

FUNGOS MICOTOXIGÊNICOS E OCRATOXINA A EM CAFÉS COM PERMANÊNCIA PROLONGADA NA PLANTA E NO SOLO, COLHIDOS NAS REGIÕES DO CERRADO MINEIRO E BAIANO¹

Rodrigo da Silveira Campos², Otniel Freitas-Silva², Flávio Quitério da Cunha³,
Maria de Lourdes Mendes de Souza⁴, Sidinéa Cordeiro de Freitas⁵

(Recebido: 18 de julho de 2008; aceito: 21 de novembro de 2008)

RESUMO: No Brasil, as regiões do Cerrado Mineiro e Baiano são destaque pela produtividade e qualidade dos grãos produzidos. A florada desuniforme do café no Brasil implica em frutos com diversos estágios de amadurecimento no período da colheita. Assim, frutos não colhidos oportunamente permanecem na planta ou caem no solo, e quando aproveitados farão parte de uma safra de baixa qualidade. Portanto, foi objetivo deste trabalho estudar frutos de café com exposição prolongada na planta e no solo, avaliando a colonização por fungos micotoxigênicos, a produção de ocratoxina A (OTA) e a dinâmica de umidade e atividade de água nos frutos nessas regiões produtoras. O café com permanência prolongada na planta não apresentou grandes variações nos teores de umidade e atividade de água durante os 120 dias estudados. Entretanto, o café com permanência prolongada no solo, apresentou, após 90 dias, variação drástica nos teores de umidade e atividade de água entre as regiões estudadas. Nesse período, a umidade e atividade de água foram de 14,15% e 0,74, 6,64% e 0,63 para o Cerrado Mineiro e Baiano, respectivamente. Apesar do café com permanência prolongada na planta ter sido intensamente colonizado por *Aspergillus ochraceus* G. Wilh. (1877), não foi detectada a presença de OTA. No café com permanência prolongada no solo detectaram-se níveis muito elevados, 49,42 e 30,93 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ de OTA, no Cerrado Mineiro e Baiano, respectivamente. Pode-se constatar que independente da região de interesse, cafés com permanência prolongada na planta ou no solo interferem decisivamente na qualidade do café colhido.

Palavras-chave: *Coffea arabica*, micotoxina, cromatografia líquida de alta eficiência, atividade de água, umidade.

MICOTOXIGENIC FUNGI AND OCHRATOXIN A IN COFFEE FRUITS WITH PROLONGED STAY ON THE TREE AND ON THE SOIL IN THE BRAZILIAN CERRADO

ABSTRACT: In Brazil, the regions called 'Cerrado' in Minas Gerais and Bahia states are expressive coffee producers and stand out for productivity and quality of grain produced. The bloom unevenness of coffee in Brazil leads to fruit with various stages of maturity at the harvest period. As a result, some producers use low quality grains with long soil or plant contact and mix them with those of quality to compose the harvest. The objective of this work was to study coffee fruits with soil contact of up to 90 days evaluating ochratoxin A (OTA) levels, humidity dynamics and water activity in coffee fruits harvested every 30 days. The coffee with prolonged stay on the plant, showed no major variations in humidity and water activity levels during the 120 days studied. However, in coffee with prolonged stay on the soil, after 90 days, the humidity and water activity levels varied dramatically according each region. During this period, the humidity and water activity were 14.15 and 0.74%, 6.64% and 0.63 for the Cerrado Mineiro and Baiano, respectively. Despite the coffee with prolonged stay in the plant having been heavily colonized by *Aspergillus ochraceus* G. Wilh. (1877), OTA contamination was not detected, but in coffees with prolonged stay on the soil, high levels of OTA were observed, 49.42 and 30.93 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, for the Cerrado Mineiro and Baiano, respectively. There was OTA production even in the grains with low water activity, indicating how the complexity of the system in the field interferes with the micotoxigenic dynamic fungi growth and consequently in OTA production.

Key words: *Coffea arabica*, mycotoxin, high performance liquid chromatography, water activity, moisture content.

¹ Trabalho Financiado pelo Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do café – CBP&D Café.

² Engenheiros Agrônomos, M.Sc. Embrapa Agroindústria de Alimentos. Av. das Américas, 29501 – 23020-470 Rio de Janeiro, RJ – camposrs@ctaa.embrapa.br, ofreitas@ctaa.embrapa.br

³ Químico, D.Sc. Embrapa Agroindústria de Alimentos – Av. das Américas, 29501 – 23020-470 Rio de Janeiro, RJ – flavio@ctaa.embrapa.br

⁴ Farmacêutico, D.Sc. Embrapa Agroindústria de Alimentos – Av. das Américas, 29501 – 23020-470 Rio de Janeiro, RJ – mlourdes@ctaa.embrapa.br

⁵ Químico, D.Sc. Embrapa Agroindústria de Alimentos – Av. das Américas, 29501 – 23020-470 Rio de Janeiro, RJ – sidi@ctaa.embrapa.br

1 INTRODUÇÃO

Conhecida por ser uma bebida de sabor e aroma rebuscado (MOREIRA & TRUGO, 2000), o café (*Coffea arabica* L.) vem sendo o enfoque de programas de melhoria de qualidade (PALACIOS-CABRERA et al., 2004). Nesse sentido, esforços estão sendo lançados com o objetivo de difundir a necessidade de cuidados durante o plantio, colheita e processamento.

Toda essa preocupação com a sua qualidade deve-se às divisas geradas por essa *comoditie* que, por exemplo, foi responsável por uma receita em 2007 de aproximadamente US\$ 3,4 bilhões através da exportação de seus grãos (ABIC, 2008a). Não menos importante está o mercado interno brasileiro, o segundo maior consumidor mundial, que foi responsável nesse mesmo ano pelo consumo de 17 milhões de sacas (ABIC, 2008b).

Alguns estados brasileiros são os grandes responsáveis pela expressiva participação do Brasil no mercado mundial de café, destacando-se Minas Gerais como o seu principal produtor (IBGE, 2008). Dentro deste contexto, a Bahia tem se destacado pelo seu avanço produtivo, dividindo hoje espaço com produtores tracionais, como São Paulo e Espírito Santo (IBGE, 2008). Na região de cerrado desses estados, os fatores de clima e relevo envolvidos permitiram a introdução de sistemas tecnificados, enfatizados na cafeicultura moderna e de qualidade, tornando-se verdadeiras fronteiras de produção (ORMOND et al., 1999).

Um dos grandes problemas para a qualidade do café é a sua contaminação por micotoxinas. Nesse sentido, vários autores destacam a sua colonização por fungos micotoxigênicos (BATISTA & CHALFOUN, 2007; BATISTA et al., 2003; SILVA et al., 2003), principalmente os produtores de ocratoxina A (OTA).

A OTA (ROMANI et al., 2000), uma micotoxina nefrotóxica e nefrocarcinogênica, é relatada como sendo a micotoxina mais frequentemente encontrada em café (EFSA, 2006; PITTET et al., 1996; POHLAND et al., 1992; ROMANI et al., 2003). A OTA é produzida por três diferentes taxons, *Penicillium* spp., *Aspergillus ochraceus* G. Wilh. (1877) e espécies correlatas [*A. westerdijkiae* Frisval & Samson (2004) e *A. stenyii* Frisval & Samson (2004)]. Esses *Aspergillus*

pertencem à Secção *Circumdatti*; são mais evidentes em café e produzem conídios amarronzados a dourados. Os *Aspergillus* da Seção *Nigri*, que apresentam conídios pretos representados por *Aspergillus carbonarius* (Bainier) Thom (1916), e ainda com um menor número de isolados OTA positivos, *Aspergillus niger* Tiegh (1867) (FRISVAD et al., 2006; TANIWAKI, 2006; TANIWAKI et al., 2003; VENÂNCIO & PATERSON, 2007).

Diversos são os fatores responsáveis pela produção de ocratoxina A em grãos de café, podendo ser citadas as condições ambientais como umidade e temperatura, tanto quanto os fatores intrínsecos, como a atividade de água (ESTEBAN et al., 2006; PARDO et al., 2004 a, b). O potencial de produção de OTA dependerá não apenas dessas condições isoladas, como também da interação de todos esses fatores associados a uma contaminação externa (MORAES & LUCHESE, 2003).

As condições de colheita podem interferir decisivamente na contaminação dos grãos de café com fungos micotoxigênicos (BEUX & SOCCOL, 2004; MORAES & LUCHESE, 2003). No decorrer da safra, frutos cerejas, brocados e secos, não colhidos oportunamente destacam-se da planta e se acumulam sob suas copas. Esses frutos podem permanecer por um período prolongado no solo, compondo muitas vezes parte da produção ao final da colheita (café de varrição) (BARTHOLO, 1988). Existem indicações de que esses frutos sejam fonte potencial de contaminação por ocratoxina A, contribuindo negativamente para a qualidade dos grãos produzidos e comercializados (ROMANI et al., 2000).

Desse modo, as diferentes condições edafoclimáticas dessas regiões podem interferir na cinética de umidade dos grãos de café, ocasionando alterações na atividade de água, permitindo o desenvolvimento de fungos micotoxigênicos. Esses, por sua vez, sob condições favoráveis, podem iniciar a produção de ocratoxina A.

Estratégias eficientes de controle da presença de OTA em café devem ser adotadas, por representarem entraves na comercialização desse produto e também por colocarem em risco a saúde dos consumidores. Nesse sentido, os mercados importadores estão cada vez mais exigentes, reduzindo os níveis de tolerância de OTA (COMUNIDADE EUROPÉIA, 2005; FURLANI & SOARES, 1999).

Atualmente os países membros da Comunidade Européia toleram níveis de contaminação por ocratoxina A em café cru que variam entre 5 e 20 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (FAO, 2008). Os níveis de tolerância variam conforme o país importador. A Itália, por exemplo, é o mais exigente, adotando o limite mínimo. Esses valores obrigam os países exportadores a adotarem medidas, cada vez mais eficazes, de controle de qualidade de seus produtos, garantindo desse modo a sua presença no competitivo mercado internacional.

Embora, não haja no Brasil legislação específica para a OTA, o país exporta a maior parte da produção de café, principalmente para os mercados asiático, europeu e americano, devendo-se obedecer às legislações específicas de cada um.

A pedido da Comissão Européia, a Autoridade Européia de Segurança dos Alimentos (EFSA) à luz de estudos e dados toxicológicos recentes, concluiu que OTA é uma potente toxina renal em animais, sendo os suínos os mais sensíveis, seguido por aves e bovinos (EFSA, 2004).

Não há dados definitivos para a exposição de humanos à OTA. Entretanto, a EFSA, através de estudos recentes, relatou que cada europeu adulto está exposto, em média, a níveis entre 5 e 60 ng.Kg^{-1} de massa corpórea (EFSA, 2006). Essa mesma autoridade indica ainda que o valor máximo de ingestão semanal deve ser de 120 ng.kg^{-1} de massa corpórea (EFSA, 2006).

Considerando as legislações atuais, os níveis da exposição de OTA em café não oferecem risco ao consumidor, desde que estejam dentro do limite tolerável. O regulamento mais recente foi publicado no Jornal Oficial da União Européia (L364) de 20 de dezembro de 2006 e entrou em vigor em 1º de março de 2007 (COMUNIDADE EUROPÉIA, 2006). A norma refere-se ao café torrado e ao café solúvel, onde os limites máximos de OTA são de respectivamente 5 ng.Kg^{-1} e 10 ng.Kg^{-1} ; não havendo, contudo, limites em relação ao café verde. Convém notar que a situação do café verde continua em exame e que existe a orientação para a comunicação anual da ocorrência da OTA, e medidas de prevenção.

A qualidade do café vem sendo o tema de esforços de âmbito nacional na tentativa de tornar o produto brasileiro mais competitivo frente a países

como Colômbia e Vietnã. Nesse sentido, o presente trabalho teve por objetivo estudar a contaminação por ocratoxina A e fatores relacionados à sua produção, tais como: umidade, atividade de água e contaminação microbiológica dos frutos de café com permanência prolongada na planta e no solo, em duas importantes regiões produtoras - os Cerrados Mineiro e Baiano – possibilitando, dessa forma, o levantamento de informações que enfatizem o risco de utilização desses frutos na composição da safra a ser comercializada.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local, Colheita e Material Vegetal

Os estudos pertinentes à permanência prolongada dos frutos de café no solo (café de varrição) e na planta foram conduzidos em fazendas produtoras de café arábica (*Coffea arabica* L.) situadas nos municípios de Patrocínio e Luiz Eduardo Magalhães (LEM), localizados nos cerrados Mineiro (região do Triângulo Mineiro) e Baiano, respectivamente, em área experimental com delineamento em blocos ao casualizados e quatro repetições.

A colheita foi realizada durante a safra de 2005 e os frutos coletados foram depositados sobre a projeção das copas dos cafeeiros (“saia”), formando uma fina camada, de modo que todos os frutos entrassem em contato com o solo. Dessa forma eles permaneceram em contato com o solo por até 90 dias, sendo realizadas coletas de material para os ensaios a cada 30 dias.

Os materiais coletados nas respectivas regiões foram acondicionados em sacos de papel esterilizados, acomodados em caixas de isopor e enviados, por transporte aéreo, para análise nos laboratórios da Embrapa Agroindústria de Alimentos, localizada no Rio de Janeiro-RJ.

2.2 Preparo e Acondicionamento das Amostras

O café destinado às análises de atividade de água e OTA foi moído até a sua completa pulverização e imediatamente enviado para a análise de atividade de água. As amostras destinadas à detecção de OTA foram acondicionadas em embalagens flexíveis aluminizadas e mantidas a -20°C até o momento da análise.

2.3 Cultivo dos Fungos

Imediatamente após o recebimento das amostras de café no Laboratório de Micologia da Embrapa Agroindústria de Alimentos, os frutos coletados foram plaqueados em meio de cultura DG18 (Merck®), com posterior avaliação aos 7 dias de incubação, a fim de se caracterizar a micobiota presente no exocarpo, mesocarpo e endocarpo do café. Após esse período, as culturas típicas foram isoladas para os meios de MEA (extrato de malte-ágar) e CYA (ágar extrato de levedura Czapeck), onde procedeu-se a identificação dos fungos baseando-se nas características morfológicas e culturais de cada grupo dos Aspergilli (PITT & HOCKING, 1999).

2.4 Análise de Atividade de Água (a_w), Umidade e Ocratoxina A (OTA)

Amostras de 5 g de frutos de café pulverizados foram analisadas para se obter a Atividade de Água, através de um analisador Novasina AW Sprint TH-500. A umidade, por sua vez, foi determinada através da secagem, em estufa, de 5 g de café a 25 mmHg, segundo a AOAC (2000) (Método: 968.11; 2000).

A extração e análise de OTA foram realizadas conforme o que foi determinado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) em sua Instrução Normativa nº 9, de 24 de março de 2000. 25 g do material previamente pulverizado foram extraídos em blender a 5000 rpm durante 4 min na presença de 100 mL de metanol Tedia e 100 mL de uma solução de Bicarbonato de Sódio 3% (30 g de NaHCO_3 Quimex 99% em 1 L de água destilada). O material extraído foi filtrado primeiramente em papel de filtro qualitativo de filtragem rápida. Em seguida foi feita a filtragem a vácuo em membranas de fibra de vidro de 1 μm e de teflon de 0,45 μm . Do filtrado foi tomada uma alíquota de 4 mL e adicionado de 96 mL de solução tampão PBS (2g de KH_2PO_4 , 1,2 g de Na_2HPO_4 , 8,0 g de NaCl e 0,2 g KCl dissolvidos em 1 L de água destilada) em erlenmeyer e agitados manualmente. A solução resultante foi transferida quantitativamente em colunas de imunoafinidade (Ochratest®) e eluída sob um fluxo de 2 a 3 mL.min⁻¹. Terminada a transferência, as colunas foram lavadas com 10 mL de água ultra pura. Em seguida foi feita a extração da micotoxina pela eluição de 4 mL de

metanol (Tedia® grau HPLC). O eluato foi levado à secura sob fluxo de N_2 ultra puro em banho-maria mantido a 50°C. Após secas, as amostras foram ressuspendidas em 300 μL da solução utilizada como fase móvel na corrida cromatográfica.

A OTA foi analisada por cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (CLAE-FR) em um sistema modular Waters composto por bomba W600; injetor automático W717 PLUS; coluna XTerra® (25 cm \times 3,8 cm e 5 μm de diâmetro de partícula), protegida por uma coluna guarda C_{18} (2 \times 1,8 cm; Porapaq Q®) e detector de fluorescência 2495. Nessas condições 20 μL da amostra ressuspendida foram injetados sob fluxo isocrático de 0,8 mL.min⁻¹ de uma solução de Acetonitrila: Metanol:Água:Ácido Acético (35:35:29:1; v/v/v/v) com posterior detecção por fluorescência à $\lambda_{\text{exc.}}$: 333 nm e $\lambda_{\text{em.}}$: 476 nm e verificação da presença de OTA pela comparação dos resultados com um padrão de calibração Sigma® (padronização externa).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Café com permanência prolongada na planta

Neste trabalho foram estudados dois fatores intrínsecos - a umidade e a atividade de água (a_w) - sendo eles os mais importantes para a produção de ocratoxina A pelos fungos produtores. Segundo Silva et al. (2008), as diferenças de umidade e da composição química do café influenciam a competição por substrato e ainda pela colonização de microorganismos. Dessa forma a produção de metabólitos pela população epifítica nas cereja e nos grãos de café pode migrar para o interior da semente e até alterar o sabor da bebida.

Assim, nas amostras estudadas após 30 dias de permanência do café na planta, a umidade e a a_w dos frutos de café em Patrocínio foram de 7,64 e 0,62, respectivamente (Figuras 1 e 2; Tabela 1). Não houve grande variação no período; apenas um ligeiro aumento de umidade (8,53%) e redução da a_w (0,58) ao final de 120 dias de permanência na planta (Figuras 1 e 2; Tabela 1).

Em LEM, semelhante ao ocorrido em Patrocínio, a umidade e a a_w dos frutos após 30 dias de permanência na planta foram de 7,97 e 0,63, respectivamente (Figuras 1 e 2; Tabela 1). O mesmo ocorreu com os teores de umidade dos cafés com

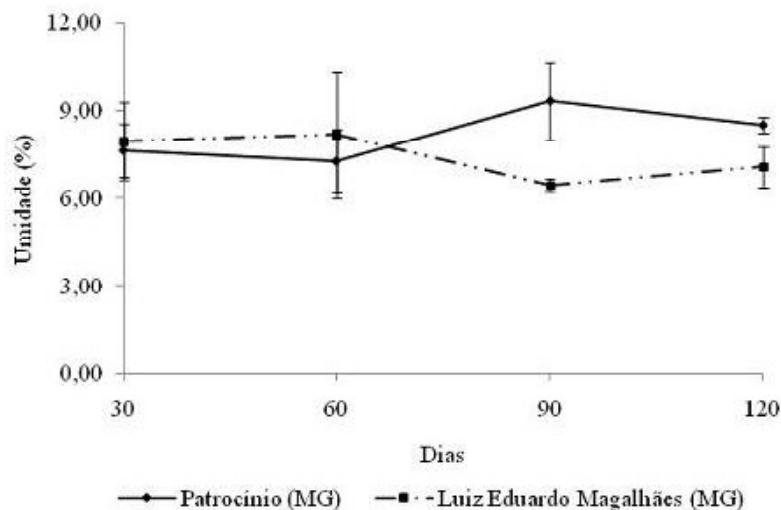


Figura 1 – Umidade em grãos de café com permanência prolongada na planta, provenientes do Cerrado Mineiro (Patrocínio) e do Cerrado Baiano (LEM), com valores expressos em porcentagem (%). Barras verticais indicam os limites de confiança ao nível de 95% pelo teste “t”.

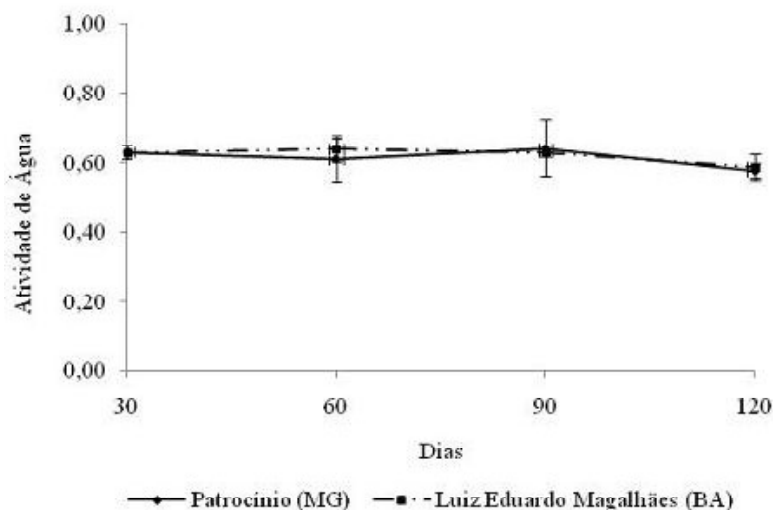


Figura 2 – Atividade de água (a_w) em grãos de café com permanência prolongada na planta, provenientes dos Cerrados Mineiro (Patrocínio) e Baiano (LEM). Barras verticais indicam os limites de confiança ao nível de 95% pelo teste “t”.

60 dias de permanência na planta onde, até então, não havia sido observada diferença significativa ao nível de 5% de significância pelo teste “t” (Figuras 1 e 2; Tabela 1).

Após 60 dias, os teores de umidade dos frutos passaram a diferir significativamente entre as regiões

estudadas. A região de Patrocínio apresentou frutos com teores de umidade maiores do que aqueles colhidos em LEM. Aos 120 dias, por exemplo, os cafés apresentavam umidade de 8,53 e 7,09%, para Patrocínio e LEM, respectivamente (Figuras 1 e 2; Tabela 1).

Tabela 1 – Umidade, atividade de água (a_w) e ocratoxina A (OTA) em cafés com permanência prolongada na planta, colhidos em fazendas localizadas nas regiões do Cerrado Mineiro e Baiano.

Dias	Cerrado Mineiro (Patrocínio)			Cerrado Baiano (Luiz Eduardo Magalhães)		
	Umidade (%)	a_w	OTA ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	Umidade (%)	a_w	OTA ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)
30	7,64	0,62	N.D. ²	5,90	0,61	N.D. ²
60	7,29	0,61	N.D.	6,59	0,63	0,2 ^{1,*}
90	9,33	0,64	0,2 ^{1,*}	6,64	0,63	N.D.
120	8,53	0,58	N.D.	6,87	0,64	N.D.

¹Valores referentes ao limite mínimo de detecção e quantificação do método utilizado.

*Limite de Detecção e Quantificação do Método: 0,2 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (BRASIL, 2000).

²N.D.: Não detectado.

Ao contrário do observado com a umidade, a a_w pouco variou durante o período estudado nas duas regiões, com valores não diferindo ao nível de 5% de significância pelo teste “t”.

Com relação à colonização dos frutos de café por fungos micotoxigênicos, os resultados demonstraram seu início já no primeiro mês de permanência na planta (Figuras 3 e 4; Tabela 2). Esse fato foi notadamente visível nas duas regiões estudadas, sendo que em Patrocínio houve uma contaminação progressiva, iniciando com 8,63% de frutos colonizados após trinta dias, culminando aos 120 dias com todos os frutos contaminados por *Aspergillus ochraceus* (Figuras 3 e 4, Tabela 2). Nessa mesma região, a contaminação por *A. flavus* Link (1809) e *A. niger* foi muito pouco significativa quando comparada com os fungos predominantes, os quais, após 90 dias colonizavam, respectivamente, 6,5 e 1,1% dos frutos (Figura 3 e 4; Tabela 2).

Por sua vez, em LEM verificou-se uma elevada colonização por *A. ochraceus*, estando presente em 45% dos frutos colhidos. Tal como observado em Patrocínio, houve em LEM um constante e progressivo aumento da incidência por *A. ochraceus*, totalizando após 120 dias de permanência na planta 90% de frutos contaminados. Ao contrário do observado com *A. ochraceus*, os demais fungos estudados não foram encontrados nas amostras analisadas (Figuras 3 e 4; Tabela 2).

Apesar da elevada incidência de *A. ochraceus*, os frutos de café provenientes das regiões estudadas, não houve, no entanto, produção de ocratoxina, indicando que as condições intrínsecas e

ambientais não foram suficientemente adequadas para a síntese dessa micotoxina. Palacios-Cabrera et al. (2004), por exemplo, mencionam condições ambientais como umidade, temperatura e tempo de incubação, tanto quanto a natureza do substrato como fatores importantes na colonização por fungos ocratoxigênicos e produção de OTA.

Outro fator importante a ser considerado, o qual pode ser observado com os resultados, foi que a permanência do café na planta por um período prolongado não interferiu de maneira negativa sobre os valores intrínsecos estudados, tanto quanto, não foi uma fonte de risco com relação à produção de ocratoxina A.

3.2 Café com permanência prolongada no solo

Os frutos de café colhidos nos municípios de Patrocínio e Luiz Eduardo Magalhães (LEM) apresentaram inicialmente umidade de 7,27 e 5,90%, respectivamente, não diferindo entre si de acordo com o limite de confiança (Figura 5; Tabela 2).

A partir do tempo “0” verificou-se diferença entre as taxas de umidade dos frutos em contato com o solo (Figura 5; Tabela 3). Os colhidos em Patrocínio apresentaram médias maiores do que aqueles colhidos em LEM (Figura 5). Em Patrocínio os teores de umidade apenas variaram significativamente entre o 30º e o 60º dia (Figura 5), quando a umidade saltou de 8,95% para 13,38% (Figura 5; Tabela 2). As variações na umidade dos frutos de varrição colhidos em LEM foram menos expressivas. Apenas a amostra inicial apresentou diferença significativa dos demais tempos de exposição dos frutos ao solo. Nessa região,

Tabela 2 – Colonização pelos fungos micotoxigênicos, *Aspergillus ochraceus*, *A. niger* e *A. flavus* em frutos de café com permanência prolongada na planta, colhidos nas regiões do Cerrado Mineiro (Patrocínio) e Cerrado Baiano (Luiz Eduardo Magalhães – LEM).

Dias	Cerrado Mineiro (Patrocínio)			Cerrado Baiano (Luiz Eduardo Magalhães)		
	<i>A. ochraceus</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. ochraceus</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. flavus</i>
30	8,63%	2,50%	0,63%	45,00%	0,00%	0,63%
60	33,13%	2,56%	1,38%	63,13%	0,00%	0,00%
90	72,06%	4,56%	3,06%	88,13%	0,38%	0,31%
120	96,00%	6,50%	1,06%	90,63%	0,63%	0,00%

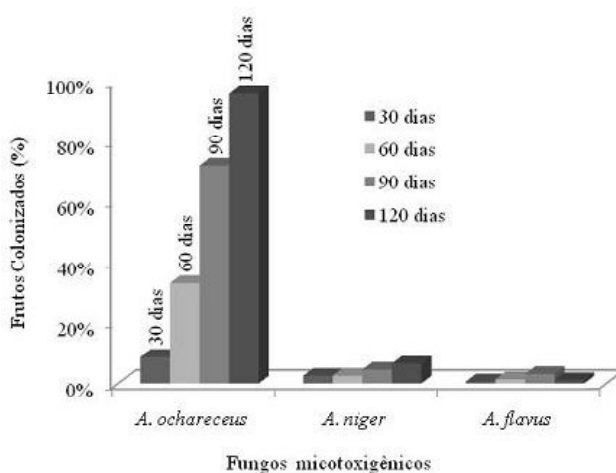


Figura 3 – Proporção (em porcentagem - %) de frutos de café com permanência prolongada na planta, colonizados pelos fungos *Aspergillus ochraceus*, *A. niger* e *A. flavus* na região do Cerrado Mineiro – Patrocínio.

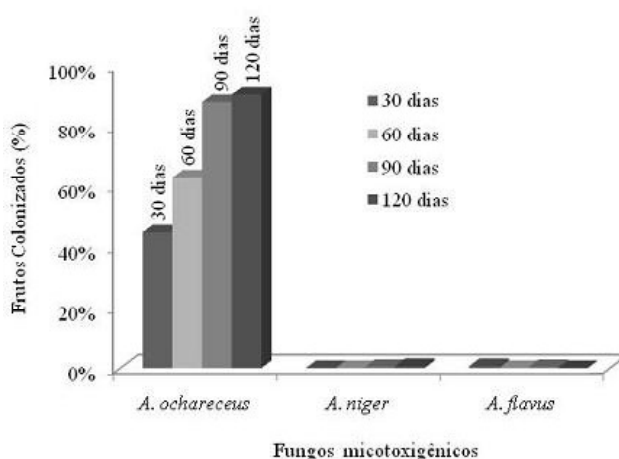


Figura 4 – Proporção (em porcentagem - %) de frutos de café com permanência prolongada na planta, colonizados pelos fungos *Aspergillus ochraceus*, *A. niger* e *A. flavus* na região do Cerrado Baiano – Luiz Eduardo Magalhães (LEM).

após 90 dias de exposição, os frutos apresentaram 6,87% de umidade (Figura 5; Tabela 3).

A atividade de água (a_w) seguiu o esperado, em vista da cinética de umidade apresentada pelos frutos colhidos nas diferentes regiões estudadas (Figura 6 e Tabela 3). Em Patrocínio, o café de varrição apresentou a_w inicial de 0,61, permanecendo significativamente inalterada até 30 dias de exposição no solo (Tabela 3). A partir do 60º dia verificou-se aumento significativo na a_w (0,68), encerrando-se aos 90 dias com valores de 0,74 (Figura 6; Tabela 3)

Contrário ao observado em Patrocínio, a a_w em LEM não diferiu significativamente durante o período de exposição dos frutos no solo, apresentando

valores que variaram entre 0,61 e 0,64 durante o período estudado (Figura 6; Tabela 3). Por sua vez, entre as regiões, ocorreu diferença significativa entre os valores de a_w somente a partir do 60º dia, devido ao aumento acelerado na a_w das amostras de café colhidas em Patrocínio, uma vez que em LEM esses valores permaneceram quase constantes (Figura 6).

Houve, no café de varrição colhido em Patrocínio, uma rápida colonização dos frutos em contato com o solo. Já a partir de 30 dias, 100% dos frutos analisados estavam colonizados por *A. ochraceus* (Figura 7; Tabela 4). Esse fato corrobora os dados obtidos por Chalfoun & Batista (2006), os quais observaram proporção semelhante de

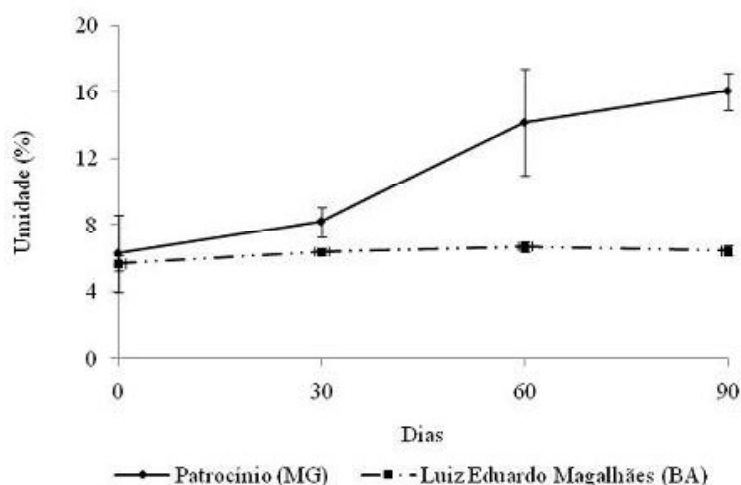


Figura 5 – Umidade em grãos de café com persistência prolongada no solo, provenientes do Cerrado Mineiro (Patrocínio) e do Cerrado Baiano (LEM), com valores expressos em porcentagem (%). Barras verticais indicam os limites de confiança ao nível de 95% pelo teste “t”.

Tabela 3 – Umidade, atividade de água (a_w) e ocratoxina A (OTA) em cafés com persistência prolongada no solo, colhidos em fazendas localizadas nas regiões do Cerrado Mineiro e Baiano.

Região	Cerrado Mineiro (Patrocínio)			Cerrado Baiano (Luiz Eduardo Magalhães)			
	Dias	Umidade (%)	a_w	OTA ($\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$)	Umidade (%)	a_w	OTA ($\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$)
	0	7,27	0,61	0,43	5,90	0,61	0,2 ^{1,*}
	30	8,95	0,63	1,72	6,59	0,63	0,2 ^{1,*}
	60	13,38	0,68	47,98	6,64	0,63	4,15
	90	14,15	0,74	49,42	6,87	0,64	30,93

¹Valores referentes ao limite mínimo de detecção e quantificação do método utilizado.

*Limite de Detecção e Quantificação do Método: 0,2 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (BRASIL, 2000).

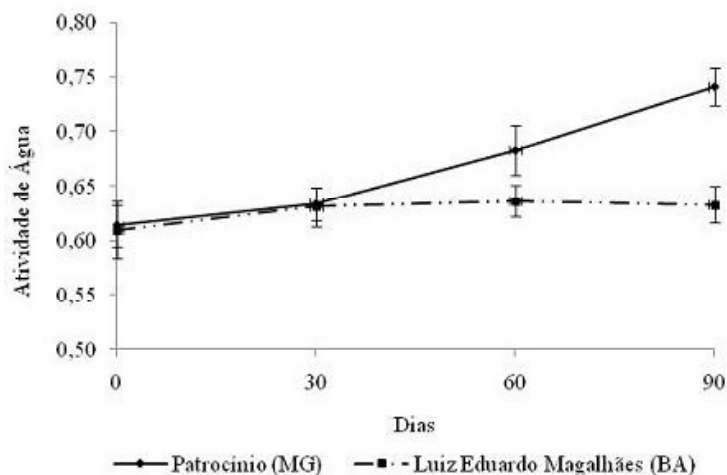


Figura 6 – Atividade de água (a_w) em grãos de café com persistência prolongada no solo, provenientes dos Cerrados Mineiro (Patrocínio) e Baiano (LEM). Barras verticais indicam os limites de confiança ao nível de 95% pelo teste “t”.

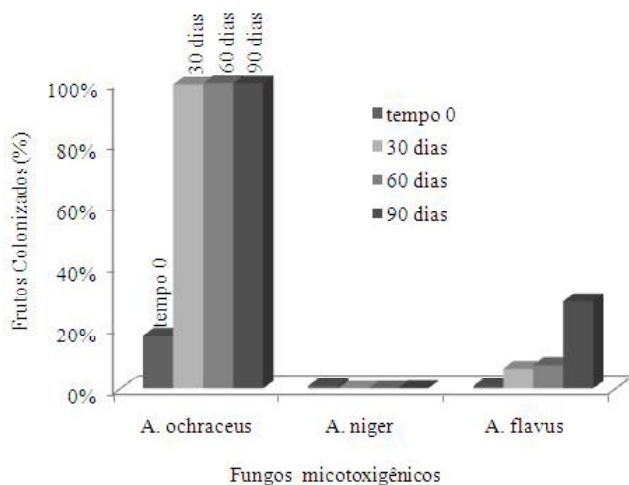


Figura 7 – Proporção (em porcentagem - %) de frutos de café com permanência prolongada no solo, colonizados pelos fungos *Aspergillus ochraceus*, *A. niger* e *A. flavus* na região do Cerrado Mineiro – Patrocínio.

Tabela 4 – Colonização pelos fungos micotoxigênicos, *Aspergillus ochraceus*, *A. niger* e *A. flavus* em frutos de café com permanência prolongada no solo, colhidos nas regiões do Cerrado Mineiro (Patrocínio) e Cerrado Baiano (Luiz Eduardo Magalhães – LEM).

Região	Cerrado Mineiro (Patrocínio)			Cerrado Baiano (Luiz Eduardo Magalhães)			
	Dias	<i>A. ochraceus</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. ochraceus</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. flavus</i>
0		17,50%	0,83%	0,78%	2,67%	0,17%	0,17%
30		99,57%	0,00%	6,67%	16,75%	0,17%	1,33%
60		100,00%	0,00%	7,83%	100,00%	0,25%	1,00%
90		99,92%	0,17%	28,67%	98,33%	0,92%	2,50%

contaminação por espécies de *Aspergillus* Secção Cirundatti nesse mesmo tipo de café.

Nesse café constatou-se também a presença de *A. flavus* em quantidades expressivas, uma vez que foi observado um progressivo aumento de frutos colonizados por esses fungos, que atingiram, aos 90 dias, aproximadamente 30% dos frutos colonizados.

Por sua vez, em LEM, o processo de colonização pelos fungos micotoxigênicos foi intenso, porém menos acelerado do que o observado em Patrocínio (Figura 8), evoluindo de aproximadamente 17% aos 30 dias, para 100% de frutos colonizados por *A. ochraceus* aos 60 dias de exposição dos frutos ao solo (Figura 8; Tabela 4). Nessa região a colonização por *A. flavus* foi pouco expressiva, culminando aos 90 dias com 2,5% dos frutos colonizados por esse fungo (Figura 8).

Foram detectados níveis muito elevados de ocratoxina A nas duas regiões estudadas (Figura 9; Tabela 3), embora o maior destaque tenha sido para os frutos provenientes de Patrocínio, onde a partir do 30º dia de contato com o solo uma acelerada produção dessa micotoxina culminou com níveis de 47,98 e 49,42 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ aos 60 e 90 dias, respectivamente (Figura 9; Tabela 3). Em LEM, a produção de OTA atingiu, aos 90 dias, 30,93 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ de OTA (Figura 9; Tabela 3). Batista & Chalfoun (2007) encontraram níveis de OTA maiores que 20 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ em café de varrição, semelhante ao observado nesse trabalho,

denotando, desse modo, o impacto negativo da utilização de cafés provenientes dessa forma de colheita.

Os resultados demonstraram que o período de exposição do café no solo contribuiu para elevar os níveis de OTA nas amostras estudadas. Por sua vez, as condições edafoclimáticas de cada região interferiram na dinâmica do fruto no solo, mesmo que os frutos tivessem sido colhidos ainda no período da seca. Na região do Cerrado Mineiro, por exemplo, a umidade média dos frutos foi superior à verificada no Cerrado Baiano, com a atividade de água dos frutos seguindo a mesma tendência. Independente da região estudada, os valores de a_w encontrados estavam abaixo do mínimo necessário para a produção de ocratoxina A, conforme citado pela literatura (PALÁCIOS-CABRERA et al., 2004; PARDO et al., 2004 a, b; RAMOS et al., 1998). Ressalta-se, também, que nessa região houve um pico de produção de ocratoxina A aos 90 dias, mesmo com os frutos apresentando uma atividade de água de 0,64 (Tabela 3).

Desse modo, há indicação de que sob condições de campo, durante a permanência prolongada do fruto no solo, outros fatores, sejam eles bióticos ou abióticos, influenciam decisivamente na dinâmica de produção de OTA. A complexidade do microambiente formado no local onde os frutos se depositam contrasta com o ambiente controlado *in*

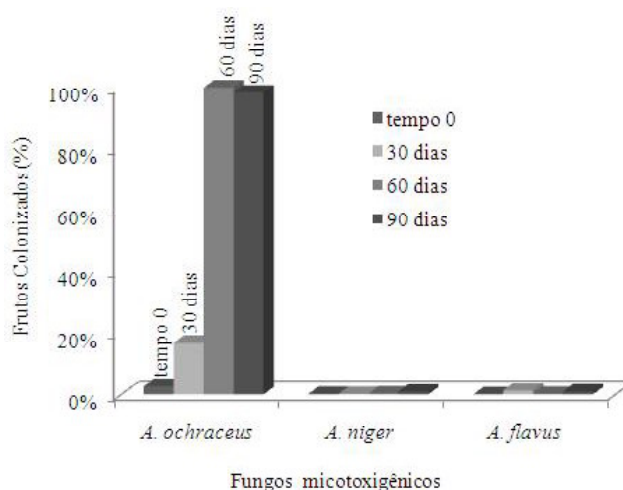


Figura 8 – Proporção (em porcentagem - %) de frutos de café com permanência prolongada no solo, colonizados pelos fungos *Aspergillus ochraceus*, *A. niger* e *A. flavus* na região do Cerrado Baiano – Luiz Eduardo Magalhães (LEM).

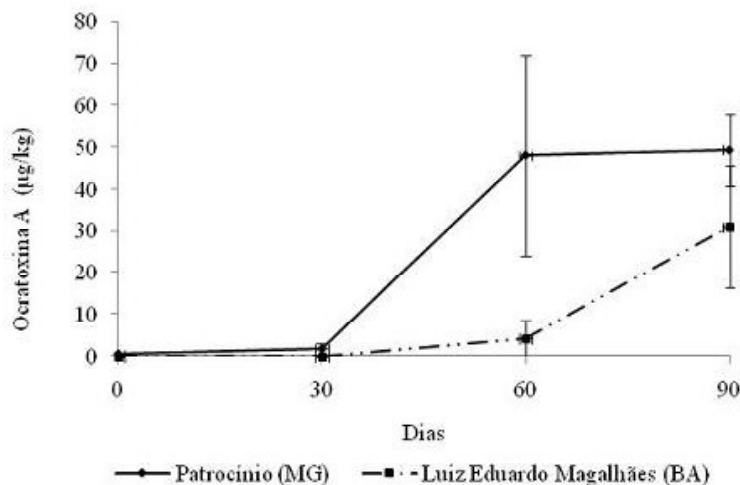


Figura 9 – Contaminação por ocratoxina A (OTA) em grãos de café com persistência prolongada no solo, provenientes do Cerrado Mineiro (Patrocínio) e Baiano (LEM), com valores expressos em $\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$ de OTA. Barras verticais indicam os limites de confiança ao nível de 95% pelo teste “t”.

vitro, onde os estudos dessas interações são desenvolvidos. Isso demonstra que mesmo sob condições de estresse vinculadas à atividade de água, fatores bióticos (competição, por exemplo) ou mesmo abióticos, aos quais os fungos micotoxigênicos ficam expostos, são decisivamente importantes para a produção de OTA em café de varrição.

4 CONCLUSÕES

Os resultados demonstraram que a forma de colheita é decisivamente importante para a qualidade da safra a ser comercializada. Práticas como a colheita do café de varrição prejudicam tanto a qualidade da bebida quanto a sua segurança, uma vez que esses frutos possuem níveis muito elevados de fungos micotoxigênicos e também de OTA.

Com base na dificuldade causada pelo clima, na uniformidade de amadurecimento do café nas lavouras brasileiras o “café seco no pé” (café com permanência prolongada na planta) proporciona menores riscos ao café a ser comercializado, uma vez que não é fonte potencial de OTA.

A dinâmica do desenvolvimento fúngico bem como a sua potencialidade de produção de OTA demonstraram ser muito dependentes das condições do ambiente, em que não apenas fatores como a umidade e a a_w definem a produção dessa micotoxina, como também um intrincado conjunto de fatores

bióticos e abióticos aos quais os frutos de café ficam expostos.

5 AGRADECIMENTOS

Ao Consórcio Brasileiro de Pesquisas e Desenvolvimento do Café, pelo suporte Financeiro; à EPAMIG Patrocínio, por proporcionar as facilidades para a condução dos experimentos de campo.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE CAFÉ. **Exportações brasileiras de café em grãos**. Disponível em: <http://www.abic.com.br/estat_exportacoes.html>. Acesso em: 26 out. 2008a.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE CAFÉ. **Indicadores da indústria de café no Brasil**. Disponível em: <<http://www.abic.com.br/estatisticas.html#graf1>>. Acesso em: 26 out. 2008b.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS INTERNATIONAL. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 18. ed. Gaithersburg, 2000.

BARTHOLO, G. F. Cuidados na colheita, no preparo e no armazenamento do café. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 14, n. 162, p. 33-44, 1988.

- BATISTA, L. R.; CHALFOUN, S. M. Incidência de ocratoxina A em diferentes frações do café (*Coffea arabica* L.): bóia, mistura e varrição após secagem em terreiros de terra, asfalto e cimento. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 3, p. 804-813, 2007.
- BATISTA, L. R.; CHALFOUN, S. M.; PRADO, G.; SCHWAN, R. F.; WHEALS, A. E. Toxigenic fungi associated processed (green) coffee beans (*Coffea arabica* L.). **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 83, p. 293-300, 2003.
- BEUX, M. R.; SOCCOL, C. R. Microbiota isolada durante as fases de pré e pós-colheita dos grãos de café associada à qualidade e sanidade da bebida. **Boletim CEPPA**, v. 22, n. 1, p. 155-172, 2004.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Instrução nº 9, de 24 de março de 2000. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, 30 mar. 2000. Seção 1, p. 35. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/servlet/VisualizarAnexo?id=1790>>. Acesso em: 19 out. 2008.
- CHALFOUN, S. M.; BATISTA, L. R. incidência de ocratoxina a em diferentes frações de grãos de café (*Coffea arabica* L.). **Coffee Science**, Lavras, v. 1, n. 1, p. 28-35, 2006.
- COMUNIDADE EUROPEIA. Regulamento (CE) Nº 123/2005, de 26 de Janeiro de 2005. **Jornal Oficial [da] União Européia**, Bruxelas, 28 jan. 2005. série L, n. 25. Disponível em: <<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2005:025:0003:0005:PT:PDF>>. Acesso em: 19 out. 2008.
- ESTEBAN, A.; ABARCA, M. L.; BRAGULAT, M. R.; CABAÑES, F. J. Study of the effect of water activity and temperature on ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius*. **Food Microbiology**, London, v. 23, p. 634-640, 2006.
- EUROPEAN FOOD SAFETYAUTHORITY. Opinion of the scientific panel on contaminants in food chain on a request from the commission related to ochratoxin A (OTA) as undesirable substance in animal feed. **The EFSA Journal**, v. 101, p. 1-36, 2004. Disponível em: <http://www.efsa.europa.eu/cs/BlobServer/Scientific_Opinion/opinion_contam09_ej101_ochratoxina_en1.pdf?ssbinary=true>. Acesso em: 19 out. 2008.
- EUROPEAN FOOD SAFETYAUTHORITY. Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the Commission related to ochratoxin A in food. **The EFSA Journal**, v. 365, p. 1-56, 2006. Disponível em: <http://www.efsa.europa.eu/cs/BlobServer/Scientific_Opinion/contam_op_ej365_ochratoxin_a_food_en.pdf?ssbinary=true>. Acesso em: 19 out. 2008.
- FOODANDAGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS. Ochratoxin A (OTA): OTA in foodstuffs and associated regulations. In: _____. **Reducing Ochratoxin A in coffee**. Disponível em: <http://www.coffee-ota.org/ota_foodstuffs.asp>. Acesso em: 19 out. 2008.
- FRISVAD, J. C.; THRANE, U.; SAMSON, R. A.; PITT, J. I. Important mycotoxins and the fungi which produce them. In: HOCKING, A. D.; PITT, J. I.; SAMSON, R. A.; THRANE, U. (Eds.). **Advances in food mycology**. New York: Springer, 2006. p. 3-31.
- FURLANI, R. P.; SOARES, L. M. V. Revisão: Ocratoxina A em café. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 2, p. 1-6, 1999.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Levantamento sistemático da produção agrícola**: em 2008, safra de grãos deverá crescer 2,1%. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_impresao.php?id_noticia=1068>. Acesso em: 20 nov. 2008.
- MORAES, M. H. P. de; LUCHESE, R. H. Ochratoxin A on green coffee: influence of harvest and drying processing procedures. **Journal Agriculture Food Chemistry**, Easton, v. 51, p. 5824-5828, 2003.
- MOREIRA, R. F. A.; TRUGO, L. C. Componentes voláteis do café torrado: parte 2: compostos alifáticos, alicíclicos e aromáticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 23, n. 2, p. 195-203, 2000.
- ORMOND, J. G. P.; PAULA, S. R. L. de; FERREIRA FILHO, P. Café: (re)conquista dos mercados. **BNDES Setorial**, Rio de Janeiro, n. 10, p. 3-56, 1999.
- PALACIOS-CABRERA, H.; TANIWAKI, M. H.; MENEZES, H. C.; IAMANAKA, B. T. The production of ochratoxin A by *Aspergillus ochraceus* in raw coffee at different equilibrium relative humidity and under alternating temperatures. **Food Control**, Guildford, v. 15, p. 531-535, 2004.

- PARDO, E.; MARIN, S.; SANCHIS, V.; RAMOS, A. J. Prediction of fungal growth and ochratoxin A production by *Aspergillus ochraceus* on irradiated barley grain as influenced by temperature and water activity. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 95, p. 79-88, 2004a.
- PARDO, E.; MARÍN, S.; SOLSONA, A.; SANCHIS, V.; RAMOS, A. J. Modeling of germination and growth of ochratoxigenic isolates of *Aspergillus ochraceus* as affected by water activity and temperature on a barley-based médium. **Food Microbiology**, London, v. 21, p. 267-274, 2004b.
- PITT, J. I.; HOCKING, A. D. Methods for isolation, enumeration and identification. In: _____. **Medical micology: fungi and food spoilage**. 2. ed. Gaithersburg: Aspen, 1999. p. 21-57.
- PITTET, A.; TORNARE, D.; HUGGETT, A.; VIANI, R. Liquid chromatographic determination of ochratoxin A in pure and adulterated soluble coffee using an immunoaffinity column cleanup procedure. **Journal Agriculture Food Chemistry**, Easton, v. 44, p. 3564-3569, 1996.
- POHLAND, A. E.; NESHEIM, S.; FRIEDMAN, L. Ochratoxin A: a review. **Pure & Applied Chern.**, v. 64, n. 7, p. 1029-1046, 1992.
- RAMOS, A. J.; LABERNIA, N.; MARIN, S.; SANCHIS, V.; MAGAN, N. Effect of water activity and temperature on growth and ochratoxin production by three strains of *Aspergillus ochraceus* on a barley extract medium and on barley grains. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 44, p. 133-140, 1998.
- ROMANI, S.; PINNAVAIA, G. G.; DALLA ROSA, M. Influence of roasting levels on ochratoxin A content in coffee. **Journal Agriculture Food Chemistry**, Easton, v. 51, p. 5168-5171, 2003.
- ROMANI, S.; SACCHETTI, G.; LÓPEZ, C. C.; PINNAVAIA, G. G.; DALLA ROSA, M. Screening on the occurrence of ochratoxin A in green coffee beans of different origins and types. **Journal Agriculture Food Chemistry**, Easton, v. 48, p. 3616-3619, 2000.
- SILVA, C. F.; BATISTA, L. R.; ABREU, L. M.; DIAS, E. S.; SCHWAN, R. F. Succession of bacterial and fungal communities during natural coffee (*Coffea arabica* L.) fermentation. **Food Microbiology**, London, v. 25, p. 951-957, 2008.
- 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, n. 7, p. 30-36, 2003. Exemplar café.
- TANIWAKI, M. H. An update on ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in coffee. In: HOCKING, A. D.; PITT, J. I.; SAMSON, R. A.; THRANE, U. (Eds.). **Advances in food mycology**. New York: Springer, 2006. p. 189-202.
- 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**, Amsterdam, v. 82, p. 173-179, 2003.
- VENÂNCIO, A.; PATERSON, R. The challenge of mycotoxins. In: McELHATTON, A.; MARSHALL, R. J. (Eds.). **Food safety**. New York: Springer, 2007. p. 26-49.