

INCIDÊNCIA DE OCHRATOXINA A EM DIFERENTES FRAÇÕES DO CAFÉ (*Coffea arabica* L.): BÓIA, MISTURA E VARRIÇÃO APÓS SECAGEM EM TERREIROS DE TERRA, ASFALTO E CIMENTO

Incidence of ochratoxin A in fraction diferents coffee beans (*Coffea Arabica* L): “boia”, mixes and “varrição”

Luís Roberto Batista¹, Sara Maria Chalfoun²

RESUMO

A incidência de ocratoxina A foi estudada em café mistura, bóia e varrição secas em três tipos de terreiro: terra, cimento e asfalto. Foram analisadas 238 amostras coletadas em 11 municípios da região sul do Estado de Minas Gerais, sendo 35 bóia, 97 - mistura e 106 varrição. Das amostras analisadas, em 40% não foi detectada a presença de ocratoxina A, em 31%, foram detectadas a presença de ocratoxina A em níveis que variaram de 0,1 a 5,0 µg/Kg de café. Estes resultados demonstram que 169 amostras (71%) analisadas estariam dentro dos limites em estudo da Legislação Européia que regulamenta a concentração máxima de ocratoxina A em grãos de café torrado. As espécies de *Aspergillus* identificadas como produtoras de ocratoxina A foram *Aspergillus ochraceus*, *A. sclerotiorum* e *A. sulphureus*. Os níveis de contaminação de ocratoxina A em grãos de café foram maiores na fração varrição e nas frações bóia e mistura, secas em terreiro de terra. Os resultados deste estudo concluem que o terreiro de terra aumenta o risco de contaminação com ocratoxina A em grãos de café. A fração varrição devido aos riscos de exposição a ocratoxina A, deve ser reduzida através da adoção de boas práticas agrícolas e não ser utilizada para fins de consumo humano e animal.

Termos para indexação: Café, ocratoxina A, *Aspergillus*.

ABSTRACT

The ochratoxin incidence was studied in coffee it mixes, it “bóia” and “varrição” dry in three yard types: earth, cement and asphalt. 238 samples were analyzed collected in 11 municipal districts of the south of Minas Gerais state, being 35 “bóia”, 97 - it mixes and 106 varrição. Of the analyzed samples, in 40% the ochratoxin A presence it was not detected, in 74 samples, 31%, ochratoxin A presence were detected the in levels that varied from 0,1 to 5,0 µg/Kg of coffee beans. These results demonstrate that in 169 samples (71%) analyzed they would be inside of the limits in study of the European Legislation that regulates the maximum concentration of ochratoxin A in coffee beans toasted. The species of identified *Aspergillus* as producing of ochratoxin A were *Aspergillus ochraceus*, *A. sclerotiorum* and *A. sulphureus*. The ochratoxin A concentration levels in coffee beans was larger in the fraction varrição and in the fractions bóia and it mixes, droughts in earth yard. The results of this study conclude that the earth yard increases the risk of contamination with ochratoxin A in coffee beans. The fraction varrição due to the exhibition risks the ochratoxin A, it should be reduced through the adoption of good agricultural practices and not to be used for ends of human and animal consumption.

Index terms: Coffee, ochratoxin A, *Aspergillus*.

(Recebido em 3 de junho de 2005 e aprovado em 5 de julho de 2006)

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de microrganismos particularmente os fungos é um dos mais sérios responsáveis pelas perdas pós-colheita, sendo que o desenvolvimento dos fungos pode ser acompanhado pela produção de micotoxinas (AIDOO, 1993). As micotoxinas são metabólitos secundários de fungos filamentosos, e são tóxicas ao homem e animais mesmo em pequenas concentrações (PITT, 2000).

Como nas demais culturas, os frutos e grãos de café estão sujeitos à contaminação e conseqüentemente a colonização de microrganismos durante todas as fases de desenvolvimento, colheita, preparo, transporte e

armazenamento (BATISTA et al., 2003). Vários gêneros de fungos ocorrem sobre os frutos do cafeeiro, desde o campo até o armazenamento, entre eles espécies de *Aspergillus*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Eurotium*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Trichoderma*, *Walleimia* e outros (BUCHELI et al., 1998; CARVALHO et al., 1997; CHALFOUN & BATISTA, 2003; JOOSTEN et al., 2001; PRADO et al., 2004). Dentre estes gêneros estão os principais responsáveis pela presença de micotoxinas em produtos agrícolas que são: *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* (CAST, 2003). Entretanto, o tipo e a quantidade de micotoxinas que um fungo produz, depende dos parâmetros ecológicos e de processamento de um produto

¹Químico, Professor Dr. em Microbiologia/Higiene de Alimentos no Departamento de Ciência dos Alimentos/DCA da Universidade Federal de Lavras/UFLA – Cx. P. 3037 – 37200-000 – Lavras, MG – luisrb@ufla.br

²Engenheira Agrônoma, Dra. Pesquisadora da EPAMIG/CTSM–EcoCentro – Cx. P. 176 – 37200-000 – Lavras, MG – chalfoun@ufla.br

particular (FILTENBORG et al., 1996). A prevenção da deterioração fúngica e produção de micotoxinas em café só ocorrem com sucesso quando as espécies e os pontos críticos do pré-processamento são conhecidos.

A principal micotoxina estudada em café é a ocratoxina A, e sua presença tem sido atribuída principalmente ao fungo *Aspergillus ochraceus* e espécies relacionadas, *Aspergillus carbonarius* e raramente por *Aspergillus niger* (CHALFOUN & BATISTA, 2003; JOOSTEN et al., 2001; PRADO et al., 2004; SUÁREZ-QUIROZ et al., 2004a; URBANO et al., 2001).

Os tipos de amostras de café analisadas podem ser responsáveis pelos níveis variados de ocratoxina A em café. Isto pode ser observado no primeiro estudo sobre ocratoxina A em grãos de café realizado por Levi et al. (1974). Os níveis de contaminação variaram de traços a 360µg/Kg, sendo que os níveis mais elevados foram em amostras visualmente deterioradas, demonstrando assim que os tipos de amostras podem apresentar níveis variáveis de ocratoxina A. Desde então vários estudos têm sido realizados, em diferentes tipos de café sendo detectados diferentes níveis de contaminação (BATISTA et al., 2003; CANTÁFORA et al., 1983; LEONI et al., 2001; MORAES & LUCHESE, 2003; NAKAJIMA et al., 1997; PASIN & ABREU, 2000; PRADO et al., 2004; ROBLEDO et al., 2001; ROMANI et al., 2000; TANIWAKI et al., 2003).

Devido às suas propriedades hepatóxica, nefrotóxica, carcinogênica e imunossupressiva para animais, e possivelmente, para humanos (SMITH & ROSS, 1991; XIAO et al., 1996), vários países têm elaborado legislações que permitem a concentração máxima de ocratoxina A em produtos agrícolas e derivados. Estes limites têm por finalidade assegurar a integridade da saúde da população destes países, não expondo assim os consumidores aos efeitos tóxicos causados pela ocratoxina A.

O limite máximo de ocratoxina A para cereais (5,0µg/Kg) e seus subprodutos (3,0µg/Kg) tem sido estabelecido pela Comissão de Regulamentação da União Européia EC n. 472 (EUROPEAN COMMUNITY, 2002). A Comunidade Européia tende a estabelecer um limite de 5µg/Kg para grãos de café torrado e moído e 10µg/Kg para café solúvel e estes limites têm previsão para entrar em vigor em 30 de junho de 2006, sendo que até o final de 2004 foi finalizado o estudo sobre a toxicidade da ocratoxina A (VERSTRATE, 2004).

A secagem é uma das etapas mais importantes para a preservação da qualidade do café. Segundo Bucheli & Taniwaki (2002), a secagem também é uma das rotas de contaminação de ocratoxina A. Para Cortez (2001), é

indispensável que o café colhido seja preparado o mais rápido possível e submetido à secagem para evitar os processos fermentativos e prejuízos a qualidade do café. Dessa forma, é fundamental um manejo correto pós-colheita, em particular quanto ao tempo de exposição a microrganismos, os quais iniciam a infecção na planta e persistem após a colheita, e no período de secagem.

O fungo *A. ochraceus* é capaz de se desenvolver em uma grande faixa de temperatura de 8 a 30°C, sendo que a temperatura ótima de crescimento varia de 25 a 30°C e em atividade de água mínima para o seu desenvolvimento é de 0,76; já para a produção de ocratoxina A a atividade de mínima é de 0,85 com a faixa ótima variando de 0,95-0,99 (BARS & BARS, 2000; ICMSF, 1996; SUÁREZ-QUIROZ et al., 2004b). Extrapolando estes dados para os frutos e grãos de café, a produção de ocratoxina A ocorre quando o produto apresenta um valor de umidade acima de 20% na base seca (BARS & BARS, 2000), a uma atividade de água de 0,80 os grãos de café estão protegidos do desenvolvimento de *A. ochraceus* e síntese de ocratoxina A (SUÁREZ-QUIROZ et al., 2004b).

As condições de secagem, o manejo da secagem, a presença de microrganismos produtores de ocratoxina A e aliadas as condições geográficas e climáticas da área produtora, são mais importantes na geração de ocratoxina A em grãos de café do que o método de secagem (BUCHELI et al., 2000).

Este estudo teve como objetivo avaliar a incidência de ocratoxina A em amostras de grãos de café secas em terreiro de asfalto, cimento e terra.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

As frações estudadas constituíram-se de fração bóia (35), mistura (97) e de varrição (106), foram coletadas em 11 municípios do Estado de Minas Gerais: Boa Esperança, Campestre, Campos Gerais, Carmo do Rio Claro, Cássia, Guaxupé, Machado, Monte Santo de Minas, Poços de Caldas, Pratinha, e São Sebastião do Paraíso. Em 106 amostras, foram realizadas análises micológica sendo 17 da fração bóia, 45 da fração mistura e 44 da fração varrição.

Isolamento e identificação dos fungos

Para o isolamento dos fungos associados a grãos de café beneficiado, foi utilizada a técnica de plaqueamento direto em meio de cultura DG18 (Glucose 10 g; Peptona 5,0 g, KH₂PO₄ 1,0 g; MgSO₄.7H₂O 0,5 g; Glicerol 178,0 g; Agar 15,0 g; Cloranfenicol 100,0 mg; Água destilada 1L e Dicloran

1mL de uma solução 0,2% peso/volume em etanol), conforme Pereira et al. (2003).

Identificação de fungos filamentosos do gênero *Aspergillus*

A partir das culturas puras as espécies do gênero *Aspergillus* Seção *Circundati* foram identificadas de acordo com Christensen (1981), as espécies da Seção *Flavi* de acordo com Christensen (1982), as espécies da Seção *Nigri*, *Nidulantes*, *Fumigati*, *Versicolores* e *Usti* foram identificadas de acordo com Klich (2002), sendo estas identificações amparadas por Pitt & Hocking (1997), Raper & Fennell (1965) e Sansom et al. (2000).

Todos os isolados foram incubados em meio CYA – Czapek Yeast Agar (K_2HPO_4 1.0 g; Concentrado Czapek 10.0 mL; Extrato de Levedura, 5.0 g, Agar 15.0 g, Água Destilada 1Litro; Concentrado Czapek $NaNO_3$ 30.0g, KCl 5.0g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 5.0g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1g, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1g, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.05g, Água Destilada 100 mL) e MEA (Extrato de Malte 20.0 g, Peptona 1.0 g, Glucose 30.0 g, Agar 20 g, Água Destilada 1 Litro) a 25°C e CYA a 37°C e após 7 dias de incubação foram observadas as características microscópicas e macroscópicas descritas por Klich (2002).

Determinação da produção de ocratoxina A por fungos pelo método Plug Agar.

Os isolados testados foram inoculados em meio YES – *Yeast Extract Sucrose* Agar (Extrato de Levedura – 20.0 g, Sacarose – 150.0 g, Agar – 20.0 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0.5g, Água Destilada – 1 Litro) com solução metálica por 7 dias a 25 – 26 °C (FILTENBORG & FRISVAD, 1980). Foi utilizado uma padrão de ocratoxina A (Sigma-Aldrich), Placas de Cromatografia de Camada Delgada (Merk-Sílica Gel 60, 20x20) e como Fase móvel TEF-Tolueno Acetato de Etila e Ácido Fórmico 90% (50:40:10).

Após a eluição, as placas foram secas em capela pelo fluxo de ar. A confirmação quanto à produção das micotoxinas foi feita em luz ultravioleta com 366 nm em cromatovisor CAMAG (UF-BETRACHTER). Os isolados considerados como produtores de ocratoxina A apresentaram um RF (fator de retenção) e um spot de fluorescência semelhante ao do padrão da ocratoxina A.

Análise de Ocratoxina A em Grãos de Café

As análises de ocratoxina A foram realizadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) no Laboratório de Controle de Qualidade e Segurança Alimentar/LACQSA em Belo Horizonte, conforme publicado no Diário Oficial da União n.62, Seção 1, p.37 de

30 de março de 2000. A metodologia fundamenta-se na extração da ocratoxina A com solução de metanol:bicarbonato de sódio a 3% (1:1, v/v), purificação do extrato com coluna de imunoafinidade (Ochratest-Vicam), separação e quantificação da ocratoxina A em cromatografo líquido em coluna Shimpack C18 CLC ODS (M) 250 x 4,6 mm, como fase móvel acetonitrila:metanol:água:ácido acético (35:35:29:1, v/v/v/v) com fluxo de 0,8 mL/mim, detector de fluorescência com excitação em 332 nm e emissão em 476nm. O limite de detecção do método é de 0,12µg/Kg e o limite de quantificação é de 0,20 µg/Kg.

Análises Estatísticas

Em relação às análises de comparação das frações bóia, mistura e varrição versus tipo de terreiro (cimento, terra e asfalto) realizou-se intervalos de confiança para diferença entre duas proporções com o nível de significância fixado em 5%. Importante salientar que essas comparações foram feitas considerando a proteção de bonferroni para manter o nível de significância global. Os resultados foram apresentados semelhantemente ao teste de Tukey com a disposição das letras.

Para realização das metodologias estatísticas mencionadas nesse trabalho utilizou-se o *software* MINITAB 13.20.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Fungos produtores de ocratoxina A em grãos de café: Das amostras analisadas quanto à presença de fungos do gênero *Aspergillus* seção *Circundati* foi observado que em 29,41% das amostras de café bóia, foi detectada a presença deste grupo de fungos, nas amostras de café mistura a contaminação foi de 24,44% e nas amostras de varrição a contaminação com fungos da Seção *Circundati* foi de 72,73%

Das espécies da seção *Circundati*, *A. ochraceus* foi a mais comum representando cerca de 91,81% das espécies da seção *Circundati* tem sido identificada em frutos e grãos de café em outros estudos (BATISTA et al., 2003; NASSER, 2001; PASIN & ABREY, 2000; PEREIRA, 2002; SILVA, 2004; SILVA et al., 2000; SUÁREZ-QUIROZ et al., 2004b) as demais espécies também já foram identificadas em café como o *A. melleus* (BATISTA et al., 2001), *A. sulphureus* (BATISTA et al., 2001; NASSER, 2001) e *A. sclerotiorum* (BATISTA et al., 2001; NASSER, 2001; PEREIRA, 2002).

Conforme resultados descritos na Tabela 1, 85,45% das espécies do gênero *Aspergillus* seção *Circundati* foram produtores de ocratoxina A. Os resultados são

próximos dos obtidos por Batista et al. (2003) que identificaram 74,6% das espécies da seção *Circumdati* como produtoras de ocratoxina A. A produção de ocratoxina A por espécies da Seção *Circumdati* parece ser comum (HESSELTINE et al., 1972) e tais espécies são importantes economicamente devido à produção de ocratoxina A (VARGA et al., 2003).

A maioria dos isolados de *A. ochraceus* (90,09%) foi produtora de ocratoxina A. Resultados semelhantes foram observados por Batista et al. (2003), Nasser (2001), Taniwaki et al. (2003) e Urbano et al. (2001), que detectaram 66,60; 75,00; 77,77 e 88,10% de *A. ochraceus* produtores de ocratoxina A.

Outras espécies identificadas, porém não produtoras de ocratoxina A, *A. flavus*, *A. tamarii*, *A. ustus*, *A. fumigatus*, *A. nidulans*, *Eurotium amstelodami*, *Fusarium lateritium*, *Cladosporium cladosporioides*, *Penicillium brevicompactum*, *P. citrinum*, *P. commune*, *P. minioluteum*, *P. variable*, *P. expansum* e *P. corylophilum*.

Ocratoxina A em grãos de café: Conforme Tabela 2, das 238 amostras analisadas, em 95 (39,91%) não foi detectada a presença de ocratoxina A, em 74 amostras (31,09%), foram detectadas a presença de ocratoxina A em níveis que variaram de 0,1 a 5,0 µg/Kg de café. Estes resultados demonstram que 169 amostras (71,00%) analisadas estariam dentro dos limites em estudo da Legislação Européia que regula a concentração máxima de ocratoxina A em grãos de café torrado.

Pela Tabela 2, observa-se que 42,86% das amostras de café bóia analisadas não apresentaram contaminação com ocratoxina A, 22,88% apresentaram contaminação entre 0,1 e 5,0 µg/Kg e 34,28% das amostras apresentaram níveis de contaminação superior a 5 µg/Kg. Os resultados confirmam que esta fração apresenta um maior risco de

contaminação por conter entre outros, frutos mal formados e injuriados (insetos, doenças, agentes de clima, etc), que encontram mais expostos as alterações climáticas na lavoura e a contaminação durante todo o ciclo produtivo e de pré-processamento do café.

As espécies produtoras de ocratoxina, como *A. ochraceus*, principal espécie ocratoxingênica identificada neste estudo, não é considerada como fitopatogênica, nem endofítica, e sim saprófitas oportunistas (BARS & BARS, 2000). Portanto, a presença de ocratoxina em café bóia pode ser consequência da colonização dos fungos produtores de ocratoxina A em frutos susceptíveis à contaminação ou danificados por insetos, fungos patogênicos, ácaros e/ou condições climáticas adversas como geadas, chuvas de granizo. Outra explicação seria o fato da ocorrência de ruptura de estruturas da parede celular por modificações nas pectinas, celulose, hemicelulose e lignina nos frutos bóia (CARVALHO & CHALFOUN, 1985), estes compostos dão uma estrutura mais rígida aos frutos de café, sendo que a degradação natural destes compostos torna os frutos mais susceptíveis à contaminação com fungos toxigênicos. Segundo Bucheli & Taniwaki (2002), os frutos que passam do estágio ideal de maturação e que secam na árvore do cafeeiro tornam um potencial substrato para o desenvolvimento de fungos produtores de ocratoxina A.

Durante o período de senescência dos frutos as condições climáticas associadas com a presença de microrganismos podem estar favorecendo o desenvolvimento dos fungos e a síntese de ocratoxina ainda na lavoura, podendo ter ocorrido também uma contaminação com fungos ocratoxingênicos ainda na lavoura e a síntese de ocratoxina ter ocorrido no período de secagem, sendo esta situação dependente também do tipo de terreiro, tempo e condições de secagem.

TABELA 1 – Resultado dos testes de avaliação do potencial toxigênico das espécies de *Aspergillus* identificadas.

Espécie do gênero <i>Aspergillus</i>	Número de isolados testados	Isolados produtores de ocratoxina A
Seção <i>Circindati</i>		
<i>A. ochraceus</i>	101	91 (90,1%)
<i>A. melleus</i>	02	00
<i>A. sulphureus</i>	04	01
<i>A. sclerotiorum</i>	03	02
Total Seção <i>Circumdati</i>	110	94 (85,45%)
Seção <i>Nigri</i>		
<i>A. niger</i>	28	00
<i>A. foetidus</i>	15	00

TABELA 2 – Níveis de contaminação de ocratoxina A em amostras de grãos de café bóia, mistura e varrição.

Níveis de contaminação	Bóia	Mistura	Varrição	Porcentagem no total de amostras
0,0 - 0,0 n/d	15 (42,86%)	56 (57,73%)	24 (22,64%)	95 (39,91%)
0,1 - 5,0	8 (22,86%)	29 (29,90%)	37 (34,91%)	74 (31,09%)
5,1 - 10,0	6 (17,14%)	3 (3,09%)	15 (14,15%)	24 (10,08%)
10,1 - 20,0	2 (5,71%)	3 (3,09%)	16 (15,09%)	21 (8,82%)
20,1 - 50,0	0	6 (6,19%)	7 (6,60%)	13 (5,47%)
50,1 - 100,0	4 (11,43%)	0	5 (4,72%)	9 (3,79%)
> 100,00	0	0	2 (1,89%)	2 (0,84%)
Total	35 (100%)	97 (100%)	106 (100%)	238 (100%)

Os resultados de contaminação das amostras de café de varrição, em apenas 22,64% das amostras não foi detectado a presença de ocratoxina A, na grande maioria 77,36% foi detectada a presença de ocratoxina A, sendo que duas amostras apresentaram níveis superiores a 100µg/Kg de grãos de café. O café de varrição além de apresentar um maior número de amostras contaminadas, apresenta também os valores mais elevados. Resultados semelhantes foram observados por Moraes et al. (2002), sendo que a maior incidência de amostras contaminadas foi de varrição.

A presença de ocratoxina A em café de varrição é maior em frequência dos níveis e valores médios, isto se deve em grande parte ao tempo em que os frutos ficam em contato com o solo. O solo é o habitat natural dos fungos produtores de ocratoxina A identificados neste estudo, além de que, em contato com o solo, o período de secagem destes frutos será maior devido à umidade do solo, ficando assim os frutos mais tempo em condições favoráveis a colonização e síntese de ocratoxina A.

A presença de materiais de baixa qualidade, tais como frutos danificados e com casca, é um dos mais prováveis de uma série de parâmetros que contribuem para a presença de ocratoxina A em café (BUCHELI et al., 2000). A quantidade de defeitos gerados em uma propriedade pode influenciar a concentração de ocratoxina A (BUCHELI et al., 1998), quanto maior o número de defeitos maior o risco da presença de ocratoxina A em café. Carvalho & Chalfoun (1985) observaram que o maior número de defeitos como ardido, preto e verde estavam em frutos que foram coletados no chão.

A parcela varrição é reconhecidamente a mais comprometida em termos de quantidade de microrganismos considerados indesejáveis para a qualidade do café, de qualidade organoléptica e de segurança (contaminação por

ocratoxina A). Ressalta-se que, em virtude da natureza das informações não podemos afirmar o período em que os frutos permaneceram em contato com o solo.

Em 57,72% das amostras de café mistura não foi detectado a presença de ocratoxina A, em 29,40% foi detectado níveis entre 0,1 e 5,0µg/Kg, 12,38% das amostras apresentou contaminação acima de 5,0 µg/Kg sendo que 6 amostras 6,18% apresentaram contaminação elevada entre 20,1 – 50,0 µg/Kg de grãos de café. A fração mistura também apresenta um fator de risco, uma vez que contem frutos que seriam separados pelo processamento hidráulico, dando origem ao café bóia (uma parcela que apresenta um risco maior para a presença de ocratoxina A). Sendo assim, a presença de ocratoxina A no café mistura pode ser devido à presença de frutos que dariam origem a fração bóia. Ainda assim, a fração mistura apresentou 87,20% das amostras dentro dos limites propostos pela União Européia.

As condições de secagem também podem contribuir para a presença de ocratoxina A, pois os frutos ficam mais tempo no terreiro, devido à desuniformidade de maturação dos frutos e conseqüentemente dos níveis de umidade, e dependendo das condições de secagem (tipo de terreiro e clima) e com carga microbiana incluindo fungos produtores de ocratoxina A, criar-se-ia um ambiente favorável à síntese de ocratoxina A.

Contaminação com ocratoxina A em grãos de café x tipo de terreiro: Conforme Tabela 3, as amostras de café bóia com níveis de contaminação acima de 20µg/Kg foram secas em terreiro de terra. Os resultados da Tabela 3 indicam também que para as amostras de café bóia o terreiro de asfalto apresentou menos risco do que em terreiro de terra, provavelmente, quando as amostras de café bóia, após saírem do lavador ainda úmidas, se colocadas em contato com o terreiro de terra favorece a infecção e a síntese de

ocratoxina A por parte dos fungos ocratoxigênicos, condições que é menos favorecida em terreiro de asfalto. Uma vez que, o solo parece ser a principal fonte de fungos ocratoxigênicos (FRANK, 1999).

Conforme os resultados observados na Tabela 4, para as amostras de café de varrição, praticamente não houve diferença significativa entre os tipos de terreiro para as amostras contaminadas acima de 5,0µg/Kg. Estes resultados sugerem que as amostras do tipo varrição já chegam no terreiro com um grau de infecção de fungos toxigênicos ou mesmo de ocratoxina A, que independente do terreiro utilizado não haverá melhora do produto, podendo ser agravada se a amostra não for seca de forma adequada. Resultado semelhante é observado nas amostras com níveis de contaminação entre 0,1 e 5,0µg/Kg onde não houve diferença entre os terreiros de terra e de cimento.

De acordo com os resultados observados na Tabela 5, a maior parte das amostras de café do tipo mistura foram secas em terreiro de asfalto, demonstram também uma diferença significativa entre os tipos de terreiro de asfalto e de terra, sendo que o terreiro de terra apresenta um maior número de amostras contaminadas nos níveis de contaminação entre 5,1 a 20,0µg/Kg e entre os níveis de contaminação de 20,01 a > 100,00µg/Kg do que as amostras secas em terreiro de asfalto.

Moraes & Luchese (2003) também observaram uma maior concentração de ocratoxina A em amostras de café

secas em terreiro de terra do que as amostras secas em terreiro de cimento, de acordo com as autoras o tipo de terreiro é importante na prevenção da contaminação com ocratoxina A, sendo o terreiro de terra mais favorável a contaminação. Diferentemente Bucheli et al. (2000) observaram que a presença de ocratoxina A foi menor em café seco em terreiro de terra (1,4µg/Kg) do que em terreiro de concreto (4,3µg/Kg). Entretanto, o autor afirma que a qualidade dos frutos do café, as condições climáticas durante a secagem, o procedimento de secagem, o inóculo de fungos produtores de ocratoxina A e as condições do local da propriedade são sem dúvida mais importante do que o tipo de secagem.

As condições e localização do terreiro que favoreçam uma secagem rápida, são fundamentais para evitar o desenvolvimento de fungos produtores de ocratoxina A. Segundo Bucheli et al. (2000), a formação de ocratoxina A ocorre nos primeiros dias de secagem dos frutos de café.

O tempo de secagem é muito importante uma vez que a produção de ocratoxina A que ocorre em café com atividade de água de 0,85 a 0,99 foi observada em um período médio de 5 a 7 dias e a 0,99 de 2 a 4 dias (SUÁREZ-QUIRÓZ et al., 2004a); conseqüentemente para reduzir o risco da presença de ocratoxina A são necessárias técnicas que visem reduzir a atividade de água para níveis inferiores aos que possibilitam a ocorrência da ocratoxigenese.

TABELA 3 – Análise das proporções entre as amostras Bóia e Tipo de Terreiro.

Amostra	Tipo de Terreiro		
	Asfalto	Terra	Cimento
(0,1-5,0 µg/Kg)	21aA	01aB	1B
(5,1-20,0 µg/Kg)	07 bA	01aB	0
(20,1-> 100,0 µg/Kg)	00 cA	04bB	0

Letras minúsculas indicam comparações das proporções para as amostras (Bóias 1,2 e 3).

Letras maiúsculas indicam comparações das proporções para o tipo de terreiro (A, B, C).

TABELA 4 – Análise das proporções entre as amostras Varrição e Tipo de Terreiro.

Amostra	Tipo de Terreiro		
	Asfalto	Terra	Cimento
(0,1-5,0 µg/Kg)	35aA	15aB	9aB
(5,1-20,0 µg/Kg)	11bA	11aA	9aA
(20,1->100,0 µg/Kg)	07bA	06aA	1bB

Letras minúsculas indicam comparações das proporções para as amostras (Varrição 1,2 e 3).

Letras maiúsculas indicam comparações das proporções para o tipo de terreiro (A, B, C).

TABELA 5 – Análise das proporções entre as amostras Mistura e Tipo de Terreiro.

Amostra	Terra	Terreiro	
		Asfalto	Cimento
(0,1-5,0 µg/Kg)	14aA	68aB	1C
(5,1-20,0 µg/Kg)	5bA	1bB	0
(20,1->100,0 µg/Kg)	5bA	1bB	0

Letras minúsculas indicam comparações das proporções para as amostras (Mistura 1,2 e 3).

Letras maiúsculas indicam comparações das proporções para o tipo de terreiro (A, B, C).

As condições que são apontadas como pontos críticos pelo APPCC da cultura do café, como as frações varrição e bóia e a secagem em terreiro de terra são fatores, que, a partir deste estudo, apresentam um maior risco de contaminação com ocratoxina A.

Estes resultados demonstram que a Adoção de Boas Práticas de Cultivo e de Colheita, visando a redução da fração bóia e da fração varrição, bem como a separação hidráulica dos frutos colhidos por derriça (fração mistura) e a secagem em terreiro adequadamente revestido são condições que irão favorecer a qualidade do café e reduzir significativamente o risco da presença de ocratoxina A em grãos de café.

CONCLUSÕES

Forma identificadas 3 espécies de fungos do gênero *Aspergillus* produtoras de ocratoxina A, *A. ochraceus*, *A. sulphureus* e *A. sclerotiorum*. A maioria dos isolados de *A. ochraceus* (90%) foi produtora de ocratoxina A.

A fração varrição apresentou os níveis mais elevados de contaminação com ocratoxina A, tendo 14 amostras com níveis acima de 20µg/Kg.

A maioria das amostras de café mistura (87,63%) e bóia (65,72%) apresentaram níveis de contaminação com ocratoxina A abaixo de 5µg/Kg. As frações bóia e mistura apresentaram níveis mais elevados de contaminação com ocratoxina A quando foram secas em terreiro de terra do que em terreiro de asfalto.

A fração varrição, independente do tipo de terreiro (asfalto, terra ou cimento) não houve uma relação com os níveis de contaminação como ocratoxina A, tais resultados sugerem que as amostras do tipo varrição já chegam no terreiro com um grau de infecção de fungos toxigênicos ou mesmo de ocratoxina A que independente do terreiro utilizado não haverá melhora do produto, podendo ser agravada se a amostra não for seca de forma adequada

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIDOO, K. E. Post-harvest stored and preservation of tropical crops. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Oxford, v. 32, n. 5, p. 161-173, Oct. 1993.
- BARS, L. L.; BARS, P. L. Mycotoxigenic in grains application to mycotoxic prevention in coffee. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL SOBRE BIOTECNOLOGIA NA AGROINDÚSTRIA CAFEJEIRA, 3., 2000, Londrina. **Anais...** Londrina: IAPAR/IRD, 2000. p. 513.
- BATISTA, L. R.; CHALFOUN, S. M.; PRADO, G. Identificação de espécies toxigênicas de *Aspergillus* associadas aos grãos de café armazenados. **Revista Brasileira de Armazenamento**, Viçosa, n. 3, p. 11-16, 2001. Especial café.
- 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**, Amsterdam, v. 85, n. 3, p. 293-300, Aug. 2003.
- BUCHELI, P.; MEYER, I.; PITTET, A.; VUATAZ, G.; VIANI, R. Development of ochratoxin A during robusta (*Coffea canephora*) coffee cherry drying. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 48, n. 4, p. 1358-1362, Apr. 2000.
- BUCHELI, P.; MEYER, I.; PITTET, A.; VUATAZ, G.; VIANI, R. Industrial storage of green robusta under tropical conditions and its impact on raw material quality and ochratoxin A content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 46, n. 11, p. 4507-4511, Nov. 1998.

- 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: review. **Food Additives and Contaminants**, Oxford, v. 19, n. 7, p. 655-665, July 2002.
- CANTÁFORA, A.; GROSSI, M.; MIRAGLIA, M.; BENELLI, L. Determination of ochratoxin A in coffee beans using reversed-phase high performance liquid chromatography. **La Rivista della Società Italiana di Scienza dell'Alimentazione**, Roma, n. 12, p. 103-108, 1983.
- CARVALHO, V. D.; CHALFOUN, S. M. Aspectos qualitativos do café. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 11, n. 126, p. 79-92, jun. 1985.
- CARVALHO, V. D. de; CHAGAS, S. J. de R.; CHALFOUN, S. M. Fatores que afetam a qualidade do café. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 18, n. 187, p. 5-20, 1997.
- CHALFOUN, S. M.; BATISTA, L. R. **Fungos associados a frutos e grãos de café *Aspergillus* & *Penicillium***. Brasília, DF: Embrapa, 2003. 69 p.
- CHRISTENSEN, M. The *Aspergillus ochraceus* Group: two new species from western soils and a synoptic key. **Mycologia**, Bronx, v. 74, n. 2, p. 210-225, 1982.
- CHRISTENSEN, M. A Synoptic key and evaluation of species in the *Aspergillus flavus* group. **Mycologia**, New York, v. 73, n. 6, p. 1056-1084, Nov./Dec. 1981.
- CORTEZ, J. G. **Efeito de espécies e cultivares e do processamento agrícola e industrial nas características da bebida do café**. 2001. 71 f. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2001.
- COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY. **Mycotoxins: risks in plant, animal, and human systems**. Ames: [s.n.], 2003.
- EUROPEAN COMMUNITY. Commission regulation (EC) 472/2002, amending regulation (EC) 466/2001 setting maximum level for certain contaminants in food stuffs. **Official Journal of the European Communities**, [S.l.], v. L75, p. 18-20, 2002.
- FILTENBORG, O.; FRISVAD, J. C. A simple screening method for toxigenic moulds in pure cultures. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, London, v. 13, p. 128-130, 1980.
- FILTENBORG, O.; FRISVAD, J. C.; THRANE, U. Moulds in food spoilage. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 33, p. 85-102, 1996.
- FRANK, M. Mycotoxin prevention and decontamination HACCP and its mycotoxin control potential: an evaluation of ochratoxin A in coffee production. In: JOINT FAO/WHO/UNEP INTERNATIONAL, 3., 1999, Tunis, Tunisia. **Conference on Mycotoxin...** Tunis: [s.n.], 1999.
- HESELTINE, C. W.; VANDERGRAFT, E. E.; FENNELL, D. I.; SMITH, M. L.; SHOTWELL, O. L. *Aspergillus* ochratoxin producers. **Mycologia**, New York, v. 64, p. 539-550, 1972.
- INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. Toxigenic fungi: *Aspergillus*. In: _____. **Microorganisms in foods: characteristics of food pathogens**. London: Blakie Academic and Professional, 1996. p. 341-381.
- JOOSTEN, H. M. L. J.; GOETZ, J.; PITTET, A.; SCHELLENBERG, M.; BUCHELI, P. Production of ochratoxin A by *Aspergillus carbonarius* on coffee cherries. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 65, n. 1/2, p. 39-44, Apr. 2001.
- KLICH, M. A. **Identification of Common *Aspergillus* species**. The Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultuur, 2002.
- LEONI, L. A. B.; FURLANI, R. P. Z.; VALENTE-SOARES, L. M.; OLIVEIRA, P. L. C. Ochratoxin A in Brazilian green coffee. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 21, n. 1, p. 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 Official Analytical Chemists**, Washington, v. 57, n. 4, p. 866-870, 1974.
- MORAES, M. H. P.; LIMA, E. S.; DIAS, D. P.; SEGGS, J. H.; BOTELHO, A. S.; RAMOS, K. F.; MANOEL, R. M. As condições de preparo em café produzido no estado do Rio de Janeiro como fator na determinação da bebida e na presença de ocratoxina A. In: CONGRESSO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 28., 2002, Caxambu, MG. **Anais...** Caxambu: [s.n.], 2002. p. 389-391.

- MORAES, M. H. P.; LUCHESE, R. H. Ochratoxin A on green coffee: influence of harvest and drying processing procedures. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Washington, v. 51, n. 19, p. 5824-5828, Sept. 2003.
- NAKAJIMA, M.; TSUBOUCHI, H.; MIYABE, M.; UENO, Y. Survey of Aflatoxin B 1 and Ochratoxin A in commercial green coffee beans by high-performance liquid chromatography linked with immunoaffinity chromatography. **Food and Agricultural Immunology**, Oxon, v. 9, n. 2, p. 77-83, June 1997.
- NASSER, P. P. **Influência da separação de grãos de café (*Coffea arabica* L.) por tamanho na qualidade e ocorrência de ocratoxina A**. 2001. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2001.
- PASIN, L. A. A. P.; ABREU, M. S. Fungos associados a grãos crus e ocorrência de ocratoxina A em diferentes cultivares de café. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 1., 2000. **Anais...** [S.l.: s.n.], 2000. p. 1028-1031.
- PEREIRA, R. T. G. **Influência de *Cladosporium cladosporioides* na qualidade da bebida do café**. 2002. 42 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2002.
- PEREIRA, R. T. G.; FRANK, J. M.; PFENNING, L. H. Método para análise de comunidade de fungos associados a frutos e grãos do cafeeiro. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 3., 2003. **Anais...** [S.l.: s.n.], 2003. p. 177-178.
- PITT, J. I. Toxigenic fungi: which are important. **Medical Mycology**, Oxford, v. 38, p. 17-22, 2000. Supplement.
- PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food Spoilage**. 2. ed. Cambridge: Chapman & Hall, 1997. 593 p.
- PRADO, E.; MARÍN, S.; RAMOS, A. J.; SANCHIS, V. Occurrence of ochratoxigenic fungi and ochratoxina A in green coffee from different origins. **Food Science and Technology International**, London, v. 10, n. 1, p. 45-49, Feb. 2004.
- RAPER, K. B.; FENNELL, D. I. **The genus aspergillus**. Baltimore: Williams and Wilkins, 1965.
- ROBLEDO, A. L.; MARÍN, S.; RAMOS, A. J. Contaminación natural con micotoxinas en maíz forrajero y granos de café verde en el Estado de Nayarit (México). **Revista Iberoamericana de Micología**, Barcelona, v. 18, p. 141-144, 2001.
- ROMANI, S.; SACCHETTI, G.; LÓPEZ, C. C.; PINNAVAIA, G. C.; ROSA, M. D. Screening on the occurrence of ochratoxin A in green coffee beans of different origins and types. **Journal Agriculture Food Chemistry**, Washington, v. 48, n. 8, p. 3616-3619, Aug. 2000.
- SAMSON, R. A.; HOEKSTRA, E. S.; FRISVAD, J. C.; FILTENBORG, O. **Introduction to food-borne fungi**. 4. ed. Centraalbureau: Voor Schimmelcultures Baarn Delft, 2000.
- SILVA, C. F. **Sucessão microbiana e caracterização enzimática da microbiocratoxina A associada aos frutos e grãos de café (*Coffea arabica* L.) do município de Lavras-MG**. 2004. 156 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.
- SILVA, C. F.; SCHWAN, R. F.; DIAS, E. S.; WHEALS, A. E. Microbial diversity during maturation and natural processing of coffee cherries of *Coffea arabica* L in Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 60, n. 2/3, p. 251-260, Sept. 2000.
- SMITH, J. E.; ROSS, K. The toxigenic aspergilli. In: SMITH, J. E.; HENDERSON, R. S. (Eds.). **Mycotoxin and animal foods**. Boca Raton: CRC, 1991. p. 101-118.
- SUÁREZ-QUIROZ, M. L.; GONZÁLEZ-RIOS, O.; BAREL, M.; GUYOT, B.; SCHORR-GALINDO, S.; GUIRAUD, J. P. Effect of chemical and environmental factors on *Aspergillus ochraceus* growth and toxigenesis in green coffee. **Food Microbiology**, London, v. 21, n. 6, p. 629-634, Dec. 2004a.
- SUÁREZ-QUIROZ, M. L.; GONZÁLEZ-RIOS, O.; BAREL, M.; GUYOT, B.; SCHORR-GALINDO, S.; GUIRAUD, J. P. Effect of chemical and environmental factors on *Aspergillus ochraceus* growth and toxigenesis in green coffee. **Food Microbiology**, London, v. 21, n. 6, p. 629-634, Dec. 2004b.
- 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, n. 2, p. 173-179, Apr. 2003.

URBANO, G. R.; TANIWAKI, M. H.; LEITÃO, M. F. E.; VICENTINI, M. C. Occurrence of ochratoxin A-producing fungi in raw brazilian coffee. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 64, n. 8, p. 1226-1230, 2001.

VARGA, J.; RIGÓ, K.; TÓTH, T. J.; KOZAKIEWICZ, Z. Evolutionary relationships among *Aspergillus* species producing economically important mycotoxins. **Food Technology and Biotechnology**, [S.l.], v. 41, n. 1, p. 29-36, 2003.

VERSTRATE, F. Regulating OCRATOXINA A in coffee in the European Union. In: WORKSHOP OCRATOXINA A EM CAFÉ, 2004, Belo Horizonte. **Palestras...** Belo Horizonte: [s.n.], 2004.

XIAO, H.; MADHYASTHA, S.; MARQUARDT, R. R.; LI, S.; VODELA, J. K.; FROHLICH, A. A.; KEMPPAINEN, B. W. Toxicity of ochratoxin A, its opened lactone form and several of its analogs: structure-activity relationships. **Toxicology and Applied Pharmacology**, San Diego, v. 137, p. 182-192, 1996.