

As micotoxinas constituem-se um grupo de metabólitos secundários caracterizados por uma ampla diversidade de estruturas químicas e atividades biológicas. Na maioria dos grupos de fungos podem ser encontradas espécies micotoxigênicas, sendo que o gênero *Aspergillus* é, sem dúvida, um dos mais importantes. Dentre as micotoxinas produzidas por *Aspergillus* sp., a ochratoxina A (OTA) tem recebido uma atenção crescente em todo o mundo por representar um sério risco à saúde humana e animal, e devido, principalmente, ao aumento dos registros de casos de contaminação em alimentos tais como café, cerveja, vinho, suco de uva e leite (Nakajima *et al.*, 1997; Téren *et al.*, 1997; Bucheli *et al.*, 1998; Jorgensen, 1998; Bucheli *et al.*, 2000; Joosten *et al.*, 2001; Taniwaki *et al.*, 2003).

A contaminação do café por OTA tornou-se cada vez mais preocupante à medida que os métodos analíticos tornaram-se mais sensíveis (Tsubouchi *et al.*, 1988; Micco *et al.*, 1989; Urbano *et al.*, 2001). Micco *et al.* (1989) estudando a incidência de OTA no café produzido pelos principais países exportadores, constataram índices de contaminação entre 0,2 e 15 $\mu\text{g kg}^{-1}$ em 58% das amostras analisadas. Os dados obtidos mostraram que a contaminação ocorreu independentemente da espécie botânica, sendo que, posteriormente, Romani *et al.* (2000), ao traçarem um perfil da ocorrência de OTA no café importado pela Itália, em função do país de origem e da espécie, constataram uma maior frequência e índices de incidência mais elevados no café Robusta oriundo dos países africanos.

Devido à ausência de dados conclusivos sobre os mecanismos de contaminação do café, uma das hipóteses que vem sendo estudada considera que o processo poderia ser desencadeado nas etapas de transporte e armazenamento do produto (Frank, 1999; Batista *et al.*, 2003).

Como a maioria dos produtos agrícolas, a produção de café é sazonal, tornando-se inevitável o armazenamento deste *commodity* por períodos de tempo variados, para viabilizar o atendimento à demanda amplamente distribuída durante o ano. Nesta fase, a definição e a aplicação de medidas de controle torna-se um enorme desafio para produtores, beneficiadores, comerciantes e instituições responsáveis pela garantia da qualidade do produto ofertado ao consumidor (Duris, 2002; Mabbet, 2002).

A presença de fungos, além dos riscos de contaminar os grãos com micotoxinas, pode alterar a qualidade do produto e favorecer a transformação, em nutrientes, da matéria orgânica presente no substrato, alterando a composição química do café (Batista *et al.*, 2003). Tais alterações vêm sendo estudadas, principalmente, pela análise dos parâmetros físico-químicos, dentre eles a acidez, a atividade da polifenoloxidase, os compostos fenólicos, o índice de

coloração e a condutividade elétrica (Godinho *et al.*, 2000; Pimenta & Vilela, 2001; Arêdes, 2002).

A acidez titulável total dos grãos de café tem sido correlacionada com a qualidade do produto em estudos sobre as estruturas, formas e períodos de armazenamento, sendo que as repostas obtidas ainda não são consideradas conclusivas, devido às divergências observadas entre os resultados (Carvalho *et al.*, 1994; Godinho *et al.*, 2000; Coelho *et al.*, 2001; Barbosa *et al.*, 2002; Malta *et al.*, 2003).

A integridade da membrana celular, medida pela condutividade elétrica do grão, tem sido sugerida como um indicador complementar de qualidade do café, devido à empiricidade dos métodos de avaliação comercial comumente utilizados (Prete, 1992). A perda da seletividade das membranas em sementes de café está normalmente associada a fatores ambientais inadequados como alta umidade e temperaturas elevadas (Amorim, 1978), e/ou danos mecânicos durante as etapas de processamento e armazenamento. Devido à simplicidade metodológica, a determinação da condutividade elétrica dos grãos vem sendo recomendada pelos programas de monitoramento da qualidade do café (Prete, 1992; Godinho *et al.*, 2000; Coelho *et al.*, 2001; Arêdes, 2002; Goulart *et al.*, 2003).

A ocorrência de deterioração nos grãos pode, ainda, ser observada por alterações no teor de óleo devido aos processos oxidativos, que resultam em odor e sabor característicos da rancificação; ou aos processos hidrolíticos, que resultam na produção de ácidos graxos livres.

Considerando que os grãos possuem antioxidantes naturais e que nos grãos inteiros os lipídeos encontram-se protegidos da oxidação pelo oxigênio do ar, os processos oxidativos são mais relevantes na deterioração de farelos e de produtos agrícolas com elevados teores de óleo. Para a maioria dos grãos armazenados deve-se atentar para a hidrólise dos ácidos graxos, que pela ação da lipase, resultam em ácidos graxos livres e glicerol. Tais alterações podem ser utilizadas como indicativo de deterioração fúngica, uma vez que podem ser aceleradas na presença de fungos, dentre eles as espécies de *Penicillium* e *Aspergillus*, que apresentam elevada atividade lipolítica (Christensen & Kaufmann, 1974; Pomeranz, 1992; Tipples, 1995; Wicklow, 1995).

Ao associarem a qualidade de bebida com a composição química do café, alguns autores evidenciaram o aumento da acidez do óleo e do teor de ácidos graxos livres como resultado de processos de hidrólise e oxidação dos lipídeos durante a sua deterioração, sem contudo correlacionar tal parâmetro com a incidência de fungos (Prete, 1992).

A associação entre o aumento na porcentagem de sementes infectadas por fungos de armazenamento com o aumento no índice de ácidos graxos livres e redução da qualidade já foi descrita para alguns produtos agrícolas como milho, trigo e soja, muito embora tais

informações não sejam ainda conclusivas (Lisker & Ben-Efraim, 1985; Pomeranz, 1992; Dhingra *et al.*, 2001).

Devido à indisponibilidade de informações relacionando a deterioração fúngica do café com as alterações no teor de ácidos graxos livres, torna-se plausível estudar o assunto, uma vez que o café apresenta teores médios de lipídeos em torno de 11%, com predominância dos ácidos graxos oléico, linoléico e palmítico, assemelhando-se, neste aspecto, aos demais grãos mencionados anteriormente (Sivetz, 1963).

Outro aspecto importante vinculado à qualidade comercial do café e que pode estar relacionado à contaminação por OTA é a informação obtida na classificação física do produto, cujos parâmetros incluem a cor, o tamanho e o tipo de peneira e o tipo e número de defeitos. Os relatos disponíveis sobre o assunto, apesar de divergentes, apontam para a existência de uma correlação positiva entre os defeitos, em especial os grãos danificados por insetos (brocados) e a contaminação por OTA, uma vez que a infestação dos frutos pela broca do café (*Hypothenemus hampei*), ocorrida na lavoura, constitui-se uma das prováveis rotas de colonização do café por fungos toxigênicos (Vega & Mercadier, 1998; Bucheli *et al.*, 2000; Leoni *et al.*, 2001).

Os fungos toxigênicos estão dispersos, sob a forma de esporos, nos diversos ambientes de processamento e armazenamento do café. Entretanto, a presença isolada do inóculo não determina a contaminação, que depende das condições de temperatura, o conteúdo de água do produto e do meio e, ainda, do tipo de substrato (Mislivec *et al.*, 1983; Bucheli *et al.*, 1998; Frank & Frisvard, 1999).

As boas práticas de armazenamento do café recomendam que o produto seja armazenado com o conteúdo de água inferior a 13,0% b.u., preferencialmente próximo de 11,0% b.u., sendo que os riscos tornam-se eminentes quando a disponibilidade de água aumenta a atividade de água para valores superiores a 0,65 (Urbano *et al.*, 2001).

Ainda que a interação entre microorganismos e café durante o armazenamento não esteja definitivamente esclarecida, tem-se a informação de que, para a produção de OTA *in vitro* é requerida uma atividade de água de no mínimo 0,80, ou seja, grãos com conteúdo de água em torno de 14,0% b.u., portanto, fora da faixa recomendada como segura para a armazenagem do café (Bucheli & Taniwaki, 2002).

Independentemente do tempo e das condições em que o produto permanecer armazenado, seja para fins de manutenção de estoque, ou em estruturas de transporte, o conhecimento prévio dos mecanismos e interações entre o fungo e o grão é uma ferramenta importante para a aplicação de medidas preventivas, o estabelecimento de limites regulamentares e a adoção de estratégias de controle.

Como forma de contribuir para a obtenção de tais informações, este trabalho teve por objetivo investigar as possíveis correlações entre as características físico-químicas e a contaminação dos grãos por fungos e OTA, mediante a avaliação do conteúdo de água, da acidez titulável total, da acidez do óleo, da condutividade elétrica e da incidência de defeitos do café durante o armazenamento, considerando a área de plantio e o tipo de terreiro utilizado na secagem.

MATERIAL E MÉTODOS

Identificação da área experimental

O produto foi obtido de uma propriedade produtora de café (*Coffea arabica* L.) localizada no município de Teixeiras, MG (20°39'06"S, 42°51'22"W), onde foram selecionados três talhões em diferentes localizações topográficas.

O primeiro talhão, denominado de Área 1 (A1) ocupa a parte mais alta da propriedade e contém 19.740 plantas, com densidade de plantio de 4.160 plantas/ha. A Área 2 (A2), localizada na encosta do morro totaliza 8.000 pés de café, com 5.100 plantas/ha. Ambas as lavouras foram formadas há 26 anos e foram recepadas no ano anterior à execução deste trabalho. A Área 3 (A3), com dez anos de plantio, é composta por 7.000 pés, apresentando densidade de 7.100 plantas/ha

Identificação do produto e obtenção das amostras

Cada talhão foi colhido separadamente, por derriça manual no pano, e o produto obtido, depois de passar pelo lavador, foi dividido em dois lotes de igual tamanho, sendo um destinado à secagem em terreiro de cimento e o outro em terreiro de chão batido, até que fosse atingida o conteúdo de água de meia-seca, em torno de 35% base úmida (b.u.).

Mantendo-se a individualidade dos lotes por talhão de origem e pelo tipo de terreiro utilizado, a secagem foi completada em um secador mecânico de camada fixa, com múltiplas câmaras de secagem com fundo de chapa metálica perfurada, onde o café meia-seca recebia o fluxo de ar aquecido a 40 °C, sendo revolvido a cada três horas, até que o conteúdo de água do produto atingisse 13% b.u..

Concluída a secagem do produto, os lotes de café em coco foram beneficiados individualmente, por processo mecânico, acondicionados em sacos de juta e armazenados pelo período de 180 dias, no galpão da Área de Armazenamento do Departamento de Engenharia Agrícola - DEA/UFV. As condições de temperatura e umidade relativa do local

foram monitoradas por sensores conectados a um sistema informatizado de aquisição de dados que registrava a leitura destas variáveis climáticas a cada dez minutos.

Adotando-se os procedimentos estabelecidos na Norma ISO 4072 (International Organization for Standardization, 1985), o produto foi amostrado durante o ensacamento, denominado de “tempo zero” e durante o armazenamento nas seguintes épocas: aos 90, 135 e 180 dias. As amostras obtidas, devidamente acondicionadas e identificadas, foram submetidas às seguintes análises: determinação do conteúdo de água e condutividade elétrica, executadas no Laboratório de Grãos localizado na Área de Armazenamento - DEA/UFV; acidez do óleo, acidez titulável total e incidência de fungos, realizadas na Clínica de Doenças de Plantas do Departamento de Fitopatologia - DFP/UFV.

Utilizando-se o mesmo procedimento de amostragem, foram coletadas amostras para classificação física e prova de xícara e para análise quantitativa de OTA.

Determinação do conteúdo de água

Utilizou-se o procedimento descrito na norma ASAE S352.2, a 103 °C por 72 horas (ASAE, 2003).

Deteção e identificação de fungos

Utilizou-se o método de plaqueamento em caixas gerbox, com papel tipo Blotter umedecido com água destilada e esterilizada. Os grãos, desinfetados superficialmente por imersão, durante um minuto, em solução de hipoclorito de sódio a 2%, foram plaqueados e incubados a 25 °C, durante 7 dias (Dhingra & Sinclair, 1996). Utilizando-se um microscópio estereoscópico os grãos infectados foram contados e os resultados expressos em porcentagem. As espécies *A. ochraceus*, *A. flavus* e as pertencentes ao Grupo Nigri foram identificadas de acordo com Klich (2000).

Análise de Ochratoxina A (OTA)

As amostras de café foram encaminhadas ao Laboratório de Controle de Qualidade e Segurança Alimentar - LACQSA do Ministério da Agricultura, localizado em Belo Horizonte, MG, para análise de OTA, utilizando-se a metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) estabelecida na Instrução Normativa SDA/MA Nº 09 de 24.04.2000 (Brasil, 2000). Os resultados foram expresso em $\mu\text{g kg}^{-1}$ e constaram em Laudos de Análise emitidos por aquela instituição.

Análise da acidez do óleo

O óleo foi previamente extraído dos grãos com hexano e analisado quanto à acidez, utilizando-se o método 939.05 da AOAC (Association of Official Analytical Chemists, 1998), sendo o resultado expresso em % de ácidos graxos livres.

Análise da acidez titulável total

A análise deste parâmetro seguiu o procedimento descrito pelo método 920.92 da AOAC (Association of Official Analytical Chemists, 1998) e o resultado expresso em ml de NaOH/100 g de matéria seca.

Condutividade elétrica

Utilizou-se o “Sistema de copo” ou “Condutividade de massa”, que consistiu em colocar os grãos em um germinador à temperatura de 25 °C, imersos em água deionizada, durante um período de 24 h. Posteriormente, a condutividade elétrica da solução contendo os grãos foi medida utilizando-se um condutivímetro elétrico com ajuste para compensação de temperatura e o resultado foi expresso em $\mu\text{S cm}^{-1} \text{ g}^{-1}$ (Vieira, 2001).

Classificação física e degustação (prova de xícara)

As amostras de café foram encaminhadas ao Setor de Classificação da Superintendência Federal de Agricultura em Minas Gerais, localizado em Belo Horizonte, onde foram classificadas, por um profissional habilitado, quanto aos defeitos, à coloração e à qualidade da bebida, de acordo com a Instrução Normativa do Ministério da Agricultura Nº 08 de 11.06.2003 (Brasil, 2003).

Delineamento experimental

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três repetições. Os tratamentos foram estabelecidos em arranjo fatorial 3 x 2 (três áreas de plantio: A1, A2 e A3; dois tipos de terreiros: cimento e chão).

Análise dos dados

Para verificar as possíveis associações lineares das características físico-químicas do café entre as áreas de plantio monitoradas e o tipo de terreiro utilizado na secagem do produto, foi usada a análise de variáveis canônicas (CVA), que é uma técnica de ordenação indireta que permite reduzir a amplitude dos dados originais obtidos no conjunto das variáveis e pode ser usada para ilustrar a dispersão gráfica das orientações e posições relativas do grupo

de respostas para os tratamentos comparados. A significância da separação entre os grupos de tratamentos, indicada pela ordenação, foi determinada pelas medidas de similaridade obtidas na comparação dos tratamentos pelo teste de F aproximado ($p < 0,05$), usando a distância de Mahalanobis entre as variáveis canônicas. Essa análise foi executada utilizando-se o procedimento CANDISC do pacote estatístico SAS (SAS Institute, 2001).

As diferenças entre os tratamentos na avaliação dos parâmetros físico-químicos estudados foram determinadas pela análise de variância por medida repetida (PROC ANOVA com especificação PROFILE; SAS Institute, 2001) considerando cada época de amostragem, durante o período de armazenamento do café. Este procedimento foi usado porque o produto era amostrado em épocas diferentes no mesmo lote.

Os dados obtidos nas análises físico-químicas do café foram usados em análise de correlação canônica, através do procedimento PROC CANCORR (SAS Institute, 2001), para testar a relação entre a incidência de fungos no café nas diferentes fases do estudo e a alteração das características qualitativas avaliadas. Na utilização deste procedimento, os dados referentes ao conteúdo de água do café foram excluídos das análises, uma vez que tal parâmetro é informativo e não retrata a qualidade do produto.

RESULTADOS

A análise das variáveis canônicas CVA para as três áreas de plantio (A1, A2 e A3) e tipos de terreiros utilizados na secagem do café (terreiro e chão) mostrou diferenças significativas entre os tratamentos, para as características físico-químicas observadas (Wilks' Lambda = 0,1489; $gl_{(num/den)} = 25/231,82$; $p < 0,0001$). Dois eixos canônicos foram significativos ($P < 0,0001$ e $P = 0,03$) dentre os cinco eixos calculados (Tabela 1), os quais foram responsáveis por 87,23% e 9,51% da variância total (96,74%) explicada pelos dados. Os maiores valores absolutos dos coeficientes mostram quais foram os parâmetros físico-químicas do café que mais contribuíram para o padrão de divergência entre as áreas cultivadas e os tipos de terreiros utilizados. Para o primeiro eixo canônico de maior peso na análise, a acidez do óleo e o conteúdo de água, com relação oposta, apresentaram os maiores coeficientes e, portanto, maior contribuição para as diferenças entre os grupos de tratamento. O número de defeitos e a condutividade elétrica foram responsáveis pelo padrão de divergência do segundo eixo.

O diagrama de ordenação derivado da análise das variáveis canônicas foi feito com os dois primeiros eixos canônicos significativos, mostrando, de forma clara, a distinção entre a

Área 3 e as Áreas 1 e 2, que se mostraram agrupadas (Figura 1). O tipo de terreiro utilizado na secagem afetou o conjunto das características físico-químicas do café apenas para a área 1, não afetando o produto das áreas 2 e 3 quanto aos parâmetros qualitativos avaliados.

Os dados da análise de medidas repetidas permitiram a interpretação do comportamento individual, durante o armazenamento, de cada característica físico-química avaliada em relação às áreas de plantio e tipo de terreiro utilizado na secagem do café (Tabela 2). Para todos os parâmetros estudados houve efeito significativo do tempo, sendo que as interações tempo x tipo de terreiro e tempo x área de plantio afetaram, significativamente, o conteúdo de água, a acidez do óleo e a condutividade elétrica. Para a interação tempo x área x tipo de terreiro, resultados significativos foram encontrados na determinação do conteúdo de água, da acidez do óleo e da acidez do grão.

Tabela 1. Eixos canônicos e seus coeficientes (entre estrutura canônica) relativos às características físico-químicas do café, colhido nas áreas 1, 2 e 3 e secados em terreiros de cimento e de chão

Variáveis (características físico-químicas)	Eixos canônicos	
	1	2
Acidez do óleo	0,98	-0,18
Umidade	- 0,96	0,20
Condutividade	0,66	0,57
Número de defeitos	0,42	0,50
Acidez titulável do grão	- 0,38	0,48
F	6,21	1,83
gl (numerador; denominador)	25;231,82	16;193,11
P	<0,0001*	0,0295*
Correlação canônica parcial	0,77	0,27

* Significativo a 5% pelo teste de F.

O conteúdo de água do produto apresentou variações durante o armazenamento, mas ao final do período os valores observados foram praticamente os mesmos para todos os tratamentos, indicando que o conteúdo de água médio do produto, em torno de 12,5% b.u. entrou em equilíbrio com a umidade relativa do local de armazenamento, cujo valor médio observado foi 78%. A acidez do óleo, que foi a variável que mais contribuiu para a significância do primeiro eixo canônico apresentou tendência a elevação, independentemente da área e do tipo de terreiro utilizado, diferindo do comportamento da acidez titulável total do grão, que mostrou uma tendência a redução no decorrer do armazenamento (Figura 2).

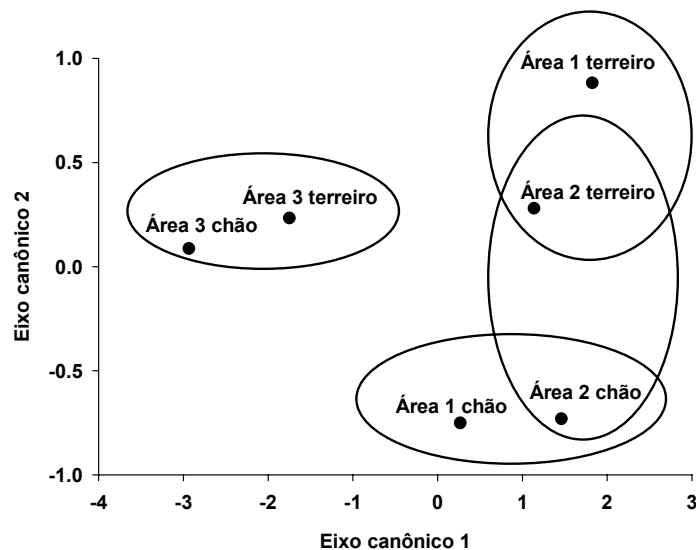


Figura 1. Diagrama de ordenação (CVA) mostrando a discriminação nos tipos de terreiro e nas áreas de plantio. Tratamentos dentro do mesmo círculo não diferem significativamente pelo Teste F ($P < 0,05$) baseado na distância de Mahalanobis (D^2) entre as médias

A condutividade elétrica dos grãos, cuja interação tempo x área x secagem não foi significativa, apresentou uma tendência a redução e comportamento semelhante para todos os tratamentos, o que pode ser observado na Figura 2, pelo formato e paralelismo das curvas de resposta. O número de defeitos, que, juntamente com a condutividade elétrica, foram as variáveis que mais contribuíram para a significância do segundo eixo canônico gerado na análise CVA, mostrou uma tendência à estabilização, a partir dos 135 dias de armazenamento. Em todos os tratamentos, prevaleceu entre os defeitos a elevada incidência dos grãos quebrados, cuja ocorrência deveu-se à ausência de mecanismos de ajustes no equipamento utilizado para o beneficiamento do café.

A interação entre as características físico-químicas e a incidência de fungos no café colhido nas três áreas e secado nos terreiros de cimento e de chão, foi pesquisada através da análise de correlação canônica entre estes dois grupos de variáveis. O resultado obtido mostrou uma correlação significativa entre estes grupos (Wilk's lambda = 0,42; $F = 3,17$; $gl_{num/den} = 20/209,9$; $p < 0,0001$), sendo que apenas a primeira correlação foi significativa, com um coeficiente de correlação de 0,65 (Tabela 3).

Tabela 2. Análise de variância multivariada, com medidas repetidas, do conteúdo de água, acidez titulável total do grão, acidez do óleo, condutividade elétrica e número de defeitos, durante o armazenamento do café em grãos, obtido nas Áreas 1, 2 e 3 e submetido à secagem em terreiros de cimento e de chão. Efeitos são computados entre as parcelas (a) e nas parcelas (b)

Fonte de variação	Conteúdo de água				
	F	Graus de Liberdade		<i>p</i>	
(a) Entre parcelas					
Secagem	0,10	1		0,76	
Área	45,27	2		<0,0001*	
Área x secagem	5,67	2		0,02*	
(b) Nas parcelas					
	Wilk's lambda	F	Graus de liberdade		<i>P</i>
			Numerador	Denominador	
Tempo	0,2350	138,51	3	10	<0,0001*
Tempo x secagem	0,3317	6,71	3	10	0,0092*
Tempo x área	0,0196	20,50	6	20	<0,0001*
Tempo x área x secagem	0,2810	2,95	6	20	0,03*

Fonte de variação	Acidez do óleo				
	F	Graus de Liberdade		<i>P</i>	
(a) Entre parcelas					
Secagem	14,73	1		0,0024*	
Área	709,92	2		<0,0001*	
Área x secagem	22,14	2		<0,0001*	
(b) Nas parcelas					
	Wilk's lambda	F	Graus de liberdade		<i>p</i>
			Numerador	Denominador	
Tempo	0,0004	7924,91	3	10	<0,0001*
Tempo x secagem	0,0532	59,29	3	10	<0,0001*
Tempo x área	0,0084	33,03	6	20	<0,0001*
Tempo x área x secagem	0,0152	23,71	6	20	<0,0001*

* Significativo a 5% pelo Teste F.

Fonte de variação	Acidez titulável total do grão				
	F	Graus de Liberdade		<i>p</i>	
(a) Entre parcelas					
Secagem		0,01	1	0,93	
Área		0,48	2	0,63	
Área x secagem		1,33	2	0,30	
(b) Nas parcelas					
	Wilk's lambda	F	Graus de liberdade		<i>P</i>
			Numerador	Denominador	
Tempo	0,0337	95,49	3	10	<0,0001*
Tempo x secagem	0,6435	1,85	3	10	0,020
Tempo x área	0,3442	2,35	6	20	0,07
Tempo x área x secagem	0,1699	4,75	6	20	0,0037*

Condutividade elétrica					
Fonte de variação					
	F	Graus de Liberdade		<i>P</i>	
(a) Entre parcelas					
Secagem		196,10	1	<0,0001*	
Área		53,32	2	<0,0001*	
Área x secagem		13,44	2	<0,0009*	
(b) Nas parcelas					
	Wilk's lambda	F	Graus de liberdade		<i>P</i>
			Numerador	Denominador	
Tempo	0,0008	3929,67	3	10	<0,0001*
Tempo x secagem	0,0670	46,39	3	10	<0,0001*
Tempo x área	0,0910	7,71	6	20	0,0002*
Tempo x área x secagem	0,3171	2,59	6	20	0,05

Número de defeitos					
Fonte de variação					
	F	Graus de Liberdade		<i>P</i>	
(a) Entre parcelas					
Secagem		13,42	1	0,0032*	
Área		2,69	2	0,11	
Área x secagem		4,19	2	0,04*	
(b) Nas parcelas					
	Wilk's lambda	F	Graus de liberdade		<i>p</i>
			Numerador	Denominador	
Tempo	0,3974	5,05	3	10	0,02*
Tempo x secagem	0,9027	0,36	3	10	0,78
Tempo x área	0,3991	1,94	6	20	0,12
Tempo x área x secagem	0,6237	0,89	6	20	0,52

* Significativo a 5% pelo Teste F.

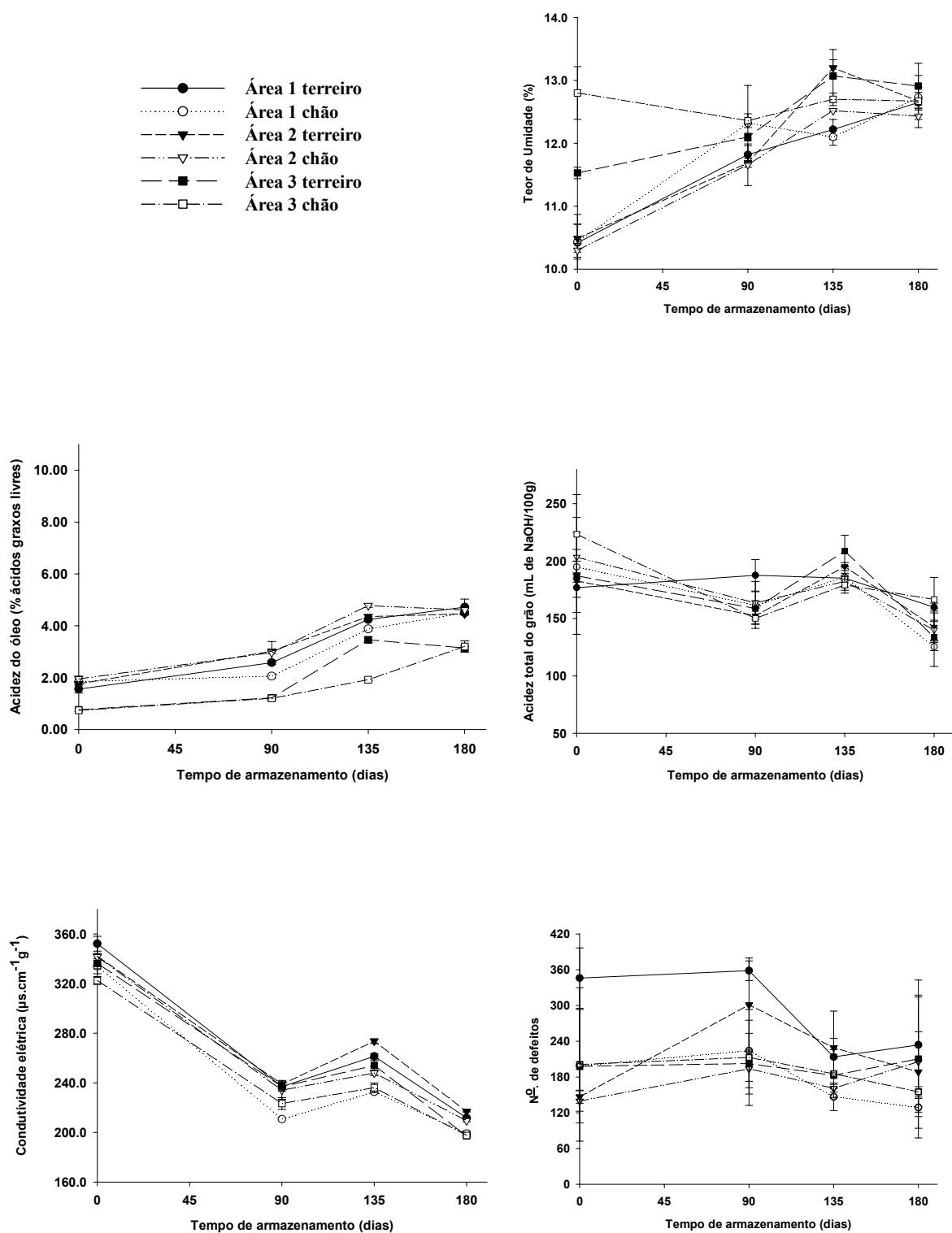


Figura 2. Variação das características físico-químicas do café em grãos, obtido nas Áreas 1, 2 e 3 e submetido à secagem em terreiros de cimento e de chão, durante o armazenamento

Tabela 3. Correlação canônica e par canônico entre as características físico-químicas e a incidência de fungos no café cultivado nas Áreas 1, 2 e 3 e submetido à secagem em terreiros de cimento e de chão

Variáveis	Par canônico	
	Coefficiente	Correlação
Características físico-químicas:		
Condutividade	1,14	0,89
Acidez do óleo	0,34	- 0,23
Número de defeitos	- 0,32	- 0,39
Acidez titulável total do grão	- 0,12	0,45
Espécies de fungos:		
<i>Penicillium</i> sp.	0,65	0,74
Grupo <i>Nigri</i>	- 0,52	- 0,62
<i>Fusarium</i> sp.	0,33	0,52
<i>A. ochraceus</i>	0,07	0,37
<i>A. flavus</i>	0,003	- 0,06
<i>r</i>	0,65	
F aproximado	3,17	
Graus de liberdade (num.; den.)	20; 209,9	
<i>P</i>	< 0,0001*	

* Significativo a $P < 0,05$ pelo teste F.

As análises das correlações das matrizes obtidas na estrutura canônica juntamente com os coeficientes canônicos, indicaram que a condutividade elétrica do produto mostrou-se fortemente associada à infestação por fungos da espécie *Penicillium* nos grãos e em menor intensidade à infestação por espécies do Grupo *Nigri* e de *Fusarium*.

De modo geral, a incidência de fungos no café beneficiado durante o armazenamento foi considerada baixa. Os valores médios de contaminação por *Penicillium* sp., que foram as espécies que mais contribuíram para a significância da primeira correlação canônica, foram no máximo 28%. No caso do *Fusarium* sp e das espécies do Grupo *Nigri* os valores médios observados ficaram entre 1 e 6%.

A classificação das amostras de café coletadas durante o armazenamento incluíram, além do número de defeitos, apresentado anteriormente, outras informações qualitativas, tais como a coloração e o tipo do produto e, ainda, a qualidade da bebida. Não foi observada qualquer alteração na cor do café, que se manteve com a coloração esverdeada durante todo o período estudado. O mesmo ocorreu com a tipificação do café que se manteve como tipo 7. Quanto à qualidade da bebida, foram observadas algumas alterações, normalmente aceitáveis, devido à empiricidade do método utilizado na execução da Prova de xícara (Tabela 4).

Tabela 4. Variação da qualidade de bebida do café cultivado nas Áreas 1, 2 e 3 e submetido à secagem em terreiros de cimento e de chão, durante o armazenamento

Tratamento	Tempo de armazenamento (dias)			
	0	90	135	180
Área 1 terreiro	mole	dura	apenas mole	apenas mole
Área 1 chão	mole	apenas mole	dura	apenas mole
Área 2 terreiro	mole	mole	apenas mole	dura
Área 2 chão	apenas mole	apenas mole	dura	apenas mole
Área 3 terreiro	dura	apenas mole	mole	apenas mole
Área 3 chão	mole	apenas mole	mole	apenas mole

Os resultados obtidos na determinação do índice de OTA do café durante o armazenamento, extraídos dos laudos analíticos emitidos pelo LACQSA/MG, não foram incluídos aos dados utilizados nas análises estatísticas devido à ocorrência esporádica de contaminação a aos baixos índices encontrados, como pode ser observado na Tabela 5. Estes resultados refletiram a baixa incidência de fungos detectada no produto armazenado, principalmente das espécies *A. ochraceus* e do Grupo Nigri, que são consideradas potencialmente produtoras de OTA no café.

Tabela 5. Variação índice de ochratoxina A (OTA) do café cultivado nas Áreas 1, 2 e 3 e submetido à secagem em terreiros de cimento e de chão, durante o armazenamento

Tratamento	Índice de ochratoxina A ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)			
	Tempo de armazenamento (dias)			
	0	90	135	180
Área 1 terreiro	Nd	Nd	Nd	Nd
Área 1chão	Nd	Nd	0.56	0.33
Área 2 terreiro	Nd	Nd	Nd	Nd
Área 2chão	Nd	1.22	Nd	Nd
Área 3 terreiro	0,36	Nd	Nd	Nd
Área 3chão	Nd	Nd	Nd	Nd

Nd = não detectável, pelo método utilizado, cujo limite de detecção é $0,12 \mu\text{g.kg}^{-1}$ (Brasil, 2000)

DISCUSSÃO

A obtenção de informações que permitam conhecer as condições favoráveis à infecção fúngica e contaminação por OTA no café, assim como os seus efeitos na qualidade do produto durante o armazenamento, constitui-se, atualmente um dos principais desafios do setor cafeeiro no Brasil e no mundo. Objetivou-se neste trabalho avaliar os efeitos da contaminação

por fungos e OTA, do café proveniente de três áreas topograficamente distintas e secado em terreiros de cimento e de chão, sobre a qualidade físico-química do produto durante o armazenamento.

As características qualitativas avaliadas, acidez titulável total do grão, condutividade elétrica, incidência de defeitos, acidez do óleo e índice de OTA, embora objeto de inúmeros estudos sobre qualidade do café, suas alterações não têm sido analisadas sob a ótica da contaminação do café por fungos, durante as etapas de pré-processamento, beneficiamento e armazenamento.

A composição distinta do principal eixo canônico no diagrama CVA, mostrando o agrupamento das áreas 1 e 2 distintamente da área 3, reflete o provável efeito das condições de cultivo, sobre a qualidade final do café, sendo que o fato das áreas 1 e 2, serem contíguas e apresentarem características similares quanto à idade e densidade de plantio, contribuiu para este resultado. O tempo de permanência do café nos terreiros de secagem, logo depois da passagem pelo lavador, é considerado um ponto crítico para a contaminação fúngica, devido ao conteúdo de água elevado do fruto, em torno de 60% b.u. no momento da colheita (Frank, 1999; Bucheli *et al.* 2000; Pimenta & Vilella, 2001; Urbano *et al.*, 2001). Neste estudo, mesmo com a utilização de terreiros de cimento e de terreiros de chão, estes últimos considerados precários para a secagem do café (Moraes *et al.*, 2003), o tempo de permanência do produto nestes locais não ultrapassou cinco dias e o processo foi naturalmente beneficiado por condições climáticas altamente favoráveis durante a execução dos experimentos de campo. Provavelmente, estes fatores contribuíram para o agrupamento dentro das áreas, independentemente do tipo de terreiro utilizado na secagem.

Durante o armazenamento, o conteúdo de água do café manteve-se em torno de 12% b.u., que é considerado seguro e apresenta-se como um fator limitante à colonização por fungos de armazenamento. Entretanto, considerando que esses microorganismos encontram-se dispersos no ambiente e que o café constitui-se um substrato viável, nas condições observadas, de baixa atividade de água, os ácidos graxos presentes no grãos provavelmente foram hidrolisados pela enzima lipase produzida pelos fungos (Christensen & Kaufmann, 1974; Lisker & Ben-Efraim, 1985; Pomeranz, 1992; Tipples, 1995; Wicklow, 1995; Dhingra *et al.*, 2001), refletindo assim, na elevada contribuição da acidez do óleo e, de forma antagônica, a do conteúdo de água, na composição do principal eixo canônico. O acúmulo de ácidos graxos livres como indicador de qualidade da soja colonizada por fungos durante o armazenamento, foi estudado por Dhingra *et al.* (2001), os quais observaram que, mesmo quando não houve alteração na porcentagem de sementes infectadas por fungos, o índice de

ácidos graxos livres aumentou significativamente, indicando que estes compostos foram hidrolisados pela lipase produzida pelos fungos.

A estabilidade das membranas celulares do endosperma do café pode ter sido afetada por danos mecânicos ocorridos durante o beneficiamento (Godinho *et al.*, 2000), sendo que este comportamento se refletiu na composição do segundo eixo canônico significativo, com contribuições semelhantes da incidência de defeitos, condutividade elétrica e acidez do grão. Além da predominância dos grãos quebrados entre os defeitos identificados nas amostras, outro aspecto que contribuiu para os altos índices de condutividade elétrica observados no início do armazenamento, em comparação ao final do período, foi o baixo conteúdo de água do café. Mesmo não havendo nenhuma hipótese explicativa, atribui-se este comportamento ao fato de que, nos grãos mais secos, a absorção de água durante o processo de embebição, seria muito rápida, favorecendo dessa forma a desagregação das membranas (Prete, 1992). No decorrer do armazenamento, o conteúdo de água do produto apresentou uma tendência a estabilização em valores superiores àqueles observados inicialmente, enquanto que a condutividade elétrica diminuiu ao longo do período, refletindo também as condições adequadas do local de armazenamento (Amorim, 1978; Arêdes, 2002). A acidez titulável do café armazenado, sugerida como parâmetro na confirmação da qualidade da bebida determinada pelo teste de xícara (Carvalho *et al.*, 1994), não demonstrou, neste estudo, o mesmo comportamento, uma vez que os resultados não refletiram qualquer diferenciação dos tipos de bebida de amostras previamente degustadas (Barbosa *et al.*, 2002) ou dos processos de secagem utilizado.

A utilização da análise de correlações canônicas objetivando verificar as inter-relações entre as características qualitativas do café e a incidência de fungos durante o armazenamento, demonstrou que a condutividade elétrica foi afetada pela presença de *Penicillium* sp. e espécies do Grupo *Nigri*. Devido à ausência de relatos sobre o efeito da contaminação fúngica sobre a condutividade elétrica dos grãos de café e considerando que houve redução nos valores observados durante o armazenamento, pode-se inferir que, apesar da alta correlação, os índices médios de contaminação fúngica do café durante o armazenamento foram baixos (5,49% para *Penicillium* sp., 3,33% para espécies do Grupo *Nigri* e 0,67% para *Fusarium* sp.) e provavelmente não afetaram a estabilidade das membranas celulares.

A incidência de fungos no café beneficiado e armazenado observada neste estudo corrobora pesquisas similares (Silva *et al.*, 2000; Urbano *et al.*, 2001; Batista *et al.*, 2003; Suárez-Quiroz *et al.*, 2004), indicando que a contaminação de OTA pode ser evitada, na pós-colheita, pela adoção de medidas preventivas relacionadas principalmente à secagem, ao conteúdo de água do produto e às condições de armazenamento. O conteúdo de água do café

em grãos, sendo mantido entre 10 e 12% b.u. em condições de umidade relativa entre 50 e 70%, que resulta em atividade de água entre 0,65 e 0,70, propiciam uma armazenagem segura e favorecem a manutenção da qualidade do produto, um vez que tais condições inibem a colonização dos grãos por fungos toxigênicos, em especial o *A. ochraceus* (Frank & Frisvard, 1999; Urbano *et al.*, 2001; Taniwaki *et al.*, 2003; Pardo *et al.*, 2005).

LITERATURA CITADA

American Society of Agricultural Engineers. **ASAE Standards**. ASAE S352.2, 2003, p.593.

Association of Official Analytical Chemists International. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 16th ed., 4th revisão, Gaithersburg, MD, método 939.05, 1998.

Association of Official Analytical Chemists International. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 16th ed., 4th revisão, Gaithersburg, MD, método 920.92, 1998.

Amorim, H. V. **Aspectos bioquímicos e histoquímicos do grão do café verde relacionados com a deterioração de qualidade**. Piracicaba:ESALQ, 1978. 85p. Tese de Livre-docência.

Arêdes, E. M. **Avaliação das perdas de matéria seca e de qualidade do café (*Coffea arabica* L.) beneficiado e armazenado em importantes municípios produtores da Zona da Mata Mineira e em Alegre-ES**. Viçosa: UFV, 2002. 39p. Tese Mestrado.

Barbosa, R. M.; Silva, P. H. A.; Regazzi, A. J. Composição química de seis categorias da bebida café previamente classificada pelo teste de xícara. . **Revista Brasileira de Armazenamento**. Viçosa, Especial Café (4):45-51, 2002.

Batista, L. R.; Chalfoun, S. M.; Prado, G.; Schwan, R. F.; Wheals, A. E. Toxigenic fungi associated with processed (green) coffee beans (*Coffea arabica* L.). **International Journal of Food Microbiology**. 85:293-300, 2003.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Aprova os Métodos Analíticos de Referência para Análise de Micotoxinas em Produtos, Subprodutos e Derivados de Origem Vegetal. Instrução Normativa n. 09 de 24.04.2000, **Diário Oficial da União**. 30.03.00, Seção 1, p. 38-41, Brasília, DF.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Aprova a norma específica das características mínimas de qualidade para a classificação do café beneficiado. Instrução Normativa n. 08 de 11.06.2003, **Diário Oficial da União**. 13.06.2003., Seção 1, p. 4-6, Brasília,DF.

- Bucheli, P.; Meyer, I.; Pittet, A.; Vuataz, G.; Viani, R. Industrial storage of green robusta coffee under tropical conditions and its impact on raw material quality and ochratoxin A content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 46(11):4507-4511, 1998.
- Bucheli, P.; Kanchanomai, C.; Meyer, I.; Pittet, A. Development of ochratoxin A during robusta (*Coffea canephora*) coffee cherry drying. **Journal of Agricultural Food Chemistry**. 48(4): 1358-1362, 2000.
- Bucheli, P., Taniwaki, M.H. Review, Research on the origin, and on the impact of post-harvest handling and manufacturing on the presence of ochratoxin A in coffee. **Food Additives and Contaminants**. 19(7):655-665, 2002.
- Carvalho, V. D.; Chagas, S. J. R.; Chalfoun, S. M.; Botrel, N.; Juste Jr., E. S. G. Relação entre a composição físico-química e química do grão de café beneficiado e a qualidade de bebida do café. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, 29(3):449-454, 1994.
- Christensen, C. M.; Kaufmann, H. H. Microflora. In: Christensen, C. M. (ed). **Storage of Cereal Grains and Their products**. St. Paul, Minnesota: AACC, 1974. cap. 4, p.158-192.
- Coelho, K. F.; Pereira, R. G. F. A.; Vilella, E. R. Qualidade do café beneficiado em função do tempo de armazenamento e de diferentes tipos de embalagens. **Revista Brasileira de Armazenamento**. Viçosa, Especial Café (2):22-27, 2001.
- Dhingra, O. D.; Sinclair, J.B. **Basic Plant Pathology Methods** - Second edition, 434pp, CRC Press, 1996.
- Dhingra, O. D.; Jham, G.; Napoleão, I. T. Ergosterol accumulation and oil quality changes in stored soybean invaded by *Aspergillus ruber* (*A. glaucus* group). **Mycopathologia**. 143:85-91, 2001.
- Duris, D. Coffee and ochratoxin contamination. In: Food Safety Management in Developing Countries, 2000, Montpellier, France. **Proceedings of the International Workshop**. Montpellier, France: Hanak, E.; Boutrif, E.; Fabre, P.; Pineiro, M. (Scientific Editors), 1-5, 2002.
- Frank, J. M. Modeling and HACCP tools for coffee quality improvement In: Workshop: Micotoxinas em Café, 1999, **Anais ...** Belo Horizonte, MG, 7p.
- Frank, J. M.; Frisvad, J. C. Mycological considerations of coffee production consenquential to a HACCP plan for mould prevention. In: Workshop: Micotoxinas em Café, 1999, **Anais ...** Belo Horizonte, MG, 7p.
- Godinho, R. P.; Vilella, E. R.; Oliveira, G. A.; Chagas, S. J. R. Variações na cor e na composição química do café (*Coffea arabica* L.) armazenado em coco e beneficiado. (**Revista Brasileira de Armazenamento**. Viçosa, Especial Café (1):38-43, 2000.

- Goulart, P. F. P.; Alves, J. D.; Malta, M. R.; Magalhães, M. M.; Pereira, R. G. F. A.; Meyer, L. E. Análise comparativa entre lixiviação de potássio, condutividade elétrica, teor de ácido clorogênico e métodos de quantificação da atividade de polifenol oxidase em extratos semipurificados de amostras de café de diferentes padrões de qualidade. **Revista Brasileira de Armazenamento**. Viçosa, Especial Café (7):78-85, 2003.
- International Organization For Standardization. Café verde em sacos - Amostragem. **ISO 4072**, Revisão da primeira edição (ISO 4072:1982), Genebra, 1985. 7p.
- Joosten, H. M. L. J.; Goetz, J.; Pitter, A.; Schellenberg, M.; Bucheli, P. Production of ochratoxin A by *Aspergillus carbonarius* on coffee cherries. **International Journal of Food Microbiology**. 65:39-44, 2001.
- Jørgensen, K. Survey of pork, poultry, coffee, beer and pulses for ochratoxin A. **Food Additives and Contaminants**. 15(5):550-554, 1998.
- Klich, M. A. **Identification of common *Aspergillus* species**. USDA, ARS, Southern Regional Research Center, New Orleans, Louisiana, USA, 116p., 2000.
- Leoni, L. A. B.; Furlani, R. P. Z.; Soares, L. M. V. S.; Oliveira, P. L. C. Ochratoxin in Brazilian green coffee. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. 21(1):105-107, 2001.
- Lisker, N; Ben-Efraim, A.; Henis, Y. Involvement of fungi in the increase of free fatty acids in stored soybeans. **Canadian Journal of Microbiology**. 31:799-803, 1985.
- Mabbett, T. Storing up problems? **Coffee & Cocoa International**, September, 2002.
- Malta, M. R.; Chagas, S. J. R.; Oliveira, W. M. Composição físico-química e qualidade do café submetido a diferentes formas de pré-processamento. **Revista Brasileira de Armazenamento**. Viçosa, Especial Café (6):37-41, 2003.
- Mantle, P. G.; Chow, A. M. Ochratoxin formation in *Aspergillus ochraceus* with particular reference to spoilage of coffee. **International Journal of Food Microbiology**. 56:105-109, 2000.
- Micco, C.; Grossi, M.; Miraglia, M.; Brera, C. A study of the contamination by ochratoxin A of green and roasted coffee beans. **Food Additives and Contaminants**. 6(3):333-339, 1989.
- Mislivec, P. B.; Bruce, V. R.; Gibson, R. Incidence of toxigenic and other molds in green coffee beans. **Journal of Food Protection**. 46(11):969-973, 1983.
- Moraes, M. L. P.; Luchese, R. H. Ochratoxin A on green coffee: influence of harvest and drying processing procedures. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 51:6824-5828, 2003.
- Pardo, E.; Ramos, A. J.; Sanchos, V. Marin, S. Modelling of water activity and temperatura on germination an growth of ochratoxigenic isolates of *Aspergillus ochraceus* on a green coffee-based médium. **International Journal of Food Microbiology**. 98:1-9, 2005.

- Pimenta, C. J.; Vilella, E. R. Qualidade do café (*Coffea arabica* L.), lavado e submetido a diferentes tempos de amontoa no terreiro. **Revista Brasileira de Armazenamento**, Especial Café n. 2, p. 3-10, 2001.
- Pomeranz, Y. Biochemical, functional, and nutritive changes during storage. In: Sauer, D. B. (ed.). **Storage of Cereal Grains and Their Products**, pp 55-141, American Association of Cereal Chemistry, Inc., St. Paul, Minnesota, 1992.
- Prete, C. E. C. **Condutividade elétrica do exsudato de grãos de café (*Coffea arabica* L.) e sua relação com a qualidade de bebida**. Piracicaba: ESALQ, 1992. Tese Doutorado.
- Romani, S.; Sacchetti, G.; López, C. C.; Pinnavaia, G. G.; Rosa, M. D. Screening on the occurrence of ochratoxin A in green coffee beans of different origins and types. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 48(8):3616-3619, 2000.
- SAS Institute. SAS user's guide: Statistics, version 8.2, 6th ed. **SAS Institute**, Cary, NC. Todd and Browde, 2001.
- Silva, C. F.; Schwan, R. F; Dias, E. S.; Wheals, A. E. .Microbial diversity during maturation and natural processing of *Coffea arabica* in Brazil. **International Journal of Food Microbiology**. 60:251-260, 2000.
- Silva, C. F.; Batista, L. R.; Schwan, R. F. Incidência de *Aspergillus* produtores de micotoxinas em frutos e grãos de café (*Coffea Arabica* L.). **Revista Brasileira de Armazenamento**. Viçosa, Especial Café (7):30-36, 2003.
- Sivetz, M. **Coffee Processing Technology**. V.2, Wesport, Connecticut: The Avi Publishing Company, Inc., 1963. 349p.
- Suárez-Quiroz, M.; González-Rios, O.; Barel, M.; Guyot, B.; Schorr-Galindo, S.; Guiraud, J. P. Study of ochratoxin A – producing strains in coffee processing. **International Journal of Food Science and Technology**. 39:501-507, 2004.
- Taniwaki, M.H.; Pitt, J.I.; Teixeira, A.A.; Iamanaka, B.T. The source of ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to processing methods. **International Journal of Food Microbiology**. 82:173-179, 2003.
- Téren, J.; Palágyi, A.; Varga, J. Isolation of ochratoxin producing *Aspergilli* from green coffee beans of different origin. **Cereal Research Communications**. 25(3/1):303-302, 1997.
- Tipples, K. H. Quality and nutritional changes in stored grain. In: Jayas, D. *et al.* (Ed.) **Stored-Grain Ecosystems**, New York: Marcel Dekker, Inc., p.325-351, 1995.
- Tsubouchi, H.; Terada, H.; Yanamoto, K.; Hisada, K.; Sakabe, Y. Ochratoxin A found in commercial roast coffee. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 36(3):540-542, 1988.

- Urbano, G. R.;Taniwaki, M. H.; Leitaó, M. F. De F.; Vicentini, M. C. Occurrence of ochratoxin A – Producing fungi in raw Brazilian coffee. **Journal of Food Protection**. 64(8):1226-1230, 2001.
- Vega, F. E.; Mercadier, G. Insects, coffee and ochratoxin A. **Florida Entomologist**. 81(4):543-544, 1998.
- Vieira, R. D.; Tekrony, D. M.; Egli, D.B.; Rucker, M. Electrical conductivity of soybean seeds after storage in several environments. **Seed Science and Technology**. 29:599-608, 2001.
- Wicklow, D. T. The mycology of stored grain: an ecological perspective. In: Jayas, D. *et al.* (Ed.) **Stored-Grain Ecosystems**, New York: Marcel Dekker, Inc., p.197-249, 1995.

Espectroscopia de infra-vermelho próximo na detecção de defeitos e fungos em grãos de café

RESUMO – A utilização das propriedades óticas no desenvolvimento de métodos de avaliação qualitativa dos materiais biológicos vem se mostrando adequada à inspeção dos produtos agrícolas. A utilização de tecnologias espectrométricas na faixa do infra-vermelho próximo (NIR) tem permitido a diferenciação de grãos sadios e contaminados por fungos e micotoxinas, principalmente para o milho, trigo e amendoim. Dessa forma, avaliou-se neste estudo o potencial de utilização da espectroscopia de NIR na identificação de defeitos e contaminação fúngica em grãos de café. O produto foi colhido por derriça no pano. Depois de submetido à secagem natural e mecânica, foi beneficiado e acondicionado em sacos de jutas. Amostras representativas deste lote foram enviadas ao Grain Marketing and Production Research Center – GMPRC/USDA em Manhattan, KS, EUA e submetidas à análise espectral em um espectrômetro de NIR. Os dados foram coletados na faixa de 500 a 1700 nm, para grãos intactos e danificados e complementarmente para grãos inoculados com *Aspergillus ochraceus* e grãos intactos preparados como controle. As informações foram analisadas por análise discriminante e os resultados obtidos foram considerados satisfatórios. Aproximadamente 95% dos grãos foram corretamente classificados em intactos e danificados. Observou-se uma redução no percentual de acertos para os defeitos classificados em categorias, ficando entre 55 e 60% para os grãos com defeitos gerais, quebrados e brocados e em torno de 75% para os grãos com defeitos graves. Para os grãos de café inoculados, 100% dos grãos intactos (controle) foram classificados corretamente e na identificação da contaminação fúngica os resultados obtidos foram 77 e 75% para grãos severamente e levemente infectados, respectivamente. As curvas obtidas para os dois grupos de amostras analisados mostrou a distinção do comportamento espectral dos grãos sadios e danificados ou inoculados, observados pelos valores médios da absorvância ($\log 1/R$). Conclui-se pela viabilidade do desenvolvimento de discriminadores na faixa de infra-vermelho próximo que permitam a identificação de defeitos e de grãos de café contaminados por fungos.

PALAVRAS-CHAVE: Propriedades óticas café, qualidade, fungos.

Near infrared spectroscopy for fungi and damage detection on coffee beans

ABSTRACT – Sorting systems based on optical properties have shown to be adequate for quality evaluation of agricultural products. Near infrared (NIR) spectroscopy has been used for separation of intact and contaminated kernels by fungi and mycotoxins mainly in corn, wheat and peanuts. This study aimed to evaluate the potential of near-infrared detection for identification of damage and fungi contamination on coffee beans. The product was harvested by cloth, dried on natural (floor) and mechanical system. After that, it was dehulled and packed on jute bags. Representative samples of this lot were sent to Grain Marketing and Production Research Center – GMPRC/USDA in Manhattan, KS, USA, where they were analyzed using a NIR spectrometer. The data were collected from 500 to 1700 nm for intact and damaged beans and for inoculated by *A. ochraceus* and control beans. The data were classified by discriminate analysis and the results could be considered satisfactory. About 95% of the beans were correctly classified as intact and damaged beans. It was observed a reduction in the percentage for damaged beans when they were classified by categories. Only about 55 to 60% of damaged beans were correctly classified as slightly damaged, broken and insect damaged and about 75% on severely damaged. The results obtained for inoculated beans indicate a good accuracy and 100% of control beans were correctly distinguished. For inoculated bean category the results were 77 and 75% for severely and slightly infected beans, respectively. Plots of average spectra indicate differences on spectrum behavior for intact and damaged or inoculated beans which could be observed by the average absorbance values ($\log 1/R$). It was concluded that it may be possible to develop discrimination models on NIR spectra by detection of damaged and molds contamination coffee beans,

KEY WORDS: Coffee optical properties, quality, molds.

INTRODUÇÃO

O *commodity* café, ao movimentar, anualmente, em torno de quatro milhões de toneladas (80 milhões de sacas), envolvendo valores entre 12 a 15 bilhões de dólares, vem enfrentando, atualmente, o grande desafio que é o de ofertar um produto isento de contaminantes, em especial, a ochratoxina A (OTA), conhecida micotoxina de ocorrência natural no café (Duris, 2002; ICO, 2003). Além de representar um perigo potencial à saúde do consumidor, o rechaço de um carregamento de café contaminado por OTA pode significar uma substancial perda econômica.

Os mecanismos de contaminação do café por OTA, apesar de não estarem totalmente esclarecidos (Mantle & Chow, 2000; Duris, 2002), têm sido correlacionados com a incidência de defeitos (Buchelli *et al.*, 1998, 2000). Em grãos de café infectados por fungos, a incidência de *Aspergillus ochraceus* tende a ser maior nos grão brocados (Vega & Mercadier, 1998; Frank, 1999), mas a contaminação por OTA não se encontra diretamente relacionada à incidência dos demais defeitos e nem à classificação do café por peneiras (Romani *et al.*, 2000; Leoni *et al.*, 2001).

Medidas voltadas para o aspecto da segurança alimentar vêm sendo implementadas pelos países produtores e consumidores, preocupados com a melhoria da qualidade do café nos mercados doméstico e internacional.

A utilização de mecanismos oficiais de inspeção no mercado internacional de produtos agrícolas é uma prática amplamente utilizada e caracteriza-se pela adoção de procedimentos que permitam avaliar a qualidade e verificar a conformidade destes produtos com os contratos e regulamentações previamente estabelecidas pelos países importadores e exportadores.

Os métodos referenciais de padronização e classificação dos produtos agrícolas, desde a mais remota época, foram concebidos para facilitar a comercialização destes produtos entre os diversos países. A detecção visual é um dos procedimentos mundialmente utilizados pelos serviços oficiais de inspeção para reconhecer e remover produtos agrícolas contaminados por fungos. Entretanto, a inspeção visual, isoladamente, é insuficiente, pois muitos produtos isentos de sintomas de infecção perceptíveis a olho nu podem apresentar elevados índices de contaminação por micotoxinas. Similarmente, grãos visivelmente infectados por fungos, podem não conter contaminantes. (Hirano *et al.*, 1998; Dowell *et al.*, 1999; Heilmann *et al.*, 1999; Pasikatan & Dowell, 2001).

A contaminação por fungos e OTA é um dos parâmetros de avaliação da qualidade do café considerados importantes e até mesmo obrigatórios para o produto destinado à exportação. Entretanto, os métodos analíticos disponíveis, além do alto custo demandam

tempo, pessoal e equipamentos especializados (Pasikatan & Dowell, 2001; De Saeger *et al.*, 2002; Pettersson & Åberg, 2003).

Os testes rápidos de imunoensaaios para detecção de OTA em café verde, tais como o ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), apesar de comercialmente disponíveis não se mostraram confiáveis, devido à alta faixa de detecção ou à alta taxa de falsos-positivos causada por problemas de interferência (De Saeger *et al.*, 2002; Gilbert & Anklam, 2002; Pitet & Royer, 2002; Truckess, 2003; Vargas *et al.*, 2004).

Independentemente do método analítico, deve-se considerar que os testes químicos disponibilizam informações sobre o montante dos lotes, não permitindo o conhecimento do perfil do produto. Não permitem avaliar se a contaminação deveu-se à ocorrência de poucos grãos severamente infectados ou de vários grãos levemente infectados (Dowell *et al.*, 1999).

Os sistemas de inspeção e de comercialização de café prescindem de métodos de identificação de fungos e OTA que sejam rápidos, reproduzíveis, seguros e não-destrutivos, como forma de aprimorar a avaliação qualitativa do produto e permitir a implementação de limites regulatórios exequíveis (Anklam *et al.*, 2002; Pettersson & Åberg, 2003).

Dentre as tecnologias disponíveis, os métodos óticos, utilizando alta velocidade de detecção e processamentos de informações, vêm sendo considerados os mais bem sucedidos por permitirem avaliações rápidas e acuradas de diferentes produtos (Gunasekaran *et al.*, 1985; Chen & Sun, 1991; Chambers & Ridgway, 1996; Pasikatan & Dowell, 2001; Pettersson & Åberg, 2003). Tais métodos baseiam-se no comportamento da radiação incidente sobre a superfície de um produto vegetal, que devido às diversas estruturas celulares, permite a detecção de diferenças nas quantidades de luz absorvida ou refletida. Além dos constituintes do material irradiado, a absorção varia com o comprimento de onda e a direção de incidência da luz, sendo que a energia absorvida poderá ser transformada em outras formas de radiação como a fluorescência. Assim, as características da radiação que deixa a superfície dependem da radiação incidente e das propriedades óticas do produto irradiado que uma vez identificadas, poderão fornecer informações relacionadas aos fatores qualitativos que se deseja avaliar.

As propriedades óticas podem ser analisadas através do estudo das faixas espectrais, adequando-se um índice de qualidade ao comprimento de onda que mostrar variações sensíveis à característica qualitativa avaliada. Se por um lado as características superficiais dos grãos, como a descoloração causada por fungos, podem ser geralmente detectadas na faixa visível do espectro eletromagnético, outros atributos internos são detectáveis na faixa do infravermelho próximo (Pasikatan & Dowell, 2001).

Neste contexto, a utilização de tecnologias espectrométricas na faixa do infra-

vermelho próximo (NIR) tem permitido a diferenciação entre produtos sadios e contaminados por fungos e micotoxinas, principalmente milho, trigo e amendoim (Hirano *et al.*, 1998; Pearson *et al.*, 2001; Dowell *et al.*, 2002; Pearson *et al.*, 2004). A utilização deste método vem sendo favorecida pela utilização dos sistemas interface computadorizados que permitem a coleta e análise de um grande número de informações, bem como um maior detalhamento dos dados espectrais, garantindo maior precisão dos índices qualitativos estudados. Outra vantagem reside no fato de que os sistemas de seleção de produtos agrícolas que empregam métodos óticos são normalmente rápidos, de fácil automação e permitem a remoção de grãos severamente contaminados por fungos, reduzindo assim a contaminação por micotoxinas (Hirano *et al.*, 1998; Pearson *et al.*, 2001; Pearson *et al.*, 2004).

A utilização das tecnologias espectrométricas envolvendo o café vêm sendo descritas, mas estão voltadas para análise de bebidas, grãos, extratos e pós, visando identificar a composição de misturas (*blends*) das espécies *Coffea arabica* e *C. robusta* (Kemsley *et al.*, 1995; Briandet *et al.*, 1996; Downey, 1996; Downey & Spengler, 1996; Downey & Bouscion, 1996). Entretanto, além das exigências organolépticas relacionadas às preferências de cada mercado, o setor cafeeiro, acompanhando as tendências mundiais, vem definindo prioridades voltadas à sanidade e qualidade do produto oferecido ao consumidor.

Considerando o potencial de uso da espectroscopia de infra-vermelho próximo na avaliação qualitativa dos produtos agrícolas e a importância do café no mercado internacional, avaliou-se neste estudo a viabilidade de uso desta tecnologia na detecção de defeitos e de contaminação fúngica em grãos de café.

MATERIAL E MÉTODOS

Identificação do produto

O produto foi obtido de uma propriedade produtora de café (*Coffea arabica* L.) localizada no município de Teixeiras, MG (20°39'06"S, 42°51'22"W). O café foi colhido por derriça no pano e o produto obtido, depois de passar pelo lavador, foi submetido à secagem ao sol em terreiros localizados na propriedade até que fosse atingido o conteúdo de água de meia-seca, em torno de 35% base úmida (b.u.). A secagem a baixa temperatura, em torno de 40 °C, foi completada em um secador mecânico de camada fixa, instalado na Área de Armazenamento de Grãos do Departamento de Engenharia Agrícola – DEA/UFV, até que o conteúdo de água do produto atingisse 12% b.u.. Concluída a secagem, o produto foi beneficiado mecanicamente e acondicionado em sacos de juta.

Obtenção das amostras

Adotando-se os procedimentos estabelecidos na Norma ISO 4072 (International Organization for Standardization, 1985), o produto foi amostrado durante o ensacamento e as amostras foram enviadas ao Grain Marketing and Production Research Center – GMPRC/USDA, em Manhattan, KS, EUA para execução das análises.

Das amostras recebidas, foram selecionados por análise visual 540 grãos danificados e 540 sadios, que foram acondicionados em recipientes plásticos compartimentados e enumerados (*pill boxes*), de forma a garantir a individualidade dos mesmos durante a realização das análises.

Observando-se os conceitos estabelecidos na norma ISO 10470 (International Organization for Standardization, 1993), os grãos danificados foram classificados em quatro categorias: grãos danificados por insetos, constituída pelos grão brocados; grãos quebrados, representada pelos pedaços de grãos sadios; grãos com defeitos graves, incluindo os defeitos pretos, ardidos e preto-verdes; e os grãos com defeitos gerais, constituída pelos grãos conchas e mal granados.

Inoculação dos grãos com *Aspergillus ochraceus*

Os grãos de café intactos foram individualmente desinfetados com hipoclorito de sódio a 6% por um minuto, enxaguados com água destilada esterilizada, enxugados com papel absorvente para retirada da umidade superficial excessiva, agitados por 30 segundos em um frasco de vidro contendo grãos de milho previamente colonizados com *A. ochraceus* NRRL 35510 e recolocados nas *pill boxes*. Estes recipientes foram mantidos abertos no interior de caixas plásticas contendo cloreto de sódio, de forma a se obter uma condição de umidade relativa do ar de 75% no interior das mesmas. As caixas, devidamente tampadas, foram mantidas a 25 °C por sete dias (Dhingra & Sinclair, 1996). O mesmo procedimento, exceto a inoculação, foi executado para uma amostra de 180 grãos, para fins de controle.

Decorrido o período de incubação, os grãos inoculados foram observados em um microscópio estereoscópico e classificados em duas categorias de acordo com o grau de incidência de *A. ochraceus*: grãos levemente infectados, na qual foram incluídos aqueles cuja incidência de fungos afetou até a metade do grão; e severamente infectados, formada por aqueles grãos colonizados por fungos em mais da metade do endosperma.

Obtenção dos dados espectrais

A refletância na faixa de leitura de 500 a 1700 nm foi obtida em um espectrômetro de infra-vermelho próximo, Modelo DA7000 (Perten Instruments, Springfield, IL), com

resolução espectral de 2 nm. A absorvância foi medida usando-se um dispositivo de silicone (7 nm de resolução) e um detector de índio-gálio-arsenito (InGaAs) com 11 nm de resolução. Foram efetuadas 15 leituras e o espectrômetro armazenou a média, sendo que cada leitura foi coletada em aproximadamente 33 milésimos de segundos para um tempo total de integração de 0,495 segundos.

Os grãos de café foram manualmente colocados com a face plana voltada para baixo, em posição de descanso, no ponto de bifurcação do espectrômetro e da fonte de luz (Figura 1), em uma plataforma com 15 mm de diâmetro, localizada a 12 mm acima das fibras de refletância e de iluminação. O feixe de luz era de 7 mm e o feixe de refletância de 2 mm considerando o diâmetro da plataforma de leitura. O equipamento apresentava um dispositivo de interface com o computador e as informações espectrais obtidas foram automaticamente armazenadas para análises posteriores (Figura 2).

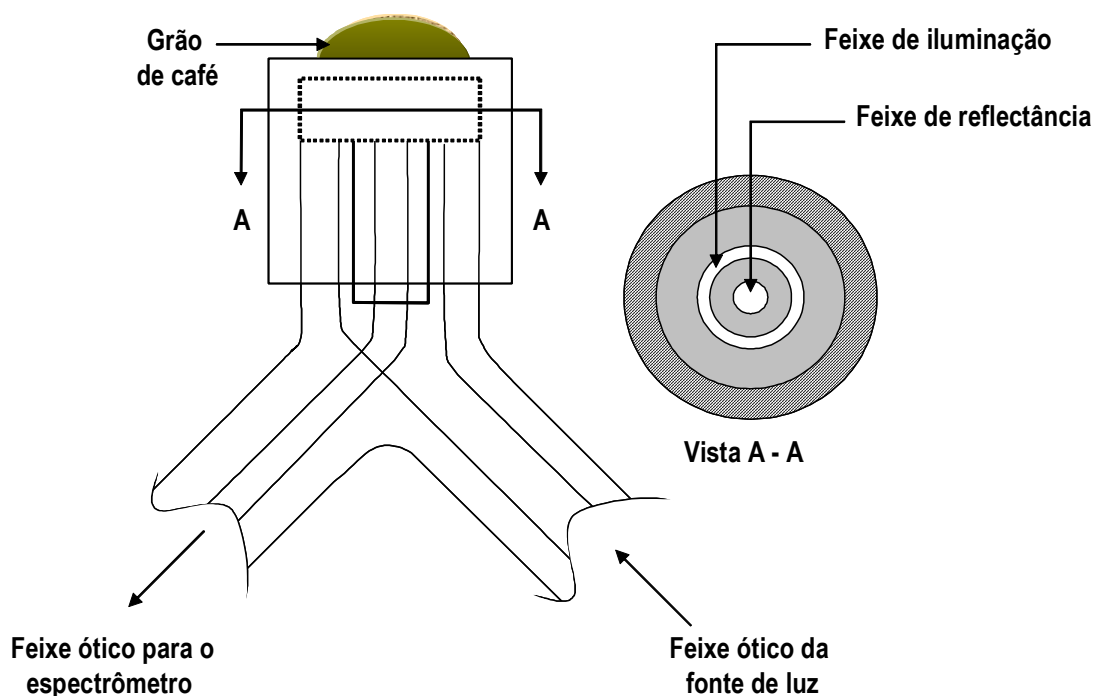


Figura 1. Esquema de funcionamento do espectrômetro

Os dados espectrais foram inicialmente obtidos para todos os grãos, danificados e intactos. Posteriormente, os grãos intactos depois de inoculados com *A. ochraceus* e aqueles preparados como controle foram novamente submetidos à análise espectral.



Figura 2. Espectrômetro de infra-vermelho próximo utilizado na obtenção dos dados espectrais

Análise dos dados espectrais

As informações obtidas na faixa de resolução de 500 a 1700 nm foram interpoladas a cada 5 nm, utilizando um software comercial (Grams 32, Galactic Industries Corporation, Salem, NH), resultando em 241 valores de absorvância.

Para obtenção do melhor par de comprimento de onda, as variáveis foram selecionadas utilizando-se a análise discriminante de seleção por etapas (*stepwise*), com o máximo de 20 interações.

Preliminarmente, as bandas espectrais foram testadas individualmente e em combinação duas a duas, para escolha daquelas que permitiram classificar o grão de café como danificado ou intacto quanto à incidência de defeitos. Posteriormente, com a adequação do modelo preliminar, os grãos foram classificados em intactos e danificados de acordo com as categorias dos defeitos previamente estipuladas.

O mesmo procedimento foi adotado para a análise dos dados espectrais dos grãos inoculados. Inicialmente o modelo foi testado para classificar os grãos inoculados e os grãos sadios (controle) e posteriormente, para separação dos grãos sadios dos grãos infectados dentro das categorias levemente e severamente infectados.

A análise estatística foi executada utilizando-se os procedimentos PROC DISCRIM e STEPDISC do pacote estatístico SAS (SAS Institute, 2001).

RESULTADOS

Os resultados obtidos na classificação por análise discriminante das informações espectrais dos grãos de café intactos e danificados, identificados previamente por exame

visual, estão mostrados na Tabela 1. Os valores para falso-positivo e falso-negativo inferiores a 10% podem ser considerados baixos, mas não são satisfatórios se comparados às exigências de normas internacionais para validação de testes de imunoensaio, cujo valor aceitável é de no máximo 5% de falso-negativo.

Tabela 1. Resultado da classificação para os grãos de café separados em intactos e danificados, considerando os cumprimentos de onda selecionados por análise discriminante

Par de comprimento de onda selecionado (nm)	Falso-positivo ^(a) (%)	Falso-Negativo ^(b) (%)
795 – 1380	5,6	6,9

^(a) Falso-positivo é o grão intacto que foi classificado como danificado
^(b) Falso-negativo é o grão danificado que foi classificado como intacto

Os valores médios da reflectância, representados pela absorvância ($\log 1/R$), dos grãos intactos e danificados estão graficamente demonstrados na Figura 3. As diferenças qualitativas entre as amostras de café apresentaram curvas distintas, indicando que a absorvância para os grãos intactos foi ligeiramente menor do que para os grãos com defeitos.

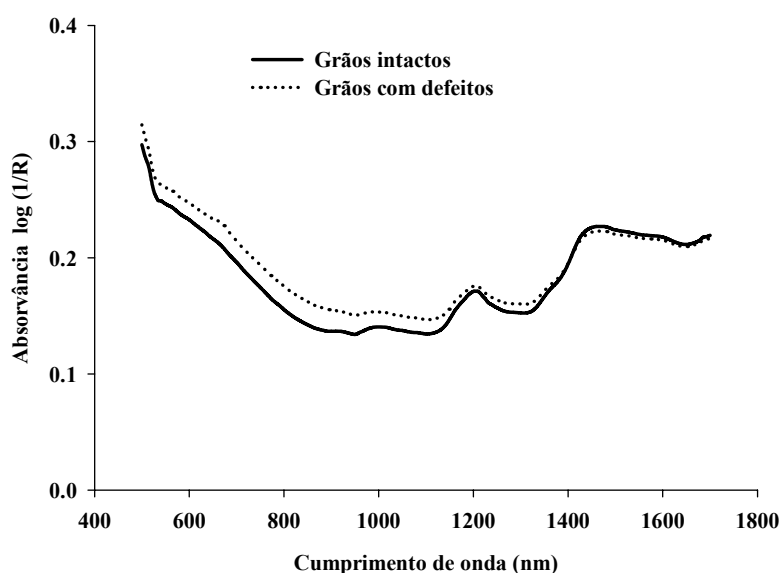


Figura 3. Curvas espectrais dos grãos de café intactos e com defeitos

Os resultados da análise discriminante dos dados espectrais considerando a separação dos grãos danificados em categorias conforme a gravidade dos defeitos constam da Tabela 2.

Observa-se, pelos percentuais de enquadramento dos grãos na categorias de defeitos, que a obtenção de classificadores eficientes é dificultada principalmente na diferenciação dos grãos com defeitos gerais, danificados por insetos ou quebrados. Entretanto, para os grãos com defeitos graves o índice de acerto, próximo a 80%, é considerado satisfatório.

Tabela 2. Resultado da classificação por análise discriminante para os grãos de café intactos e danificados, separados por categorias de defeitos

Números de grãos separados por observação visual		Número de observações e porcentagem classificada				
		Categorias				
		Danificados				
		Intactos	Danificados por insetos	Quebrados	Defeitos gerais	Defeitos graves
Intactos	540	510	4	23	3	0
		94,44	0,74	4,26	0,56	0,00
Danificados por insetos	27	1	15	7	1	3
		3,70	55,56	25,93	3,70	11,11
Quebrados	281	27	9	171	65	9
		9,61	3,20	60,85	23,13	3,20
Defeitos gerais	60	7	4	10	33	6
		11,67	6,67	16,67	55,00	10,00
Defeitos graves	172	2	4	8	25	133
		1,16	2,33	4,65	14,53	77,33
Total geral	1080	547	36	219	127	151

Os dados espectrais obtidos para os grãos de café inoculados com *A. ochraceus* e os grãos utilizados como controle foram classificados por análise discriminante e os resultados são apresentados na Tabela 3. Observa-se que não houve ocorrência de falso-positivo ou falso negativo, indicando uma discriminação altamente satisfatória entre os grãos sadios e aqueles colonizados por fungos. Este resultado pode favorecer a adoção de técnicas do tipo “aceita” ou “rejeita”, muito comuns em sistemas de seleção automáticos. Na distinção do grau de infestação fúngica dos grãos inoculados os resultados apontaram dificuldades de enquadramento dos grãos nas categorias previamente estabelecidas.

Tabela 3. Resultado da classificação para os grãos de café controle (intactos) e inoculados (separados em categorias), para os comprimentos de onda 595 e 1410 nm, selecionados por análise discriminante

Números de grãos previamente classificados	Número de observações e porcentagem classificada		
	Categorias		
	Controle	Inoculados	
		Severamente infectado	Levemente infectado
Controle	180	0	0
	100,0	0,0	0,0
Levemente infectado	416	323	93
		77,64	22,36
Severamente infectado	124	31	93
		7,45	75,00

As respostas espectrais na faixa do infra-vermelho próximo dos grãos inoculados e dos intactos estão mostradas na Figura 4. A distinção entre as curvas mostrou-se mais acentuada do que na diferenciação entre grãos intactos e com defeitos mostrados na Figura 3. Entretanto, ao contrário do comportamento observado naquelas amostras, os valores de absorvância para os grãos intactos foram maiores do que para os grãos inoculados.

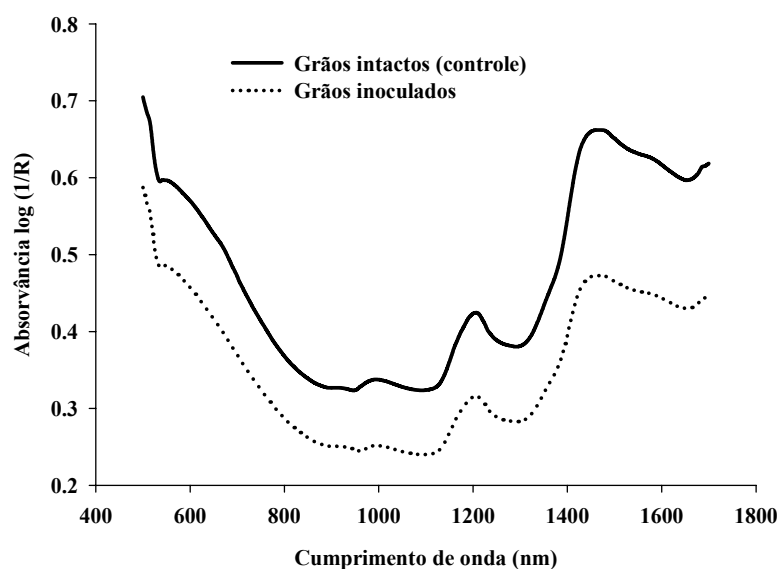


Figura 4. Curvas espectrais dos grãos de café inoculados por *A. ochraceus* e intactos (controle)

Comparativamente, a absorvância mostrada na Figura 4 para os grãos inoculados e intactos foram bem maiores do que para os grãos intactos e danificados apresentada na Figura

3. Este comportamento ocorreu devido à diferença do conteúdo de água observado entre as amostras que, certamente, afeta a assinatura espectral dos produtos agrícolas. De um modo geral, a absorvância tende a ser maior para os produtos mais úmidos (Massie & Norris, 1965).

DISCUSSÃO

A informação obtida pelos dados espectrais permite analisar ou quantificar substâncias com propriedades óticas conhecidas, mediante o estudo do comportamento da absorvância em determinados comprimentos de onda (Birth & Zachariah, 1973; Gunasekaran *et al.*, 1985).

Para os produtos agrícolas, o conhecimento destas informações tem permitido o estabelecimento de critérios de aceitação e rejeição que, adaptados aos sistemas automáticos de inspeção e classificação, resultam na remoção de grãos contaminados e na redução dos níveis de micotoxinas dos lotes estudados (Hirano *et al.*, 1998; Pearson *et al.*, 2001; Pearson *et al.*, 2004).

A relevância dos resultados obtidos na utilização destes métodos vem suscitando o interesse das agências oficiais de inspeção e de organizações internacionais de regulamentação de alimentos, os quais já consideram a possibilidade de reconhecimento das análises por espectroscopia de infra-vermelho próximo no âmbito das legislações adotadas pelos mercados comuns, mas mantêm a devida cautela quanto à necessidade de padronização das metodologias e calibração dos equipamentos (Scotter, 1995; Pierce *et al.*, 1996).

Para o *commodity* café, no qual a garantia de qualidade é uma exigência constante e cuja cotação do produto acompanha as variações do mercado internacional, a perspectiva de utilização de instrumentos baseados nas propriedades óticas dos grãos constitui-se uma alternativa viável. Entretanto, a maioria dos modelos e equipamentos que utilizam as propriedades espectrais para detecção de fungos e micotoxinas foram desenvolvidos e estão sendo exaustivamente testados para cereais e castanhas.

Considerando, dentre outras características, a composição química, o formato e a coloração do café, observa-se que a exemplo dos estudos realizados para os outros produtos, pesquisas similares podem ser implementadas objetivando a aquisição de dados para o desenvolvimento de tecnologias que atendam o setor cafeeiro.

O desenvolvimento de discriminadores para diferenciação de grãos intactos e danificados pode ser uma alternativa viável para o café. A análise das curvas espectrais na faixa do infra-vermelho próximo, entre 500 e 1700 nm, indicou diferenças de reflectância, principalmente próximo a 800 nm, corroborando em parte os resultados obtidos por Johnson

(1962) citado por Gunasekaran *et al.* (1985), para a classificação de diferentes tipos de defeitos do milho.

Exceto para os defeitos graves, que no café são caracterizados por alterações significativas de coloração resultando em grãos pretos, verdes e preto-verdes, os defeitos gerais tendem a apresentar um comportamento espectral semelhante dentro desta categoria e entre as categorias, principalmente quando comparados aos grãos quebrados e brocados. Para estes defeitos as alterações, apesar de visíveis, normalmente não afetam a coloração do café. Mesmo assim, deve-se considerar a possibilidade de uso desta tecnologia na separação de grãos com defeitos graves, objetivando reduzir os níveis de contaminação por micotoxinas, já que estes defeitos podem estar associados a processos de deterioração fúngica (Hirano *et al.*, 1998).

Para grãos de café inoculados com *A. ochraceus* não foi possível comparar os dados espectrais com a contaminação por OTA, devido à indisponibilidade de um método analítico que compatibilizasse a precisão do resultado com a pequena quantidade de amostra disponível para a análise. No presente estudo, os grãos de café infectados apresentaram valores menores de absorvância do que os grãos sadios, provavelmente devido à descoloração e às alterações causadas pelo fungo no endosperma, que se torna mais poroso e tende a absorver menos radiação (Lillehoj *et al.*, 1976).

Inúmeras outras alterações na coloração e na estrutura bioquímica do café causadas por fungos e OTA podem ser correlacionadas ao comportamento espectral do grão, indicando a viabilidade de desenvolvimento de discriminadores na faixa do infra-vermelho próximo que permitam a detecção de contaminações neste produto.

LITERATURA CITADA

- Anklam, E.; Stroka, J.; Boenke, A. Acceptance of analytical methods for implementation of EU legislation with focus on mycotoxins. **Food Control**. 13:173-183, 2002.
- Birth, G. S.; Zachariah, G. L. Spectrophotometry of agricultural products. **Transactions of the American Society of Agricultural Engineers** 16(3):548-552, 1973.
- Briandet, R.; Kemsley, E. K.; Wilson, R. H. Discrimination of Arabica and Robusta in instant coffee by Fourier transform infrared spectroscopy and chemometrics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 44(1):170-174, 1996.
- Bucheli, P.; Meyer, I.; Pittet, A.; Vuataz, G.; Viani, R. Industrial storage of green robusta coffee under tropical conditions and its impact on raw material quality and ochratoxin A content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 46(11):4507-4511, 1998.

- Bucheli, P.; Kanchanomai, C.; Meyer, I.; Pittet, A. Development of ochratoxin A during robusta (*Coffea canephora*) coffee cherry drying. **Journal of Agricultural Food Chemistry**. 48(4): 1358-1362, 2000.
- Chambers, J.; Ridgway, C. Rapid detection of contaminants in cereal. In: **Near Infrared Spectroscopy: The Future Waves**, 484-489. A. M. C. Davies and P. C. Williams, eds Chichester, U.K.: NIR Publications, 1996.
- Chen, P.; Sun, Z. A review of non-destructive methods for quality evaluation and sorting of agricultural products. **Journal of Agricultural Engineering Research**. 49(2): 85-89, 1991.
- De Saeger, S.; Sibanda, L.; Desmet, A.; Peterghem, C. V. A collaborative study to validate novel field immunoassay kits for rapid mycotoxin detection. **International Journal of Food Microbiology**. 75:135-142, 2002.
- Dhingra, O. D.; Sinclair, J.B. **Basic Plant Pathology Methods** - Second edition, 434pp, CRC Press, 1996.
- Dowell, F. E.; Ram, M. S.; Seitz, L. M. Predicting scab, vomitoxin, and ergosterol in single wheat kernels using near-infrared spectroscopy. **Cereal Chemistry**, 76(4):573-576, 1999.
- Downey, G. Authentication of coffee bean variety by near-infrared reflectance spectroscopy of dried extract. **Journal of Science and Food Agricultural**. 71:41-49, 1996.
- Downey, G.; Spengler, B. Compositional analysis of coffee blends by near infrared spectroscopy. **Irish Journal of Agricultural and Food Research**. 35:179-188, 1996.
- Downey, G.; Boussion, J. Coffee authentication by near infrared spectroscopy. In: **Near Infrared Spectroscopy: The Future Waves**, 410-415. A. M. C. Davies and P. C. Williams, eds Chichester, U.K.: NIR Publications, 1996b.
- Duris, D. Coffee and ochratoxin contamination. In: Food Safety Management in Developing Countries, 2000, Montpellier, France. **Proceedings of the International Workshop**. Montpellier, France: Hanak, E.; Boutrif, E.; Fabre, P.; Pineiro, M. (Scientific Editors), 2002.1-5.
- Frank, J.M.; Frisvad, J.C. Mycological considerations of coffee production consenquential to a HACCP plan for mould prevention. In Workshop: Micotoxinas em Café, 1999, **Anais ...** Belo Horizonte, MG, 7p.
- Gilbert, J.; Anklam, E. Validation of analytical methods for determining mycotoxins in foodstuffs. **Trends in Analytical Chemistry**. 21(6/7):468-486, 2002.
- Gunasekaran, S.; Paulsen, M. R.; Shove, G. C. Optical methods for nondestructive quality evaluation of agricultural and biological materials. **Journal of Agricultural Engineering Research**. 32:209-241, 1985.
- Heilmann, W.; Rehfeldt, A. G.; Rotzoll, F. Behavior and reduction of ochratoxin A in green coffee beans in response to various processing methods. **European Food Research and Technology**.209:297-300, 1999.

- Hirano, S.; Okawara, N.; Narazaki, S. Near infra red detection of internally moldy nuts. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**. 62(1):102-107, 1998.
- International Coffee Organization. **ICO Annual Review 2002/2003**. Available on <<http://www.ico.org/frameset/icoset.htm>>. Access in 06.16.2004.
- International Organization For Standardization. Café verde em sacos - Amostragem. **ISO 4072**, Revisão da primeira edição (ISO 4072:1982), Genebra, 1985. 7p.
- International Organization For Standardization. Green coffee – Defect reference chart. **ISO 10470**, First edition, Geneva, Switzerland, 1993.
- Kemsley, E. K.; Ruault, S.; Wilson, R. H. Discrimination between *Coffea arabica* and *Coffea canephora* variant *robusta* beans using infrared spectroscopy. **Food Chemistry**. 54:321-326, 1995.
- Leoni, L. A. B.; Furlani, R. P. Z.; Soares, L. M. V. S.; Oliveira, P. L. C. Ochratoxin in Brazilian green coffee. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. 21(1):105-107, 2001.
- Mantle, P. G.; Chow, A. M. Ochratoxin formation in *Aspergillus ochraceus* with particular reference to spoilage of coffee. **International Journal of Food Microbiology**. 56:105-109, 2000.
- Massie, D. R.; Norris, K. H. Spectral reflectance and transmittance properties of grain in the visible and near infrared. **Transactions of the American Society of Agricultural Engineers**. 8(4):598-600, 1965.
- Pasikatan, M. C.; Dowell, F. E. Sorting systems based on optical methods for detecting and removing seeds infested internally by insects or fungi: A review. **Applied Spectroscopy Reviews**. 36(4): 399-416, 2001.
- Pearson, T. C.; Wicklow, D. T.; Maghirang, E. B.; Xie, F.; Dowell, F. E. Detecting aflatoxin in single corn kernels by transmittance and reflectance spectroscopy. **Transactions of the American Society of Agricultural Engineers**. 44(5):1247-1254, 2001.
- Pearson, T. C.; Wicklow, D. T.; Pasikatan, M. C. Reduction of aflatoxin and fumonisin contamination in yellow corn by high-speed dual-wavelength sorting. **Cereal Chemistry**. 81(4):490-498, 2004.
- Petterson, H.; Åberg, L. Near infrared spectroscopy for determination of mycotoxin in cereals. **Food Control**. 14:299-232, 2003.
- Pierce, R. O.; Funk, D. B.; Brenner, C. A. Applying near infrared spectroscopy to the needs of US grain inspection. In: **Near Infrared Spectroscopy: The Future Waves**, 451-456. A. M. C. Davies and P. C. Williams, eds Chichester, U.K.: NIR Publications, 1996.
- Pittet, A.; Royer, D. Rapid, low cost thin-layer chromatographic screening method for the detection of ochratoxin A in green coffee at a control level of 10 µg/kg. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 50(2):243-247, 2002.

- Romani, S.; Sacchetti, G.; López, C. C.; Pinnavaia, G. G.; Rosa, M. D. Screening on the occurrence of ochratoxin A in green coffee beans of different origins and types. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 48(8):3616-3619, 2000.
- SAS Institute. SAS user's guide: Statistics, version 8.2, 6th ed. **SAS Institute**, Cary, NC. Todd and Browde, 2001.
- Scotter, C. N. G.. The potential for the use of near infrared analysis of food materials in the regulatory context of the European Union. In: **Near Infrared Spectroscopy: The Future Waves**, 406-409. A. M. C. Davies and P. C. Williams, eds Chichester, U.K.: NIR Publications, 1996.
- Truckess, M. W. Committee on natural toxins and food allergens. **Journal of Association of Official Analytical Chemists International**. 86(1):129-138, 2003.
- Vargas, E. A.; Santos, E. A.; Pitet, A. Determination of Ochratoxin A in Green Coffee by Immunoaffinity Column Clean-up and Liquid Chromatography: Collaborative Study. **Journal of Association of Official Analytical Chemists International**. (in press), 2004.
- Vega, F.; Mercadier, G. Insects, coffee and ochratoxin A. **Florida Entomologist**. 81(4):543-544, 1998.

CONCLUSÕES GERAIS

No estudo de avaliação da incidência de fungos e ocratoxina A e de seus efeitos sobre a qualidade do café, da pré-colheita ao armazenamento, considerando as condições experimentais descritas, os resultados apresentados e discutidos, conclui-se que durante as etapas de produção e preparo estudadas, a incidência dos fungos *Aspergillus flavus* e espécies do *Grupo Nigri* no café tende a aumentar, enquanto que a incidência de *A. ochraceus*, *Penicillium* sp. e *Fusarium* sp. tende a diminuir, à medida que o conteúdo de água do café vai sendo reduzida da colheita ao beneficiamento, refletindo as condições de umidade requeridas para o desenvolvimento de cada uma das espécies de fungos observadas.

O café não se mostrou um substrato favorável à colonização de fungos toxigênicos, demonstrado pelos baixos índices de incidência observados neste estudo, o qual indicou que a incidência de fungos produtores de OTA no café não resulta obrigatoriamente na produção desta micotoxina.

As informações obtidas no presente trabalho poderão subsidiar a implementação na cadeia agroprodutiva do café de programas de qualidade voltados para obtenção de produtos isentos de OTA, mediante a recomendação do uso da derriça sobre o pano durante a colheita, a separação do café bóia nos lavadores e a redução rápida do conteúdo de água do café durante a secagem, uma vez que tais práticas demonstraram ser eficazes na prevenção da contaminação do café por fungos e micotoxinas. Quanto ao terreiro utilizado na secagem, embora os resultados tenham indicado que não houve efeito do tipo de piso sobre as características físico-químicas do café utilizadas para avaliação qualitativa do produto, a utilização do piso de chão batido pode representar um fator de risco, além de não ser recomendável a sua utilização dentro dos programas de certificação e controle de qualidade dos produtos agrícolas.

O baixo índice de incidência de fungos observados no produto armazenado não favoreceu o aumento da condutividade elétrica do grão, cujos índices variaram de forma inversa ao conteúdo de água do produto e foram afetados pelos impactos mecânicos aos quais os grãos foram submetidos durante o beneficiamento.

Quanto às outras características avaliadas, observou-se que a acidez do óleo do café tende a aumentar à medida que o conteúdo de água do produto diminui e a variação da acidez titulável total do café não tem efeito sobre a qualidade da bebida durante o armazenamento.

Para a avaliação qualitativa do café quanto à incidência de defeitos e de grãos infectados por fungos o desenvolvimento de discriminadores na faixa do infra-vermelho próximo constitui-se uma alternativa viável.