

# EFEITO DE MICRONUTRIENTES NA POPULAÇÃO FÚNGICA ASSOCIADA A GRÃOS DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.)<sup>1</sup>

LILIANA AUXILIADORA AVELAR PEREIRA PASIN<sup>2</sup>

MÁRIO SOBRAL DE ABREU<sup>3</sup>

SARA MARIA CHALFOUN<sup>4</sup>

TULLIO RAPHAEL PEREIRA DE PÁDUA<sup>5</sup>

**RESUMO** – Conduziu-se este trabalho com o objetivo de avaliar a ocorrência de ocratoxina A e o efeito de micronutrientes, pulverizados, diretamente sobre os frutos na pré-colheita e na incidência fúngica em grãos de café (*Coffea arabica* L.) beneficiados do ano agrícola 1999/2000. Os nutrientes cobre, zinco, manganês e boro foram aplicados isoladamente e em associação, pulverizados diretamente sobre os grãos desde a fase de chumbinho até a colheita. A avaliação da incidência fúngica foi realizada quando os grãos atingiram teor de umidade em torno de 12%, antes e após a desinfecção superficial com hipoclorito de sódio a 1%. A exteriorização dos fungos foi realizada pelo do método *Blotter test*.

Pelos resultados obtidos, pode-se verificar que todos os nutrientes aplicados isoladamente reduziram significativamente a porcentagem média de incidência dos fungos *Aspergillus ochraceus*, *Fusarium semitectum* e *Cladosporium cladosporioides*; entretanto, a ocorrência do fungo *Penicillium variable* não apresentou diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos realizados. Apesar de a ocorrência interna do fungo *A. ochraceus* ter sido relativamente elevada, em torno de 50% na testemunha, não se detectou a ocorrência de OTA nessas amostras, inferindo-se que o café não é um bom substrato para a produção dessa micotoxina.

**TERMOS PARA INDEXAÇÃO:** *Coffea arabica*, café, micronutrientes, fungos, ocratoxina A, *Coffea arabica*.

## EFFECT OF MICRONUTRIENTS ON THE FUNGAL POPULATION ASSOCIATED WITH COFFEE (*Coffea arabica* L.) GRAINS

**ABSTRACT** – The purpose of this work was to evaluate the effects of micronutrients sprayed directly on the fruits at the pre-harvest on the fungal incidence in the processed coffee grains (*Coffea arabica* L.), and on occurrence of ochratoxin A in the grains. The nutrients copper, zinc, manganese and boron were applied singly and in association, sprayed directly on fruits since “chumbinho” phase until harvest. The evolution of fungal incidence was performed when the grains reached moisture content around 12%, before and after surface disinfestation with 1% sodium hypochloride. The fungal exteriorization was performed through *Blotter test* method. The determination of OTA was proceeded by

high performance liquid chromatography (HPLC). The results obtained enabled to verify that all nutrients applied singly reduced the average percentage of incidence of the fungi *A. ochraceus*, *F. semitectum* and *C. cladosporioides* nevertheless, the occurrence of the fungus *P. variable* presented no significant statistic differences among the treatments accomplished. In spite of the internal occurrence of the fungi *A. ochraceus* being relatively high, around 50%, the occurrence of the OTA in these samples was not detected, suggesting that the coffee is not a good substrate for the production of the mycotoxin.

**INDEX TERMS:** *Coffea arabica*, coffee, micronutrients, fungus, ochratoxin A., *Coffea arabica*.

- 
1. Parte da tese apresentada à UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS – UFLA, Caixa Postal 37 – 37200-000 – Lavras, MG, pelo primeiro autor (Financiado pelo CBP&D-Café).
  2. Doutor em Fitopatologia, Professor Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP).
  3. Professor/Doutor, Departamento de Fitopatologia/UFLA.
  4. Pesquisador/Doutor, EPAMIG, Lavras, MG.

## 5. Aluno de Graduação em Agronomia/UFLA.

**INTRODUÇÃO**

O café (*Coffea arabica* L.) constitui uma das principais fontes de receita para o País; no entanto, com o aumento da produção e melhoria da qualidade por outros países produtores, aliados a crescentes demandas por cafés de qualidade superior por países importadores, a exportação brasileira tem sofrido quedas significativas, refletindo diretamente nos aspectos sociais e econômicos do País.

Essa crescente demanda pelos países importadores por um café de melhor qualidade mostra a importância de associar produtividade e qualidade, já que o café destaca-se entre os poucos produtos agrícolas que têm seus preços baseados em parâmetros qualitativos, cujo valor aumenta significativamente com a melhoria da qualidade.

Dentre os aspectos que influenciam a qualidade do café, a incidência de microrganismos nas fases de pré e pós-colheita tem sido um dos principais fatores envolvidos. Os frutos estão expostos a uma diversidade de microrganismos, tais como leveduras, fungos, bactérias, que encontrando condições favoráveis para se desenvolver, infectam os grãos. Entre os organismos que compõem a microbiota do café, os fungos filamentosos representam o grupo que pode causar maior dano, comprometendo, conseqüentemente, a qualidade (Carvalho, 1997).

Além da influência direta na qualidade do café, certos fungos associados aos grãos, denominados toxigênicos, podem produzir substâncias tóxicas, ou seja, metabólitos secundários denominados micotoxinas, que são altamente nocivas à saúde do homem. A ocorrência de micotoxinas em grãos de café até então não era considerada por falta de evidências científicas. Somente recentemente, após o refinamento de técnicas químicas analíticas, a presença desses metabólitos tornou-se evidente.

No café, a toxina de maior ocorrência é a Ocratoxina A (OTA), sendo produzida por fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, dentre eles: *A. ochraceus*, *A. melleus*, *A. sulphureus*, *P. variable*, *P. verrucosum* (Scussel, 1998 e Moss, 1998). A ocorrência dessa toxina em grãos de café tem gerado grande preocupação no mercado consumidor do produto, em conseqüência de seu potencial hepatotóxico, nefrotóxico, teratogênico e carcinogênico (Sturder-Rhor et al., 1995), podendo comprometer, além da saúde do consumidor, a comercialização do produto.

De acordo com Frank (1998), uma das alternativas viáveis para impedir esse problema é a prevenção da contaminação dos grãos por fungos, durante o processo de produção.

A presença desses microrganismos e a qualidade do café dependem diretamente dos cuidados na condução e manejo da cultura e dos frutos durante as fases de pré e pós-colheita. (Souza & Carvalho, 1997). Entre 1939 e 1943, Bitancourt (1957) realizou vários testes visando a melhorar a qualidade do café, impedindo o desenvolvimento de microrganismos, e concluiu que é possível melhorar a bebida do café por meio de pulverizações. Feira-Morales (1990) ressalta que deficiência nutricional e o uso inadequado de medidas de proteção contra as doenças do café conduzem à produção de baixos padrões qualitativos do produto.

Considerando os danos causados por microrganismos não apenas na qualidade do café, mas também no aspecto de segurança do produto, pesquisas que visem ao seu controle nas fases de pré e pós-colheita são ainda incipientes. Diante dessas evidências, com este trabalho objetiva-se determinar a produção de ocratoxina A e o efeito de micronutrientes aplicados nos frutos na pré-colheita e na incidência fúngica dos grãos de café beneficiado.

**MATERIAL E MÉTODOS**

O trabalho foi desenvolvido em lavoura da EPAMIG, safra 1999/2000, situada no Campus da Universidade Federal de Lavras, no município de Lavras, MG, em lavoura adulta da cultivar Mundo Novo IAC-379-39, em franca produção.

O sistema de cultivo adotado foi o de livre crescimento com espaçamento de 4 x 1m. A lavoura não recebeu nenhuma pulverização com micronutrientes, além dos tratamentos realizados neste ensaio, assim como pulverizações visando ao controle fúngico. Os demais procedimentos foram os mesmos recomendados para a cultura do cafeeiro.

Testou-se o efeito de produtos químicos à base de cobre, manganês, zinco e boro, pulverizados com costal manual, mensalmente, isoladamente ou em associação, conforme tabela 1, diretamente sobre os frutos, desde a fase de chumbinho, até a colheita, totalizando sete pulverizações.

O experimento foi instalado em blocos casualizados, sendo cada parcela constituída por 6 plantas, delimitadas por três plantas, que não foram pulverizadas, constituindo bordaduras. Cada fileira contendo os tra-

tamentos foi separada por uma fileira que não foi submetida a pulverizações.

Quando 80% dos frutos atingiram o estágio de maturação cereja, foram colhidos. Para cada tratamento, colheram-se 60 Kg de frutos, para posterior secagem, em terreiro de concreto. Os frutos permaneceram no terreiro por um período de 15 dias, até atingirem o teor de umidade em torno de 12%. Após secagem, os grãos foram armazenados em sacos de papel duplo, para análise posterior, realizada dois dias após a retirada dos grãos do terreiro.

#### Exteriorização e identificação dos fungos associados aos grãos

Para identificação dos fungos associados aos grãos, 200 grãos de café beneficiados foram coletados ao acaso de cada tratamento. Um lote de 100 grãos foi desinfestado superficialmente, após a imersão por 1 minuto em álcool etílico a 70%, a fim de garantir a desinfestação superficial em grãos com grande incidência de *Aspergillus* e *Penicillium*, fungos produtores de esporos muito secos e hidrofóbicos. Em seguida, os grãos foram imersos em solução de hipoclorito de sódio a 1% por três minutos. Os grãos foram lavados em água destilada e esterilizada, após a imersão em hipoclorito de sódio, para a remoção do resíduo.

**TABELA 1** – Relação dos tratamentos realizados no café (*Coffea arabica*) com respectivas fontes e concentrações dos nutrientes.

Tratamentos	Descrição
1	<b>Cu</b> – Oxidocloreto de cobre (0,3%)
2	<b>Zn</b> – Sulfato de zinco (0,5%)
3	<b>Mn</b> – Sulfato de manganês (0,2%)
4	<b>B</b> – Ácido Bórico (0,3%)
5	<b>Cu+Zn (0,3 % + 0,5%)</b>
6	<b>Cu+Mn (0,3%+0,2%)</b>
7	<b>Cu+B (0,3%+0,3%)</b>
8	<b>Zn+B (0,5%+0,3%)</b>
9	<b>Zn+Mn (0,5%+0,2%)</b>
10	<b>Mn+B (0,2%+0,3%)</b>
11	<b>Cu+Zn+Mn+B (0,3%+0,5%+0,2%+0,3%)</b>

## 12 Testemunha

### \*Pulverização a alto volume (400 l/ha).

Esse procedimento permite conhecer os fungos que realmente invadiram os grãos. Os 100 grãos restantes da amostragem realizada não foram desinfestados, permitindo, assim, que se conhecesse a população fúngica externa, a qual representa uma fonte de inóculo em potencial durante o período de transporte e armazenamento dos grãos.

Os grãos de cada tratamento, desinfestados e não desinfestados com hipoclorito de sódio, foram distribuídos sob condições assépticas em placas de Petri de 15 cm de diâmetro, contendo três folhas de papel de filtro previamente esterilizadas e umedecidas com água destilada e esterilizada. Cada placa com 25 grãos foi considerada uma repetição. Após plaqueamento, os grãos foram incubados em câmara com temperatura de  $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  e fotoperíodo de 12 horas de luz, durante oito dias, até exteriorização e desenvolvimento dos fungos (Mazani, 1994).

A microbiota associada aos grãos foi avaliada pela identificação e contagem dos fungos, examinando individualmente os grãos em microscópio estereoscópico, após oito dias de incubação. Em alguns casos, a identificação foi confirmada pela visualização das estruturas morfológicas dos fungos em microscópio óptico.

### Análise de Ocratoxina A

As análises foram realizadas no Laboratório de Micotoxinas do Ministério de Agricultura e Abastecimento, de acordo com os métodos analíticos de referência para análise de micotoxinas em produtos e subprodutos e derivados de origem vegetal, sendo publicadas no Diário oficial. Os procedimentos analíticos dessa metodologia são baseados nos descritos por AOAC (1990) e Nakajima et al. (1990).

Utilizou-se a metodologia analítica para a determinação da ocratoxina A (OTA) por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE /HPLC). Essa metodologia fundamenta-se na extração da ocratoxina A pela solução de metanol: bicarbonato de sódio, purificação do extrato por coluna de imunoafinidade, separação do extrato purificado por CLAE, detecção e quantificação. O limite de detecção foi de 0,01 ng/g.

De cada tratamento, foi retirado 1 kg de grãos, que foi previamente homogenizado, constituindo as subamostras. Após moídas, essas foram novamente homogeneizadas para a retirada de 25 g, os quais foram utilizados para as análises em triplicata.

Apenas o café beneficiado foi utilizado para realização das análises.

#### Análise estatística

Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado.

Para avaliação dos fungos exteriorizados pelos grãos de café crus, utilizaram-se quatro repetições de 25 sementes, para todos os tratamentos.

A análise estatística foi realizada utilizando-se o procedimento GLM (General Linear Models) do sistema estatístico SAS<sup>®</sup> (Sas Institute, 1992). Os testes de hipótese foram realizados pela análise de variância.

Os dados referentes à incidência fúngica foram previamente transformados em  $\sqrt{x + 0,5}$ , antes de serem submetidos à análise de variância, em razão de não ter havido normalidade na distribuição dos erros e/ou homogeneidade de variância.

Os testes de comparações de médias para detectar as diferenças quanto à incidência fúngica foram realizados pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### População fúngica associada aos grãos

Os resultados referentes às porcentagens médias de fungos em cafés beneficiados submetidos a diferentes tratamentos com micronutrientes, em grãos desinfestados e não-desinfestados com hipoclorito de sódio a 1%, são apresentados nas Tabelas 2 e 3. Observa-se que as espécies fúngicas associadas aos grãos de café estão incluídas nos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Cladosporium*, o que está de acordo com o verificado por Meirelles (1990), Alves (1996) e Freitas (2000).

A testemunha foi o tratamento em que se observou maior incidência de todos os gêneros de fungos; entretanto, não se detectaram diferenças estatísticas significativas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade entre a testemunha e alguns tratamentos, para todos os fungos. Isso foi verificado tanto para os grãos desinfestados como para os não-desinfestados superficialmente (Tabela 2,3).

Verificou-se menor incidência do fungo *Aspergillus ochraceus* para todos os micronutrientes aplicados isoladamente, sendo as pulverizações com cobre e zinco as mais efetivas no controle da incidência desse fungo; isso pode ser constatado na Tabela 2. Entretanto, quando os micronutrientes foram aplicados em associação, os resultados não foram satisfatórios, principalmente quando todos os fertilizantes foram aplicados associados em solução (Tabela 2).

**TABELA 2** – Porcentagem de ocorrência<sup>1</sup> de fungos em grãos de café beneficiado, não desinfestado com hipoclorito de sódio e pulverizados com micronutrientes. UFLA – Lavras (MG), 2000.

Tratamentos	Incidência em grãos (%)			
	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	<i>Penicillium variable</i>	<i>Fusarium semitectum</i>	<i>Aspergillus ochraceus</i>
Cu	68 b	72 a	33 c	5 c d
Zn	68 b	73 a	33 c	6 c d
Mn	71 b	71 a	38 c	8 c d
B	69 b	72 a	41 c	10 c d
Cu+Zn	87 a b	64 a	58 a b	26 c d
Cu+Mn	66 b	63 a	58 a b	18 c d
Cu+B	70 b	58 a	66 a b	15 c d
Zn+Mn	83 a b	73 a	65 a b	22 c d
Zn+B	73 a b	83 a	47 b c	20 c d
Mn+B	84 a b	79 a	55 a b	42 b c
Cu+Zn+Mn+B	88 a b	70 a	68 a b	83 a
Testemunha	94 a	81 a	79 a	84 a

<sup>1</sup>Médias com a mesma letra, na coluna, são estatisticamente iguais pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O cobre é componente de diversas moléculas protéicas, como, plastocianina, peroxidases e proteínas, que dentre várias funções, oxidam monofenóis a difenóis e promovem a formação de radicais mesoméricos; fenolase, que participa da monooxigenação de monofenóis e cataliza a oxidação de **o**difenóis para **o**quinonas e lacase (Marschner, 1986). Dessa forma, no tocante à tolerância das plantas às doenças, o cobre pode exercer efeitos diretos sobre os fungos, ou indiretos, agindo sobre os próprios mecanismos de resistência do hospedeiro. No primeiro caso, a influência desse micronutriente está relacionada com sua capacidade fungistática, que tem sido amplamente demonstrada por vários pesquisadores (Graham, 1983; Bell, 1989).

De maneira geral, os mecanismos de controle de fungos pelo cobre podem ser devidos à toxicidade direta, provocando a desnaturação de proteínas, participação direta na síntese de lignina, reconhecida barreira à penetração de microrganismos (Graham & Webb, 1991).

Além de participar da síntese de lignina, o Mn pode exercer uma inibição direta no crescimento fúngico, em certas concentrações, podendo atingir níveis tóxicos para o fungo (Graham & Webb, 1991). Neste trabalho, pode-se verificar também uma redução de 76% na incidência do fungo *A. ochraceus* em relação à testemunha, quando se aplicou sulfato de manganês a 0,2%. (Tabela 2)

Becker-Raternink et al. (1991) relatam existir uma correlação entre as concentrações de cobre e manganês e a qualidade da bebida; a melhor qualidade da bebida em função desses micronutrientes pode ser atribuída à redução da incidência de fungos associados aos grãos, já que, a ocorrência de fungos nas fases pré e pós-colheita é um dos principais fatores que influenciam a qualidade.

Apesar de o fungo *Aspergillus ochraceus* ser enquadrado no grupo de fungos xerofílicos, ou seja, capazes de atuar sobre grãos e sementes em atmosfera relativamente seca, desfavorável aos fungos de campo, e serem saprófitas e oportunistas, provavelmente foi sensível ao efeito fungitóxico do cobre e manganês, mesmo em baixas concentrações.

O zinco é um dos elementos mais limitantes para o cultivo do cafeeiro. Em caso de deficiência acentuada, pode causar a seca de ramos e ponteiros e frutos malgranados e supostamente mais sensíveis à associação com microrganismos. Neste estudo, pode-se observar que a aplicação de sulfato de zinco a 0,5% reduziu em 78% a incidência do fungo *A. ochraceus* em relação à testemunha. (Tabela 2).

O boro também participa no metabolismo de fenóis e lignina, além de ser responsável pelo incremento na formação de fitoalexinas fenólicas em resposta à liberação de borato, que se comportaria como elicitador dessas substâncias (Lewis, 1980; Graham & Webb, 1991).

A análise dos grãos desinfestados com hipoclorito de sódio é relevante para se conhecer o nível de infestação de cada fungo. O fungo *Aspergillus ochraceus* é um fungo saprófita e oportunista, necessitando de condições favoráveis para infectar o interior dos grãos de café (Samson et al., 1995). Verificando as tabelas 2 e 3, observa-se que a presença externa aos grãos é maior que a interna; no entanto, para o fungo *Aspergillus ochraceus*, os índices de contaminação interna e externa foram relativamente equivalentes. Verificou-se contaminação interna para todos os fungos detectados nos grãos não desinfestados.

Pode-se verificar também que o comportamento com relação aos tratamentos com micronutrientes foi semelhante nos grãos desinfestados e não desinfestados com hipoclorito (Tabela 2 e 3), ou seja, quando se pulverizaram apenas os nutrientes isoladamente, houve menor índice de infestação de *A. ochraceus*.

A incidência dos fungos *Cladosporium cladosporioides* e *Fusarium semitectum* em resposta às pulverizações com micronutrientes foi semelhante à incidência de *Aspergillus ochraceus*. Todos os micronutrientes aplicados isoladamente diminuíram significativamente a incidência desses fungos (Tabela 2); no entanto, para o fungo *Penicillium variable*, isso não foi verificado. Pode-se constatar, pela análise dos resultados obtidos e apresentados nas tabelas 2 e 3, que a incidência desse fungo não diferiu estatisticamente para todos os nutrientes aplicados isoladamente ou em associação, sugerindo que esse fungo é indiferente ao efeito fungitóxico desses elementos nas concentrações aplicadas.

### Ocorrência de Ocratoxina A

No presente estudo, constatou-se a incidência dos fungos *Aspergillus ochraceus* e *Penicillium variable*, conforme Figura 1, ambos citados como produtores de ocratoxina A (Scussel, 1998). No entanto, apesar de a porcentagem média de ocorrência interna de *A. ochraceus* ter sido em alguns tratamentos, como a testemunha e todos os micronutrientes aplicados associados, próximo a 50%, a ocorrência dessa micotoxina não foi detectada (Tabela 4).

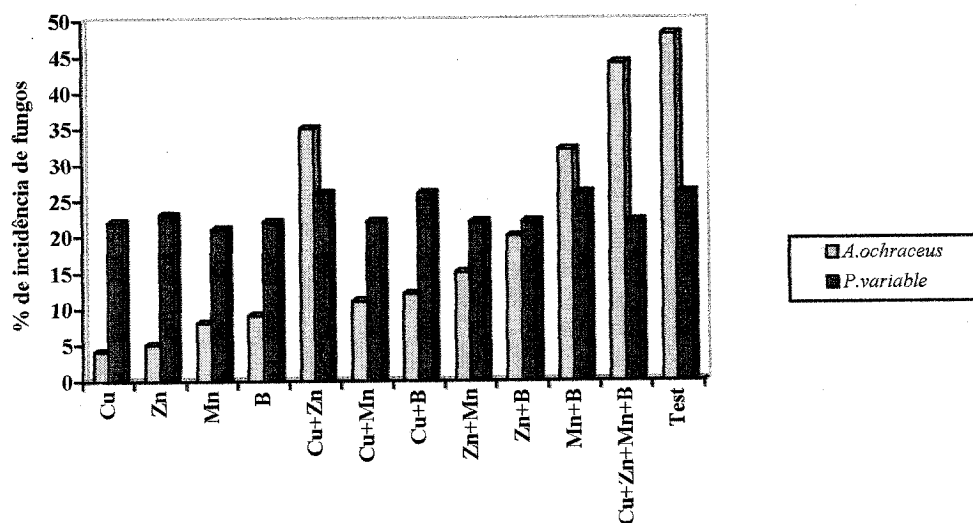
Levantamentos realizados em amostras de café para a detecção da ocorrência de micotoxinas demonstraram que a frequência de contaminação é extremamente baixa e quando a toxina é encontrada, o nível de contaminação é baixo (Tsubouchi et al., 1987; Levi, 1990; Mantle & Chow, 2000). Segundo Scussel (1998), vários

fatores influenciam o desenvolvimento desses fungos e a produção de metabólitos tóxicos. Dentre esses fatores, destaca-se a composição química do substrato. O baixo nível de contaminação por fungos potencialmente toxigênicos tem sido atribuído ao efeito inibidor da cafeína sobre a produção de micotoxinas (Buchanan et al., 1983).

**TABELA 3** – Porcentagem de ocorrência de fungos<sup>1</sup> em grãos de café beneficiado, desinfestado com hipoclorito de sódio e pulverizados com micronutrientes. UFLA – Lavras (MG), 2000.

Tratamentos	Incidência em grãos (%)			
	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	<i>Penicillium variable</i>	<i>Fusarium semitectum</i>	<i>Aspergillus ochraceus</i>
Cu	16,0 b	22,0 a	14,0 c	4,0 c
Zn	11,0 b	23,0 a	12,0 c	5,0 c
Mn	15,0 b	21,0 a	15,0 c	8,0 c
B	17,0 b	22,0 a	12,0 c	9,0 c
Cu+Zn	32,0 a b	26,0 a	28,0 b	35,0 b
Cu+Mn	36,0 a b	22,0 a	28,0 b	11,0 c
Cu+B	36,0 a b	26,0 a	36,0 a b	12,0 c
Zn+Mn	38,0 a b	22,0 a	34,0 a b	15,0 c
Zn+B	36,0 a b	22,0 a	36,0 a b	20,0 b c
Mn+B	32,0 a b	26,0 a	31,0 a b	32,0 b
Cu+Zn+Mn+B	48,0 a	22,0 a	29,0 a b	44,0 a
Testemunha	44,0 a	26,0 a	36,0 a b	48,0 a

<sup>1</sup>Médias com a mesma letra na coluna são estatisticamente iguais pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.



**FIGURA 1** – Porcentagem média de ocorrência interna de fungos potencialmente produtores de OTA em amostras de café beneficiado submetidas a pulverizações com micronutrientes, safra 1999/2000. Lavras-MG, UFLA, 2000.

**TABELA 4** – Ocorrência de Ocratoxina A (OTA) em amostras de café beneficiado submetidas a pulverização com micronutrientes. UFLA(MG), 2000

Tratamentos	DET. ((mg/Kg)
1	ND
2	ND
3	ND
4	ND
5	ND
6	ND
7	ND
8	ND
9	ND
10	ND
11	ND
12	ND

ND – Não detectada

Chalfoun et al. (2000) constataram que a cafeína pode exercer uma atividade biológica contra uma variedade de fungos, inclusive os toxigênicos. Neste estudo, o fato de a contaminação interna ter sido inferior à contaminação externa sugere que a cafeína possa ter exercido um efeito inibidor no crescimento desses fungos, inibindo, conseqüentemente, a produção da OTA. Entretanto, alguns relatos indicam alta contaminação interna de fungos toxigênicos em amostras de café, sendo também detectada ocratoxina A em níveis superiores aos propostos pela União Européia (Truckess et al., 1999; Urbano et al., 2000; Leonil et al., 2000), inferindo-se que outros fatores, além da composição do substrato, podem influenciar a ocorrência de fungos toxigênicos e produção de micotoxina.

Dentre os fatores que favorecem o desenvolvimento fúngico, ressalta-se a temperatura, umidade relativa, conteúdo de umidade, predomínio de linhagem toxigênica, composição do substrato e competição microbiana (Scussel, 1998; Moss, 1998). Com isso, sugere-se que, nas condições deste estudo, todos esses fatores podem ter contribuído para uma menor infestação interna dos fungos toxigênicos e inibição da produção de ocratoxina A, e não apenas o efeito da cafeína, já que, em

alguns casos, esses fungos podem infectar grãos de café e produzir micotoxinas.

### CONCLUSÕES

Nas condições em que foi desenvolvido este trabalho, conclui-se que:

a) Todos os micronutrientes (Cu, Zn, Mn e B), aplicados isoladamente, foram efetivos na redução da incidência dos fungos *Aspergillus ochraceus*, *Fusarium semitectum*, *Cladosporium cladosporioides*. Entretanto, quando esses foram aplicados em associação, esse efeito não foi verificado, especialmente quando todos foram aplicados em conjunto.

b) Os micronutrientes não reduziram a porcentagem média de ocorrência do fungo *Penicillium variabile*, mesmo quando aplicados isoladamente.

c) A ocorrência de ocratoxina A não foi verificada em nenhuma das amostras analisadas, mesmo quando detectou-se a presença do fungo *Aspergillus ochraceus* em porcentagem média de ocorrência de 50%.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, E. População fúngica associada ao café (*Coffea arabica* L.) beneficiado e às fases pré e pós colheita-relação com a bebida e local de cultivo. 1996. 48 p. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMIST. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 15. Ed. Washigton, 1990. 2 v.

BECKER-RATERINK, S.; MORAES, W. B. C.; QUIJANO-RICO, M. La Roya del cafeto conocimiento y control. Eschoborn: Deutsche Gesellschaft fur Technische Zusammenarbeit, 1991. 281 p.

BELL, A. Role of nutrition in diseases of cotton. In: ENGELHARD, A. W. (Ed.). Soilborne Plant Pathogens: management of disease with Macro-and Microelements. Saint Paul: APS Press, 1989. p. 167-204.

BITANCOURT, A. A. O tratamento das cerejas do café para melhorar a bebida. O Biológico, São Paulo, v. 23, n. 1 p. 1-11, jan. 1957.

BUCHANAN, R. L.; HARRY, M. A.; GEALT, M. A. Cafefeine inhibition of steigmatocystin, citrinin, and patulin production. Journal of Food Science, Chicago, v. 48, p. 1226-1228, 1983.

- CARVALHO, V. D. Cafeicultura empresarial: produtividade e qualidade - qualidade do café. Lavras: UFLA/FAEPE, 1997. 73 p.
- CHALFOUN, S. M.; PEREIRA, M. C.; ANGÉLICO, C. L. Efeito da cafeína (1,3,7-trimetilxantina) sobre o crescimento micelial, de fungos associados ao café. Revista Brasileira de Armazenamento, Viçosa, n.1, p. 50-53, 2000. Especial.
- FERIA-MORALES, A. M. Changes in cup quality when using innovative field practices. London: International Coffee Organization, 1990. p. 2-8. (Sensory-Report).
- FRANK, J. M. Toward the prevention of mould mediated quality loss. HACCP analysis of an outdoor process. In: COLOQUE SCIENTIFIQUE INTERNATIONAL SUR LE CAFÉ, 17., 1998, Nairobi. Proceedings... Paris: ASIC, 1998. p. 61-68.
- FREITAS, R. F. Fungos associados a grãos de café (*Coffea arabica* L.) beneficiado de diversos municípios da Região Sul de Minas Gerais.. 2000. 71 p. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- GRAHAM, R. D. Effects of nutrient stress on susceptibility of plants to disease with particular reference to the trace elements. Advances in Botanical Research, San Diego, v. 10, p. 221-276, 1983.
- GRAHAM, R. D.; WEBB, M. J. Micronutrients and disease resistance and tolerance in plants. In: MORTVEDT, J. J., GIORDANO, P. M.; LINDSA, W. L. (Ed.). Micronutrients and agriculture. 2. ed. Madison: SSSA, 1991. p. 329-370.
- LEONIL, L. A. B.; FURLANI, R. P. Z.; VALENTE SOARES, L. M.; OLIVEIRA, P. L. C.; SAWAZAKI, E. Ochratoxin A in Brazilian green coffee. In: INTERNATIONAL IUPAC SYMPOSIUM ON MYCOTOXINS AND PHYCOTOXINS, 2000, Guaruja. Abstracts... Guarujá: IUPAC, 2000. p. 143.
- LEVI, C. P. Mycotoxins in coffee. Journal of Association Official Analytical Chemistry, Washington, v. 6, p. 1282-1285, 1990.
- LEWIS, D. H. Boron, lignification and origin of vascular plant a unified hypothesis. New Phytologist, London, v. 84, p. 209-229, 1980.
- MANTLE, P. G.; CHOW, A. G. Ochratoxin formation in *Aspergillus ochraceus* with particular reference to spoilage of coffee. International Journal of Food Microbiology, Amsterdam, v. 56, p. 105-109, 2000.
- MARSCHNER, H. Mineral nutrition of higher plants. London: Academic Press, 1986. 672 p.
- MAZZANI, C. Hongos associados a grãos de cereais armazenados em Venezuela. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE MICOTOXICOLOGIA, 1.; ENCONTRO NACIONAL DE MICOTOXINAS, 8., 1994, Rio de Janeiro. Anais... Rio de Janeiro: [s.n.], 1994. p. 58-60.
- MEIRELLES, A. M. A. Ocorrência e controle da microflora associada aos frutos de café (*Coffea arabica* L.) provenientes de diferentes localidades do estado de Minas Gerais. 1990. 71 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- MOSS, M. O. Recent studies of micotoxins. Journal Applied Microbiology, Bedford, v. 84, p. 622s-676s, 1998. Symposium Supplement.
- NAKAJIMA, M.; TERADA, H.; HISADA, K.; TSUBOUCHI, H.; YAMAMOTO, K.; UDA, T.; ITOH, Y.; KAWAMURA, O.; UENO, Y. Determination of ochratoxin A in coffee bean and coffee products by monoclonal antibody affinity chromatography. Food & Agricultural Immunology, Nagoya, v. 2, p. 189-195, 1990.
- SAMSON, R. A.; HOEKSTRA, E. S.; FRISVAD, J. C.; FILTENBORG, O. Introduction to foodborne fungi. 4. ed. Baam:: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 1995. 332 p.
- SAS INSTITUTE. SAS technical report SAS/TAT software: changes and enhancement release 607. Cary, 1992.
- SCUSSEL, V. M. Micotoxinas em alimentos. Florianópolis: Insular, 1998. 144 p.
- SOUZA, S. M. C.; CARVALHO, V. L. Efeito de microorganismos na qualidade de bebida do café. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v. 18, n. 187, p. 21-26, 1997.
- STUDER-ROHR, J.; DIETRICH, D. R.; SCHLATTER, J.; SCHLATTER, C. The occurrence of ochratoxin A in coffee. Food and chemical toxicology, Zurich, v. 33, n. 5, p. 341-355, May 1995.

TRUCKESS, M. W.; GILER, J.; YOUNG, K.; WHITE, K. D.; PAGE, S.W. Determination and survey of ochratoxin A in wheat, barley, and coffee. *Journal of AOAC International*, Washington, v. 8, n. 1, p. 85-87, 1999.

TSUBOUCHI H.; YAMAMOTO K.; HISADA, K.; SAKABE, Y.; UDAGAWA, S. Effect of roasting on ochratoxin A level in green coffee beans inoculated with *Aspergillus ochraceus*. *Mycopathologia*, The Hague, v. 97, p. 111-115, 1987.

URBANO, G. R.; TANIWAKI, M. H.; BONES, A. de; LEITÃO, M. F. F. Incidence of toxigenic fungi and ochratoxin A detection in coffee from three Brazilian regions. In: INTERNATIONAL IUPAC SYMPOSIUM ON MYCOTOXINS AND PHYCOTOXINS, 2000, Guarujá. Abstract... Guarujá: IUPAC, 2000. p. 164.