

# MONITORAMENTO DE FUNGOS POTENCIALMENTE TOXIGÊNICOS EM CAFÉS COM PERMANÊNCIA PROLONGADA NA PLANTA E EM CONTATO COM SOLO.

Ricardo Tadeu G. Pereira<sup>1</sup>E-mail:rtgpereira@hotmail.com, Elisa R. Matos<sup>2</sup> e Ludwig H. Pfenning E-mail: ludwig@ufla.br  
Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, UFLA, CP 37, 37200-000, Lavras, MG.

1- Bolsista CNPq; 2- Bolsista PIBIC-CNPq

## Resumo:

Na cadeia produtiva do cafeeiro a identificação de fatores de risco à qualidade e segurança do produto possibilita a proposição de práticas que visem implementar um rígido controle. Atualmente, um dos perigos mais significativos é a ocorrência de ocratoxina A, uma micotoxina com possíveis efeitos carcinogênicos. A caracterização de fluxogramas de produção e o estudo das populações fúngicas presentes nos diferentes tipos de cafés e vias de processamento em estudos anteriores evidenciou como prováveis pontos críticos à segurança do produto os cafés de “varrição” e “secos no pé” (Pereira, 2004). Durante o ano de 2004 foi monitorada a presença de fungos em cafés de varrição e cafés com permanência prolongada na planta, “secos no pé”. A maior porcentagem de grãos colonizados por *Aspergillus ochraceus* foi verificada aos 30 dias após o ponto ideal de colheita na maioria das amostras de “secos no pé”. A secagem em terreiro reduziu a colonização dos grãos por *Fusarium* spp., *Cladosporium cladosporioides* e *Penicillium* spp. Nos cafés do tipo varrição, a maior porcentagem de colonização por *Aspergillus ochraceus* foi verificada após um período de sete dias de permanência em contato com o solo. As análises da presença de toxina nas amostras estão em andamento.

## Monitoring of potentially toxigenic fungi in coffee with prolonged permanency on plant and in contact with soil.

### Abstract

Identification of risk to quality and security of coffee is the way to propose practices that aim the introduction of practices for rigorous quality control. At present, the most important hazard to coffee quality is the occurrence of ochratoxin A, a mycotoxin with carcinogenic effect. Characterization of flow-diagrams for the production chain and assessment of fungal populations associated to different types of coffee and steps during processing in former assays evidenced that qualities like gleaning or try dried may figure as critical point for coffee security. During 2004, the presence of potentially risk fungi associated to tree dried fruits and gleaning coffee was assessed. Highest percentage of coffee grains colonized by *Aspergillus ochraceus* was verified after 30 days after the ideal point for harvest in most of the samples. Drying in the yard reduced the colonization frequency in grains of *Fusarium* spp., *Cladosporium cladosporioides* and *Penicillium* spp. In samples of the gleaning type, highest percentage of colonization by *Aspergillus ochraceus* was verified after a period of 7 days in contact with soil. OTA analyses of the samples is still going on.

**Keys words:** *Aspergillus ochraceus*, ochratoxin A, monitoring, quality, food safety.

## Introdução:

Ocratoxina A (OTA) é uma micotoxina produzida por algumas espécies de fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium*. Os efeitos agudos, nefrotóxicos, imunossupressivos e carcinogênicos da OTA já estão bem caracterizados em animais sendo também possivelmente carcinogênico a humanos (IARC, 2003; Pfohl-Leszkowicz, 2002). As fontes de ingestão de OTA por seres humanos são principalmente os cereais, sucos de uva, vinhos, carnes, cerveja e café (Abarca, 2001; Mantle, 2000). Devido aos prováveis danos a saúde, a União Européia fixou o limite máximo de contaminação de grãos de café pela OTA em 5µg/kg, levando a preocupação dos países produtores em melhorar a segurança do produto, evitando as perdas comerciais. As principais espécies potencialmente ocratoxigênicas presentes em grãos e frutos de café no Brasil são *Aspergillus ochraceus*, de ampla distribuição nas principais regiões produtoras, e *Aspergillus carbonarius*, de ocorrência aparentemente restrita (Batista, 2003; Taniwaki, 2003). O estudo dos prováveis pontos onde possa ocorrer a contaminação pela OTA é fundamental na proposição de práticas que minimizem os riscos à segurança do produto. Os cafés com permanência prolongada na planta, “seco no pé” (SNP) e os cafés de varrição (VR) são pontos onde pode ocorrer a contaminação por OTA (Pereira, 2004). Frutos de varrição coletados em diferentes regiões do Brasil e plaqueados sem a retirada da casca diretamente em meio DG18 apresentaram um percentual de colonização de grãos por *Aspergillus ochraceus* variável de até 6% (Taniwaki, 2003). Em relação à contaminação, cafés de varrição apresentaram altos níveis de ocratoxina em amostras coletadas em algumas propriedades no Brasil (Moraes, 2003). Com relação aos cafés que secam na planta, os maiores problemas estão relacionados às condições climáticas que o fruto é exposto, uma exposição prolongada a uma condição ideal pode levar a altos níveis de contaminação pela OTA. Assim, o objetivo do presente trabalho foi estudar o efeito da permanência prolongada do fruto aderido à planta ou em contato com o solo na colonização por fungos e contaminação por OTA.

## Material e métodos

### Experimento Cafés“Seco no Pé”

O experimento foi conduzido em duas lavouras localizadas no município de Perdões MG. A área “Morro” estava localizada no topo de um morro a 873 m de altitude e a área “Lago” a beira de um lago a 809m de altitude, a distância entre as duas

áreas era de 1100m. O café coletado em ambas as áreas foi analisado imediatamente após a colheita ou após secagem ao sol imitando as condições de terreiro. As coletas foram realizadas nos meses de junho, julho e agosto de 2004. A primeira avaliação do mês de julho foi considerada o “tempo 0” ou ponto ideal de colheita e as posteriores tempos “30” e “60” dias após o ponto ideal. Para cada tratamento foram utilizadas quatro repetições, totalizando 48 amostras de 60 grãos. As amostras coletadas foram analisadas quanto à presença de fungos na casca e no grão. As cascas foram trituradas em água peptonada diluídas em série e a suspensão obtida foi plaqueada em meio DG18. Os grãos foram desinfestados superficialmente em hipoclorito, secos em papel de filtro e plaqueados em meio DG18. Os resultados das cascas são fornecidos em unidades formadoras de colônia por fruto/casca e dos grãos em porcentagem de grãos colonizados. A presença de OTA nas amostras está sendo analisada.

### **Experimento “Cafés de Varrição”**

O experimento foi conduzido na área experimental do Setor de cafeicultura da Universidade Federal de Lavras. Foram coletados 40 litros de café do tipo bóia e depositados sob a projeção da copa do cafeeiro. Após períodos de sete dias foram coletadas amostras destes frutos e analisadas quanto a colonização por fungos e presença de OTA. As amostras do tempo 0 somente foram colocadas em contato com o solo, simulando uma colheita no chão. As outras amostras foram coletadas aos 7, 14 e 21 dias de contato com o solo. Todas as amostras foram coletadas com 3 repetições. No local do experimento foi colocado um termohigrógrafo para o registro das temperaturas e umidades abaixo da copa. As análises microbiológicas foram realizadas como no experimento anterior.

## **Resultados**

### **Cafés “Secos no Pé”**

Nos cafés que secaram na planta, *Aspergillus ochraceus* não foi detectado nos frutos processados imediatamente após a colheita no tempo 0, em nenhuma das áreas estudadas (Tabela 1). A maior porcentagem de grãos colonizados por *Aspergillus ochraceus* foi verificada aos 30 dias após o início da colheita, exceto para as amostras processadas imediatamente após a colheita e provenientes da área do lago. (Tabela 1). Estas observações permitem caracterizar os cafés secos na planta como fatores de risco à segurança do produto, devido ao aumento da colonização pelo fungo à medida que o fruto permaneceu no campo. A redução na carga microbiana após 60 dias de permanência no campo pode ser ocasionada pela indisponibilidade de água pela secagem natural e pela competição com outras espécies como já foi observado por Bucheli, 2002. Após a secagem foi possível detectar *Aspergillus ochraceus* em todas as amostras analisadas, este pode estar relacionado com a restrição da competição com outras espécies como *Fusarium* e leveduras que são sensivelmente reduzidas durante o processo de secagem.

A redução da colonização dos grãos por *Fusarium* spp., *Cladosporium cladosporioides* e *Penicillium* spp. após a secagem em terreiro na maioria das amostras, conforme apresentado nas tabelas 1 e 2, se deve principalmente à capacidade que estas espécies tem em tolerar baixas atividades de água como já foi constatado (Samson, 2000 e Northolt, 1982). Leveduras representaram o maior número de unidades formadoras de colônia na comunidade fúngica da casca, sendo também reduzida sua proporção no fruto seco (Tabela 2). A proporção de café do tipo bóia aumentou linearmente com a permanência dos frutos no campo, ao contrário dos frutos cereja e verde. (Tabela 3). Foi observada a redução linear da umidade e da atividade de água dos grãos na medida em que os frutos permaneceram no campo. (Tabela 4). Dentro do grupo ochraceus foram identificadas as espécies *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus melleus* e *A. sulphureus*. Dentre os isolados de *Penicillium* recuperadas foram identificadas as espécies *Penicillium commune*, *P. raistrickii*, *P. purpurogenum*, *P. brevicompactum*, *P. crustosum*, nenhuma delas conhecida como toxigênica. As espécies de *Fusarium* encontradas foram *Fusarium stilboides*, *F. semitectum* e *Fusarium oxysporum*. Dentro do grupo “*Aspergillus niger*”, a espécie predominante foi *Aspergillus niger*.

### **Cafés de “Varrição”**

*Aspergillus ochraceus* apresentou um grande aumento na frequência de colonização na primeira semana de contato com o solo (Tabela 5). Este fato pode ser explicado devido à umidade relativa de aproximadamente 80% presente sob a projeção da copa do cafeeiro logo na primeira semana de contato com o solo. As espécies de *Penicillium* encontradas apresentaram um comportamento semelhante a *Aspergillus ochraceus*. *Aspergillus niger* foi detectado nas amostras apenas após 14 dias de contato com o solo. A frequência de colonização dos grãos por espécies de *Fusarium* e de *Cladosporium cladosporioides* aumentou após 14 dias de permanência com o solo. O aspecto visual dos frutos coletados antes do processamento piorou sensivelmente. Observou-se a olho nu a presença de fungos sobre os frutos dando um aspecto de “mofado”. A contaminação por OTA das análises está sendo realizada para ambos os experimentos.

**TABELA 1:** Percentagem de grãos colonizados por *Aspergillus ochraceus* (AOC), *A. niger* (ANI), *Fusarium* spp. (FUS), *Cladosporium cladosporioides* (CCL) e *Penicillium* spp. (PEN), obtidos de frutos analisados imediatamente após a colheita e após a secagem em terreiro em 0, 30 e 60 dias após o ponto ideal de colheita em duas áreas, próximo ao lago e no topo do morro. (Lavras MG, 2004)

<b>Análise imediatamente após a colheita - Comunidade interna</b>							
Área	Dias após o ponto ideal de colheita	Fungos (% de grãos colonizados)					
		AOC	ANI	FUS	CCL	PEN	
MORRO	0	0.00	8.34	49.02	44.13	16.45	
	30	3.33	1.67	32.50	35.83	99.58	
	60	2.50	0.00	50.00	15.42	42.50	
LAGO	0	0.00	0.83	55.83	25.83	6.25	
	30	1.25	1.25	62.08	86.67	100.00	
	60	8.75	1.25	44.17	19.58	44.58	

<b>Análise após a secagem em terreiro - Comunidade interna</b>							
Área	Dias após o ponto ideal de colheita	Fungos (% de grãos colonizados)					
		AOC	ANI	FUS	CCL	PEN	
MORRO	0	7.92	5.92	6.35	10.06	20.66	
	30	11.99	0.79	20.29	4.06	33.59	
	60	2.50	0.00	28.33	4.17	14.58	
LAGO	0	0.83	2.94	14.30	5.47	24.02	
	30	16.66	0.38	27.24	13.63	18.66	
	60	0.83	1.25	30.00	2.08	6.67	

**TABELA 2:** Unidades formadoras de colônia de *Aspergillus ochraceus* (AOC), *A. niger* (ANI), *Fusarium* spp. (FUS), *Cladosporium cladosporioides* (CCL) e *Penicillium* spp. (PEN) presentes em cascas de frutos analisados imediatamente após a colheita e após a secagem em terreiro em 0, 30 e 60 dias após o ponto ideal de colheita em duas áreas, próximo ao lago e no topo do morro. (Lavras MG, 2004)

<b>Análise imediatamente após a colheita - comunidade externa mais mesocarpo</b>						
Área	Dias após o ponto ideal de colheita	Fungos (UFC/casca)				
		LEV	AOC	PEN	FUS	CCL
MORRO	0	4177	0	180	187	237
	30	10475	0	2950	21900	9600
	60	8050	150	2300	8350	9800
LAGO	0	4898	0	52	82	277
	30	62375	0	3150	8325	10900
	60	13800	75	4375	2000	6925

<b>Análise após a secagem no terreiro - comunidade externa mais mesocarpo</b>						
Área	Dias após o ponto ideal de colheita	Fungos (UFC/casca)				
		LEV	AOC	PEN	FUS	CCL
MORRO	0	41	25	336	221	28
	30	2715	0	465	1307	1002
	60	1475	0	25	2050	7125
LAGO	0	46	15	90	753	109
	30	4600	75	1000	4650	2075
	60	500	0	0	1850	3425

**TABELA 3:** Proporção de frutos verdes, cereja e bóia, colhidos a 0, 30 e 60 dias após o ponto ideal de colheita em duas áreas.

Área	% de frutos			
	Dias após o ponto ideal de colheita	Verde	Cereja	Bóia
LAGO	0	16.44	50.87	32.69
	30	2.76	27.63	69.62
	60	0.00	2.41	97.59
MORRO	0	7.34	69.38	23.27
	30	1.14	51.00	47.87
	60	0.00	2.49	97.51

**TABELA 4:** Umidade de frutos colhidos aos 0, 30 e 60 dias após o ponto ideal de colheita, colhidos em duas áreas.

Área	Dias após o ponto ideal de colheita					
	0		30		60	
	U %	Aw	U %	Aw	U %	Aw
LAGO	60.4	0.909	19.8	0.825	12.5	0.671
MORRO	61.3	0.893	19.7	0.804	11.5	0.581

**TABELA 5:** Porcentagem de grãos colonizados por *Aspergillus ochraceus* (AOC), *A. niger* (ANI), *Fusarium* spp. (FUS), *Cladosporium cladosporioides* (CCL) e *Penicillium* spp. (PEN) após o contato com solo por um período variável de 0 até 21 dias. (Lavras MG, 2004)

Dias de contato com solo	Fungos - % de grãos colonizados					
	AOC	ANI	FUS	CCL	PEN	
0	12.06	0.00	1.11	0.56	21.27	
7	81.11	0.00	0.56	0.00	46.11	
14	13.89	6.11	4.44	18.33	20.00	
21	18.33	8.89	15.00	18.33	36.11	

### Conclusões

Pode-se observar que a permanência prolongada do fruto aderido à planta após o ponto de ideal de colheita ou em contato com o solo podem influenciar diretamente na carga microbiana dos frutos e grãos. A colonização por *Aspergillus ochraceus* aumentou em muitas situações, indicando um risco real à segurança do produto. Como a ocorrência de cafés que secam na planta e dos cafés de varrição é generalizada nas regiões produtoras, como foi constatado nos anos anteriores, deve-se buscar estratégias alternativas que permitam reduzir a parcela destes tipos de café, como a colheita seletiva ou uma destinação não alimentícia, no caso dos cafés de varrição.

### Bibliografia

Abarca, M.L.; Accensi, F.; Bragulat, M.R.; Cabanes, F.J.; (2001) Current importance of ochratoxin A-producing *Aspergillus* spp. J Food Prot. 64(6):903-906. Review.

Batista, L.R.; Chalfoun, S.M.; Prado, G.; Schwan, R.F.; Wheals, A.E. (2003) Toxigenic fungi associated with processed (green) coffee beans (*Coffea arabica* L.) Int J Food Microbiol. 25;85(3):293-300.

Bucheli, P.; Taniwaki, M.H. (2002) Research on the origin, and on the impact of post-harvest handling and manufacturing on the presence of ochratoxin A in coffee. Food Addit Contam. 19(7):655-665. Review.

IARC,(1993) Ochratoxin A. A monographs on the Evaluatium of Carcinogenic Risk to humans.. Lyon france, IARC Workinug grop, World Health Organization. Pp. 250-277.

Northolt, M.D.;Bullerman, L.B. (1982) Prevention of Mold Growth and toxin production through Control of Enviromental Conditions. Journal of food prot. 45:519-526.

Pereira, R.T.G.; Frank, J.M.; Matos, E.R.; Pfenning, L.H. (2004) Fungos associados a frutos e grãos do cafeeiro em diferentes fases do processamento. Anais IV Congresso Brasileiro de Micologia. Ouro Preto MG. p.29.

Pfohi-Leszkowicz, A.; Petkova-Bocharova, T.; Chernozemsky, I.N.; Castagnaros, M. Balkan (2002) endemic nephropathy and associated urinary tract tumours: a review on aetiological cause and the potential role of mycotoxins. *Food Additives and Contaminants*.19(3): 282-302.

Samson, R.A., Hoekstra, E.S., Frisvad, J.C.; Filtenborg, O. (2000) *Introduction to food and air-borne fungi*. 6<sup>th</sup>. Ed. CBS, Baarn, The Netherlands. 389 pp.

Taniwaki M.H.; Pitt J.I.; Teixeira, A.A.; Iamanaka, B.T. (2003) The source of ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to processing methods. *Int J Food Microbiol*. 25;82(2):173-9.