

AVALIAÇÃO DE INFESTAÇÃO E DE FUNGOS EM DUAS SAFRAS DE CAFÉS¹

Gina Maria Bueno Quirino Cardozo²; Beatriz Thie Iamanaka³; Angélica Prael Pantano⁴; Rosana Andrade de Paula Pereira⁵

¹Trabalho financiado pelo Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café – Consórcio Pesquisa Café

²Pesquisador, MS, Instituto de Tecnologia de Alimentos - ITAL, Campinas-SP, ginambqc@ital.sp.gov.br;

³Pesquisador, DSc, Instituto de Tecnologia de Alimentos - ITAL, Campinas-SP, beatriz@ital.sp.gov.br;

⁴Pesquisador, DSc, Instituto Agrônomo de Campinas - IAC, Campinas-SP, aprela@iac.sp.gov.br;

⁵Biólogo, Instituto de Tecnologia de Alimentos - ITAL, Campinas-SP, rosana.andrade@ital.sp.gov.br.

RESUMO: Este trabalho teve como objetivo avaliar duas safras de cafés de quatro regiões produtoras de café do estado de São Paulo quanto à infestação pela broca - *Hypothenemus hampei* e avaliação micológica, que compreende avaliar a infecção fúngica total e fungos potencialmente toxigênicos, e a avaliação do potencial de produção de toxinas, além da quantificação de ocratoxina A presente nos grãos. Apenas em uma amostra foi observada alta infestação nos grãos na safra 2016/2017 que, após cuidados com o manejo, incluindo a implementação de armadilha de insetos na lavoura, obteve ótimos resultados na safra 2017/2018. Em relação aos fungos, em ambas as safras foram detectados *Fusarium* sp, *Cladosporium* sp e Fungos dematiáceos. O grupo dos *Aspergillus section Nigri* foi isolado em uma amostra de café cereja da primeira safra, contudo os isolados não foram produtores de ocratoxina A. Na segunda safra, cepas de *Aspergillus section Circumdati* foram isoladas das amostras de café beneficiado e a contaminação por ocratoxina A obtida, estava dentro do limite de tolerância estabelecido pela RDC 07/2011. Após procedimento de torração e moagem e considerando as duas safras de cafés avaliadas, os valores de ocratoxina A variaram de “não detectado” a 2,76 µg/Kg.

PALAVRAS-CHAVE: *Hypothenemus hampei*, Broca, Ocratoxina A, Café, Contaminação.

INFESTATION AND FUNGI EVALUATION IN TWO COFFEE CROPS

ABSTRACT: The objective of this work was to evaluate two coffee crops from four coffee producing regions of the state of São Paulo for the infestation by the borer - *Hypothenemus hampei* and mycological evaluation, which comprises to evaluate the total fungal infection and potentially toxigenic fungi, the evaluation of the potential toxin production, and quantification of ochratoxin A present in grains. Only in one sample of the 2016/2017 crop, it was observed a high grain infestation, which, after careful handling, including the implementation of insect traps in the tilth, had excellent results in the 2017/2018 crop. Regarding the fungi, in both harvests they were detected *Fusarium* sp, *Cladosporium* sp and dematiaceous Fungi. The *Aspergillus section Nigri* group was isolated in a first crop cherry coffee sample, but the isolates were not ochratoxin A producers. In the second crop, *Aspergillus section Circumdati* strains were isolated from the processed coffee samples and the ochratoxin A contamination obtained was within the tolerance limit established by RDC 07/2011. After roasting and grinding procedures and considering the two coffee harvests evaluated, the ochratoxin A values ranged from “undetected” to 2.76 µg / kg.

KEY WORDS: *Hypothenemus hampei*, Borer, Ochratoxin A, Coffee, Contamination.

INTRODUÇÃO

A broca-do-café *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867) (Coleoptera: Curculionidae, Scolytinae) tem se dispersado pelas regiões produtoras de *Coffea arabica* L. de *Coffea canephora* Pierre no Brasil e no mundo (VELMOUROUGANE *et al.*, 2010). Seu ataque pode causar prejuízo com a redução do peso dos grãos e queda de frutos, e prejuízo qualitativo, com a redução da qualidade do café através da alteração no tipo e bebida. Os danos são causados diretamente pelas larvas do inseto que vivem no interior do fruto de café, atacando as sementes, podendo a destruição do fruto ser parcial ou total (REIS *et al.*, 2010).

O manejo da cultura e as condições climáticas são essenciais para evitar o desenvolvimento de infestações como também para o crescimento fúngico no café. A ocorrência de chuva durante o período de frutificação e maturação dos frutos diminui a taxa de infestação, e é aumentada quando ocorrem estiagens. A temperatura é outro fator que causa impacto na infestação, uma vez que temperaturas mais elevadas causam aumento do número de gerações devido a redução do ciclo de vida do inseto (LAURENTINO, COSTA, 2004). Dentre os fatores que promovem o crescimento fúngico no café, e dependendo das espécies presentes da contaminação por ocratoxina A, o teor de umidade e a qualidade dos grãos são considerados cruciais (PIMENTA, VILELA, 2003).

Com o objetivo de avaliar duas safras de cafés de quatro regiões produtoras de café do estado de São Paulo quanto à infestação pela broca, a infecção fúngica total, a infecção por fungos potencialmente toxigênicos, e contaminação por ocratoxina A, esse estudo foi realizado.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisados seis cafés provenientes das Safras 2016/2017 e 2017/2018 de quatro regiões produtoras de café do estado de São Paulo, sendo: Amostra 1 - Campinas (Catuaí Vermelho), Amostra 2 - Mococa (Catuaí Amarelo), Amostra 3 - Mococa (Tupi), Amostra 4 - Divinolândia (Catuaí Amarelo), Amostra 5 - Franca (Mundo Novo - área arborizada) e Amostra 6 - Franca (Mundo Novo - área ensolarada).

A determinação de infestação interna foi realizada a partir de 100 grãos de café cru beneficiados, nos quais foram quantificados os grãos sadios e os grãos danificados, e que foram quebrados separadamente em moinho de café para o isolamento das sujidades internas aos grãos segundo o método de nº 988.16 b da AOAC (WHITLOCK, 2010). Os insetos detectados foram identificados segundo Athié, Paula (2002).

Para isolamento da micobiota dos frutos e cafés beneficiados, os grãos foram desinfestados superficialmente com 0,4% de solução de hipoclorito de sódio por 2 minutos. Após a desinfecção das amostras, foram plaqueados 50 grãos, sendo 10 grãos em 5 placas de Petri, contendo o meio de cultura Ágar Dicloran 18% Glicerol (DG18) para os isolamentos dos fungos. As placas foram incubadas a 25°C por 5-7 dias, de acordo com Pitt & Hocking, 2009.

Para identificação dos fungos isolados, as cepas foram isoladas em meios específicos e identificadas de acordo com a chave de identificação KLICH, PITT (1988) e PITT, HOCKING (2009). As espécies potencialmente toxigênicas foram avaliadas quanto a produção de ocratoxina A de acordo com FILTENBORG *et al.*, 1983).

A atividade de água dos grãos foi realizada nos frutos e grãos beneficiados através da medida direta em equipamento Decagon-Aqualab, modelo TE, sendo realizado em triplicata.

A análise de ocratoxina A foi realizada no café torrado e moído, conforme metodologia desenvolvida por Varga *et al.*, 2005 que utiliza a coluna de imunoafinidade. A ocratoxina A foi quantificada por HPLC e detecção por fluorescência.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Figura 1 é possível observar os resultados de grãos brocados nas amostras analisadas. Com exceção da Amostra 5 da safra 2016/2017 que apresentou em média 50% de grãos brocados, as demais amostras de café para ambas as safras, apresentaram baixo número de grãos brocados, que variaram de 0 a 3. Esses resultados podem ser um indicativo da presença de broca no interior dos grãos, que após a torração e moagem, tornar-se-ão fragmentos de insetos.

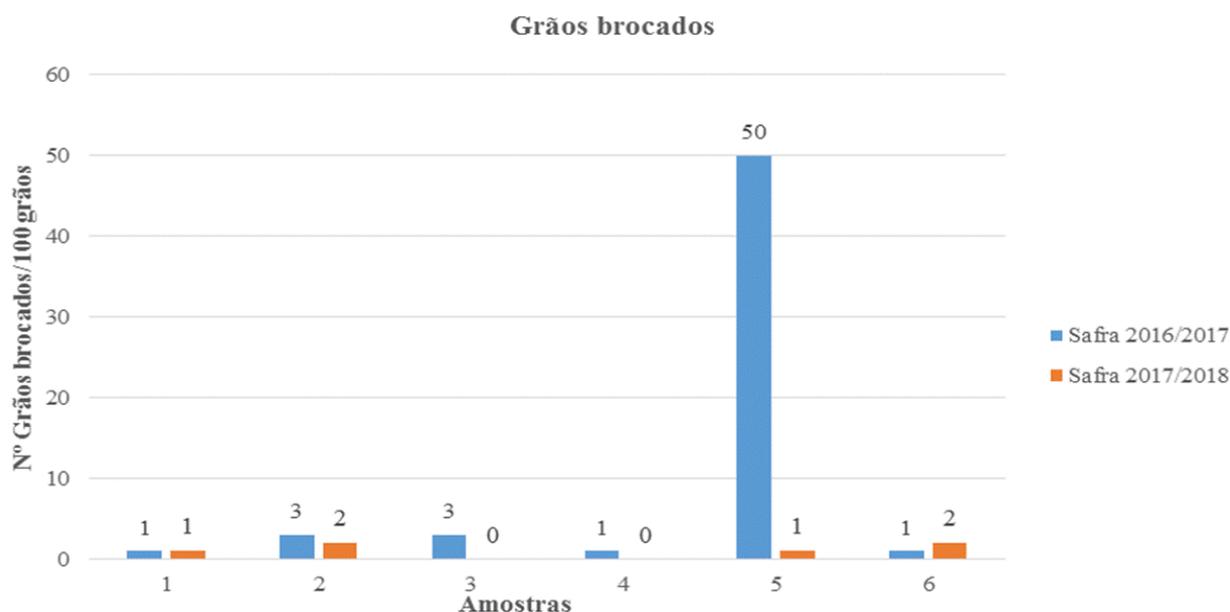


Figura 1. Número de grãos brocados observados nas amostras das safras 2016/2017 e 2017/2018.

As Figuras 2 e 3 apresentam as sujidades detectadas no interior dos grãos de café brocados e sadios, respectivamente. É possível observar que a Amostra 5 da safra 2016/2017 foi a mais infestada, e que apresentou fragmentos de insetos, larvas, pupas e insetos inteiros (Figura 2). A presença desses estágios de desenvolvimento dos insetos nos grãos secos, refletirá na detecção de fragmentos desses contaminantes no café torrado e moído, cuja resolução RDC 14/2014 estabelece o limite de tolerância de 60 fragmentos de insetos por 25 g de café torrado e moído.

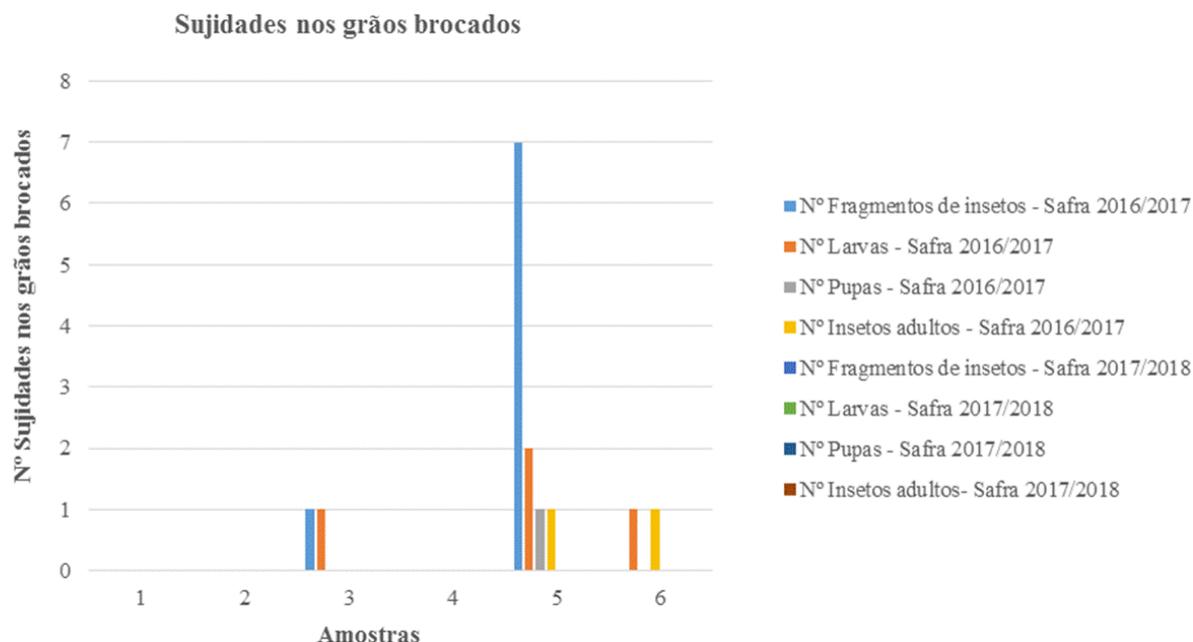


Figura 2. Número de sujidades nos grãos brocados observados nas amostras das safras 2016/2017 e 2017/2018

Os grãos sadios também apresentaram sujidades, conforme apresentado na Figura 3. Isso pode acontecer devido a morte de insetos no interior dos grãos antes de perfurá-los para a sua saída. Assim, mesmo aparentemente sadios, os grãos podem apresentar-se infestados.

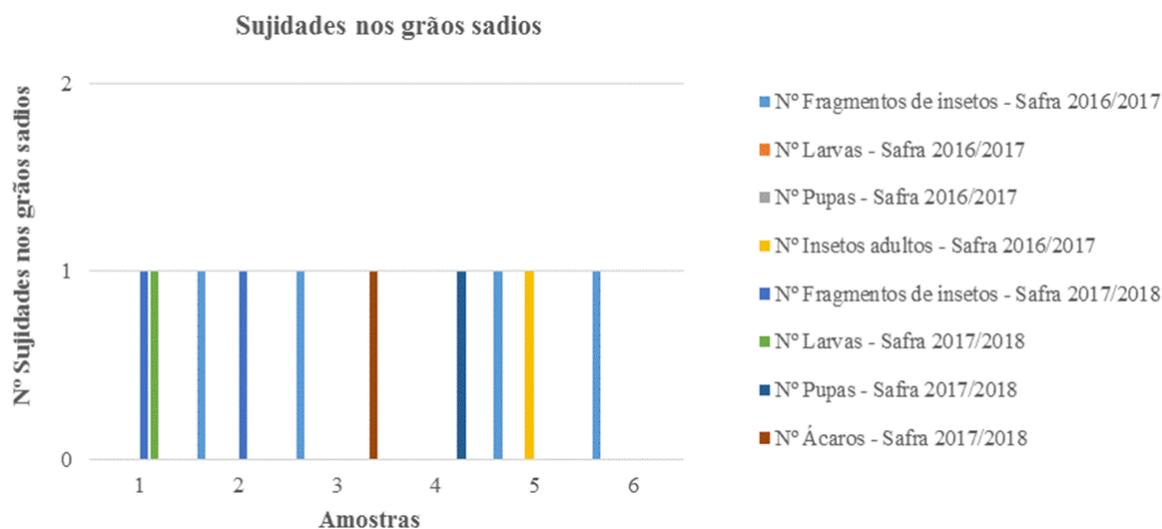


Figura 3. Número de sujidades nos grãos sadios observados nas amostras das safras 2016/2017 e 2017/2018

Devido à grande quantidade de grãos brocados no café da lavoura de Franca (Amostra 5) da safra 2016/2017, foram tomadas medidas de controle que surtiram efeito, visto os resultados das avaliações da safra seguinte. Além da retirada de restos de café do chão e dos frutos que restaram nas plantas da safra anterior, também foi implementado na lavoura, uma armadilha para a captura de insetos. Ela era constituída de uma garrafa PET de dois litros, com abertura lateral e com o gargalo (com tampa) para baixo onde foi colocada uma solução 0,5% de detergente em água. Dentro da garrafa PET foi afixado um vidro contendo atrativo alimentar composto por álcool e café torrado e moído. Essa armadilha deve ser colocada nos galhos do café quando o grão do café começa a se desenvolver, geralmente nos meses de setembro e outubro, com espaçamento entre elas em torno de 20 metros.

A Tabela 1 apresenta a infecção fúngica total e a infecção por fungos potencialmente toxigênicos detectados nas amostras de café cereja e beneficiado para as duas safras.

Tabela 1. Infecção fúngica total e a infecção por fungos potencialmente toxigênicos para as amostras de café cereja e beneficiado das safras 2016/2017 e 2017/2018.

Amostras	Safr 2016/2017				Safr 2017/2018			
	Infecção fúngica total (%)		Infecção por fungos potencialmente toxigênicos (%)		Infecção fúngica total (%)		Infecção por fungos potencialmente toxigênicos (%)	
	Cereja	Beneficiado	Cereja	Beneficiado	Cereja	Beneficiado	Cereja	Beneficiado
1	32	24	0	0	0	64	0	10
2	16	18	0	0	4	18	0	2
3	24	4	0	0	2	46	0	4
4	14	6	4	0	4	14	0	0
5	8	44	0	0	14	18	0	0
6	0	0	0	0	8	30	0	2

Em relação à contaminação fúngica total, não houve diferença entre as duas safras nos cafés cereja e beneficiado, contudo foi verificada maior contaminação por fungos toxigênicos no café beneficiado da safra 2017-2018, estando presentes em 4 das 6 amostras analisadas.

As Tabelas 2 e 3 mostram os fungos identificados nos cafés cereja e beneficiado para ambas as safras. A amostra 1 foi a que apresentou maior quantidade e diversidade fúngica nas duas safras.

Tabela 2. Identificação dos fungos detectados nas amostras de cafés cereja e beneficiados da safra 2016/2017.

Amostras	Safr 2016/2017				Safr 2017/2018			
	Infecção fúngica total (%)		Infecção por fungos potencialmente toxigênicos (%)		Infecção fúngica total (%)		Infecção por fungos potencialmente toxigênicos (%)	
	Cereja	Beneficiado	Cereja	Beneficiado	Cereja	Beneficiado	Cereja	Beneficiado
1	32	24	0	0	0	64	0	10
2	16	18	0	0	4	18	0	2
3	24	4	0	0	2	46	0	4
4	14	6	4	0	4	14	0	0
5	8	44	0	0	14	18	0	0
6	0	0	0	0	8	30	0	2

Tabela 3. Identificação dos fungos detectados nas amostras de cafés cereja e beneficiados da safra 2017/2018.

Amostras (Safr 2016/2017)	Fungos (%)						
	<i>Fusarium</i> sp	<i>Cladosporium</i> sp	<i>Penicillium</i> sp	<i>Eurotium</i> sp	Fungos dematiáceos	<i>Wallemia</i> sp	<i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i>
1 Cereja	22	0	0	10	0	0	0
1 Beneficiado	0	0	2	0	22	0	0
2 Cereja	0	0	0	0	16	0	0
2 Beneficiado	0	0	0	0	18	0	0
3 Cereja	0	2	0	0	12	0	0
3 Beneficiado	0	0	2	0	2	0	0
4 Cereja	6	0	0	0	4	0	4
4 Beneficiado	0	2	0	2	0	2	0
5 Cereja	6	0	0	0	2	0	0
5 Beneficiado	30	0	14	0	0	0	0
6 Cereja	8	0	0	0	0	0	0
6 Beneficiado	0	0	0	0	0	0	0

As amostras apresentaram contaminação por *Fusarium* sp., *Cladosporium* sp. e Fungos dematiáceos nas duas safras. Na safra 2016/2017 também foram detectados *Penicillium* sp., *Eurotium* sp., *Wallemia* sp. e *Aspergillus* section *Nigri*. Na safra 2017/2018 foram identificados *Penicillium brevicompactum*, *Eurotium rubrum*, *Penicillium citrinum* e *Aspergillus* section *Circumdati*.

Na safra 2016/2017, os dois isolados (Amostra 4 - cereja) de *Aspergillus* section *Nigri* não foram produtores de ocratoxina A. Na safra 2017/2018, as nove cepas de *Aspergillus* section *Circumdati* que foram isoladas das amostras de

café beneficiado, sendo cinco da Amostra 1, duas da Amostra 3 e uma das Amostras 2 e 6, foram capazes de produzir ocratoxina A.

A Tabela 4 mostra os dados obtidos de atividade de água para as amostras de café cereja e beneficiado, e de ocratoxina A para as amostras de café torrado e moído. Os resultados obtidos de atividade de água para a safra de 2017/2018 revelaram-se mais elevados que a safra anterior, mesmo assim ainda considerados seguros para o crescimento de microorganismos ($\leq 0,60$). Os valores de ocratoxina A para a safra 2016/2017 variaram de “não detectado” a 0,32 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, já para a safra 2017/2018, variaram de 0,49 a 2,76. A amostra 6 foi a que apresentou os níveis mais baixos em ambas as safras. Os resultados de análise de ocratoxina A mostraram que todas as amostras encontram-se dentro do limite de tolerância de 10 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ estabelecido pela legislação brasileira vigente (RDC 07/11) para café torrado e moído.

Tabela 4. Identificação dos fungos detectados nas amostras de cafés cereja e beneficiados, e de ocratoxina A para as amostras de café torrado e moído das safras 2016/2017 e 2017/2018.

Amostras (Safr 2017/2018)	Fungos (%)						
	<i>Fusarium</i> sp	<i>Cladosporium</i> sp	<i>Penicillium</i> <i>brevicompactum</i>	<i>Eurotium</i> <i>rubrum</i>	Fungos dematiáceos	<i>Penicillium</i> <i>citrinum</i>	<i>Aspergillus</i> section <i>Circumdati</i>
1 Cereja	-	-	-	-	-	-	-
Beneficiado	12	2	46	2	-	-	10
2 Cereja	-	-	-	-	4	-	-
Beneficiado	4	4	-	-	-	8	2
3 Cereja	-	-	-	-	2	-	-
Beneficiado	-	22	18	-	20	-	4
4 Cereja	-	-	-	-	4	-	-
Beneficiado	4	-	-	-	2	8	-
5 Cereja	14	-	-	-	-	-	-
Beneficiado	10	2	-	-	6	-	-
6 Cereja	8	-	-	-	-	-	-
Beneficiado	8	8	2	-	10	-	2

(*) Limite de detecção OTA = 0,13 $\mu\text{g}/\text{Kg}$

CONCLUSÕES

1. Com exceção da Amostra 5 da Safra 2016/2017 que apresentou alta quantidade de grãos brocados, as demais amostras apresentaram pouca quantidade de grãos brocados e de sujidades. As sujidades foram detectadas em algumas amostras de grãos brocados como também de grãos sadios.
2. Dentre os fungos detectados, *Fusarium* sp, *Cladosporium* sp e Fungos dematiáceos foram os fungos detectados em ambas as safras.
3. Em uma amostra de café cereja da safra 2016/2017 foi isolado o fungo *Aspergillus section Nigri*, que embora considerado toxigênico, ele não foi produtor de ocratoxina A. Na safra 2017/2018 as cepas de *Aspergillus section Circumdati* isoladas das amostras de café beneficiado foram capazes de produzir ocratoxina A à níveis abaixo do tolerado pela legislação brasileira (RDC 07/2011).
4. Embora todas as amostras de café torrado e moído tenham apresentado contaminação por ocratoxina A, os valores obtidos atenderam ao limite de tolerância da RDC 07/2011 que estabelece 10 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ para café torrado e moído.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio financeiro ao projeto concedido pelo Consórcio Pesquisa Café.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ATHIÉ I.; PAULA, D.C. **Insetos de grãos armazenados: Aspectos biológicos e identificação**. São Paulo. Livraria Varela, 2 ed. 2002. 244p.
- FILTENBORG, O; FRISVAD, J.C.; SVENDSEN, J.A. **Simple screening method for molds producing intracellular mycotoxins in pure cultures**. Appl. Environ. Microbiol., 45 (1983), pp. 581-585.
- KLICH, M.A.; PITT, J.I. **A Laboratory Guide to Common Aspergillus Species and their Teleomorphs**. North Ryde. N.S. W.: CSIRO Division of Food Science and Technology, 1988.
- LAURENTINO, E.; COSTA, J.N.M. **Descrição e caracterização biológica da broca-do-café (*Hypothenemus hampei*, Ferrari 1867) no Estado de Rondônia**. 1ª ed. Porto Velho: Embrapa Rondônia, 2004. 21 p. (Embrapa Rondônia. Documentos, 90).

PIMENTA, C.J.; VILELA, E.R. Composição microbiana e ocratoxina a no café (*Coffea arabica* L.) submetido a diferentes tempos de espera antes da secagem. **Ciência e Agrotecnologia**. Vol.27. no.6. Lavras. Nov./Dec. 2003.

PITT, J.I.; HOCKING, A.D. **Fungi and Food Spoilage**. London: Blackie Academic & Professional, 593p, 2009.

REIS, P.R.; SOUZA, J.C., SANTA-CECÍLIA, L.V.C; SILVA, R.A.; ZACARIAS, M.S. Manejo integrado das pragas do cafeeiro. In: REIS, P.R.; CUNHA, R.L. (Ed). **Café arábica: do plantio à colheita**. Lavras, Sul de Minas, EPAMIG. 2010. Capítulo 10. p. 573-688.

VARGA, J.; PÉTERI, Z.; TÁBORI, K.; TÉREN, J. VÁGVÖLGYI, C. **Degradation of ochratoxin A and other mycotoxins by *Rhizopus* isolates**. Int. J. Food Microbiol., 99 (2005), pp. 321-328

VELMOUROUGANE, K.; BHAT, R.; GOPINANDHAN, T.N. Coffee Berry Borer (*Hypothenemus hampei*) - A Vector for Toxigenic Molds and Ochratoxin A Contamination in Coffee Bean. **Foodborne Pathogens and Disease**. v. 7, n. 10, p. 1279- 1284, 2010.

WHITLOCK, L.L., Chapter Editor. Extraneous Materials: Isolation. In: HORWITZ, W. (Ed). **Official Methods of Analysis of AOAC International**. Gaithersburg, MD, USA, AOAC. International. 18th ed. 2005. Current Through Revision 1, 2006. Chapter 16, p:09.