UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

**Avaliação dos fatores de risco no processamento de café verde
para o aparecimento de ocratoxina A (OTA)**

Márcia Dimov Nogueira

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:
Prof^a. Tit. Marilene De Vuono C.Penteado

São Paulo
2007

DEDALUS - Acervo - CQ

30100013003

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

N778a Nogueira, Márcia Dimov
Avaliação dos fatores de risco no processamento de café
verde para o aparecimento de ocratoxina A (OTA) / Márcia
Dimov Nogueira. -- São Paulo, 2007.
96p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e
Nutrição Experimental

Orientador: Penteado, Marilene De Vuono Camargo

1. Alimento : Segurança : Saúde pública 2. Café : Agricultura
I. T. II. Penteado, Marilene De Vuono Camargo, orientador.

614.31 CDD

Márcia Dimov Nogueira

Avaliação dos fatores de risco no processamento de café verde
para o aparecimento de ocratoxina A (OTA)

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof^a. Tit. Marilene De Vuono Camargo Penteado
orientadora/presidente

1º. Dr. Odair Zenebon

2º. Profº Tit. Benedito Correa

3º. Prof^a. Úrsula Maria Lanfer Marquez

4º. Profº Jorge Mancini Filho

São Paulo, 03 de abril de 2007.

Dedico (In memoriam)

Aos meus pais Nicolau e Luiza

e

À minha nonna Giuseppina Pilat

À minha família por todo apoio, carinho e amor

Agradecimentos

Este trabalho deve muito a algumas pessoas e instituições, por diferentes razões:

Ao Instituto Adolfo Lutz (IAL) e à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP pela oportunidade de realização deste estudo.

À Prof^a. Marilene De Vuono C. Penteado pela orientação, paciência, confiança e amizade.

À Dra. Dilma Scala Gelli, pesquisadora exemplo de trabalho e seriedade, pela confiança na minha capacidade de trabalho.

À Dra Myrna Sabino pela sua orientação na parte experimental, sugestões e por colocar seu laboratório à disposição para realização de parte deste trabalho.

À Elza G. S. Badolato pelas oportunidades criadas durante seu período no Instituto Adolfo Lutz.

Ao Dr. Odair Zenebon, diretor da Divisão de Bromatologia e Química do IAL e a Deise Ap. Pinatti Marsiglia, diretora do Serviço de Alimentos do IAL pelo apoio e consideração.

À Coordenadoria de Assistência Técnica Integral, CATI, pelo excelente trabalho realizado no Estado de São Paulo, com dados disponíveis a todo pesquisador que necessitar de informações de agricultura. Especialmente, à equipe da Regional Agrícola de São João da Boa Vista que não mediu esforços para que este trabalho se realizasse e que nos ensinou tudo sobre o processamento primário de café verde e ao Dr. João Toledo da CATI Campinas pelo seu auxílio.

A Embrapa Café, especialmente ao Dr. Antonio de Pádua Nacif que tanto trabalhou para que diversos estudos nesta área fossem realizados.

Ao Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café CBP&D/Café pelo financiamento desse estudo.

A Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado do Paraná, EMATER/ PR, especialmente ao Engº. Agr. Cilésio Abel Demoner pelo seu auxílio.

Ao Dr. João Henrique Segges do Ministério da Agricultura/ RJ pela sua sabedoria e colaboração.

À equipe da BioRio que auxiliou a realizar este trabalho colocando-nos em contato com produtores da região.

Ao Sr. Everardo Tardin Erthal pela forma cordial e prestimosa de colaboração.

Às amigas Cristiane B. Cano, Maria Luiza Barbosa e Márcia Bittar Atuí por excelentes sugestões e pela sinceridade de nossa amizade acima de qualquer outra coisa.

Às colegas da Seção de Microscopia Alimentar pelo estímulo e pelas boas vibrações.

À Adriana Almeida Barreiros, Bibliotecária Conjunto das Químicas da Universidade de São Paulo pelo seu profissionalismo.

A todos agradeço, profundamente, e dedico o resultado do trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS e QUADRO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
RESUMO.....	xiii
 1 - INTRODUÇÃO.....	 1
 2 - REVISÃO DA LITERATURA.....	 3
2.1 Café.....	3
Aspectos históricos	3
Aspectos econômicos.....	5
Aspectos botânicos.....	6
2.1.1 Processamento primário de café verde.....	8
2.1.1.1 Preparação para colheita.....	9
2.1.1.2 Colheita.....	9
2.1.1.3 Pós colheita.....	10
Lavador e despulpador.....	10
Secagem.....	12
Terreiros.....	12
Secador mecânico.....	13
Tulhas.....	14
Beneficiamento	15
Ensacamento.....	17
2.2 Ocratoxina A.....	18
2.2.1 Aspectos gerais.....	18
2.2.2 Aspectos toxicológicos da OTA	19
2.2.3 Exposição humana e avaliação de risco.....	20
2.2.4 Metodologia e legislação	22

2.2.5 Fatores que propiciam o desenvolvimento de fungos e a produção de OTA.....	24
2.2.5.1 Fatores abióticos.....	24
2.2.5.2 Fatores bióticos.....	26
Fungos.....	26
Insetos e ácaros.....	28
2.2.6 Ocorrência de fungos e OTA em café.....	30
3 - OBJETIVOS.....	34
3.1 Objetivo geral.....	34
3.2 Objetivos específicos.....	34
4 - MATERIAL e MÉTODOS.....	35
4.1 Material.....	35
4.1.1 Amostragem.....	36
4.1.1.1 Campo.....	36
4.1.1.2 Via seca/ Via úmida.....	37
4.1.1.3 Armazém.....	37
4.2 Métodos.....	37
4.2.1 Fluxograma do processamento primário de café verde.....	37
4.2.2 Isolamento de fungos toxigênicos.....	39
4.2.3 Identificação de fungos toxigênicos.....	39
4.2.4 Isolamento de artrópodes.....	39
4.2.5 Identificação de insetos.....	39
4.2.6 Identificação de ácaros.....	40
4.2.7 Determinação do porcentual de grãos brocados.....	40
4.2.8 Determinação da atividade de água.....	40
4.2.9 Determinação de OTA em café verde.....	40
4.3 Análise estatística.....	41

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
5.1 Aspectos gerais das regiões amostradas.....	43
5.2 Café de campo.....	44
Determinação de OTA.....	45
Análise de fungos.....	45
Análise de artrópodes.....	47
5.3 Via seca.....	50
Determinação de OTA.....	50
Análise de fungos.....	53
Análise de artrópodes.....	56
5.4 Via úmida.....	58
Determinação de OTA.....	59
Análise de fungos.....	62
Análise de artrópodes.....	63
5.5 Armazém.....	66
Determinação de OTA.....	66
Análise de fungos.....	67
Análise de artrópodes.....	69
5.6 Café de varrição.....	70
Determinação de OTA.....	71
Análise de fungos.....	72
Análise de artrópodes.....	73
5.7 Comparação das etapas de processamento.....	73
5.8 Fatores de risco e o aparecimento da OTA.....	76
 6 - CONCLUSÕES.....	 80
 7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	 81

LISTA DE FIGURAS

Figuras	Título	Página
1	Lavador e separador de frutos de café.....	10
2	Despolpador e desmucilador de frutos de café.....	11
3	Terreiro de café coco, via seca.....	12
4	Terreiro de café cereja descascado, via úmida.....	13
5	Secador mecânico horizontal.....	14
6	Tulhas para descanso e armazenamento de café (A), detalhe da construção da tulha (B)	15
7	Máquina beneficiadora de café (A), detalhe da peneira separadora (B).....	16
8	Sacas de 60 Kg de café verde, empilhadas.....	17
9	Estrutura química das ocratoxinas	18
10	Mapas das regiões amostradas.....	36
11	Fluxograma do processamento primário de café verde.....	38
12	Distribuição de fungos <i>Penicillium</i> sp nas regiões estudadas Paraná (PR), Rio de Janeiro (RJ) e São Paulo (SP).....	46
13	Frequência de insetos (Ordens Diptera, Homoptera, Coleoptera e Hymenoptera) no café cereja nas regiões estudadas.....	48
14	Distribuição de ácaros de solo (Ac solo), ácaros de campo (Ac campo) e ácaros da família Acaridae nas regiões estudadas, PR, RJ e SP.....	49
15	Medidas de atividade de água (Aa) de frutos bóias colhidos em terreiro, na via seca, nas três regiões estudadas.....	51
16	Medidas de atividade de água (Aa) de frutos bóias colhidos em tulha na via seca, nas três regiões estudadas.	53
17	Distribuição de fungos potencialmente toxigênicos, na via seca, para as três regiões de coleta.....	55
18	Distribuição de insetos, via seca, para as três regiões de coleta.....	56

19	Distribuição de ácaros na via seca para as três regiões de coleta.....	58
20	Medidas de atividade de água (Aa) em amostras de terreiro da via úmida, nas regiões estudadas.....	60
21	Medidas de atividade de água (Aa) de frutos cereja descascados colhidos em tulha na via úmida, nas três regiões estudadas.....	60
22	Distribuição de fungos potencialmente toxigênicos, via úmida, para as três regiões de coleta.....	63
23	Distribuição de insetos da Ordem Coleoptera (broca do café) via úmida, para as três regiões de coleta (PR, RJ e SP).....	64
24	Distribuição do porcentual de grãos brocados durante a via úmida, em fruto pergaminho.....	65
25	Distribuição de ácaros, via úmida, para as três regiões de coleta.....	66
26	Distribuição de fungos na etapa de armazém em SP e RJ.....	69
27	Distribuição de insetos e ácaros na etapa de armazém.....	70
28	Gráfico setorial representando a presença (verde) e ausência (vermelho) de OTA encontrada no café de varrição.....	71
29	Distribuição de OTA nas diversas etapas do processamento primário de café verde.....	76

LISTA DE TABELAS

Tabela	Nome	Página
1	Análise descritiva para bolores e leveduras (log UFC/cereja) isolados na fase de campo, fruto cereja, do processamento primário de café verde.....	45
2	Amostras coletadas do processamento primário de café verde, via seca e prevalência de OTA.....	50
3	Análise descritiva da via seca para bolores, leveduras, <i>Aspergillus</i> seção <i>Nigri</i> , e <i>Penicillium</i> spp.....	54
4	Análise descritiva da infestação por insetos em frutos bóia e verdes na via seca.....	57
5	Amostras da via úmida proveniente da tulha, Cornélio Procópio/PR.....	61
6	Análise descritiva da via úmida para bolores, leveduras, <i>Aspergillus</i> seção <i>Nigri</i> , <i>A. ochreaceus</i> e <i>Penicillium</i> spp (log UFC/cereja).....	62
7	Análise descritiva da via seca para bolores, leveduras, <i>Aspergillus</i> seção <i>Nigri</i> e <i>Penicillium</i> spp (log UFC/cereja).....	68
8	Análise descritiva de café de varrição para bolores ,leveduras, <i>Aspergillus</i> seção <i>Nigri</i> e do gênero <i>Penicillium</i> spp.....	72
9	Valores médios de OTA encontrados nas etapas de processamento e seus respectivos intervalos de confiança.....	74
10	Significância da análise de associação entre os fatores derisco estudados e a presença de OTA.....	77
11	Razão de chances para os fatores significantes relacionados a presença da OTA.....	78

Quadro

1	Países e limites máximos de OTA em café verde e torrado.....	24
---	--	----

ABSTRACT

The ochratoxin A (OTA) is considered to be among the most significant coffee contaminants with related hazards. With the purpose to study the origin of the OTA in the processing of green coffee and to evaluate the possible risk factors (region, step of processing, fungi, insects and mites) that could contribute in the OTA presence, had been selected three regions (states) of Brazil: Bom Jardim/RJ, Espírito Santo do Pinhal/SP and Cornélio Procópio/PR. A total of 109 samples of coffee beans were collected in conformity with flow chart established at different stages of ripening and processing: cherry (field), dry method, wet method, and warehouse and varrição coffee, from May to August of 2002. Of these samples 10 had presented OTA, which varied in its quantification from 3 to 101 ng.g⁻¹. The biggest prevalence of OTA was the varrição coffee 57%, the wet method presented a prevalence of 10,3% and dry way 7%. In the stage cherry fungi potentially toxigenic was more found *Penicillium* spp, the insects had been the larvae of Diptera and the Homoptera; in the wet way it was found *Aspergillus* section *Nigri* and *Circundatti* and *Penicillium* spp, the predominant infestation was the coffee berry borer and the mite of the Acaridae family; in the stage wet methods spp was registered the isolation the *Penicillium* spp and *Aspergillus* section *Nigri*, the predominant infestation was the coffee berry borer together with the mites of the Acaridae family; in the stage of warehouse had been isolated *Penicillium* spp and *Aspergillus* section *Nigri*, and the predominant insect was the coffee berry borer and mites of the family Acaridae; in the varrição coffee had been isolated *Penicillium* spp and *Aspergillus* section *Nigri* the coffee berry borer was the most present insects together of Diptera. The results of each step had been with compared by Analysis of Variance. In the analysis of risk factors the “varrição coffee” was the factor most strongly related to the risk of the presence of OTA ($p < 0,001$).

RESUMO

Dentre os perigos relacionados com a produção de café verde, a ocratoxina A (OTA) é considerada significativa nesse produto. Com o objetivo de estudar a origem da OTA no processamento de café verde e avaliar os possíveis fatores de risco (região, etapas do processamento, fungos, insetos e ácaros) que poderiam contribuir na presença de OTA, foram amostradas três fazendas nos seguintes municípios: Bom Jardim (RJ), Espírito Santo do Pinhal (SP) e Cornélio Procopio (PR), onde havia a produção de café verde pela via seca e úmida. Foram coletadas 109 amostras de grãos de café, em diversas etapas do processamento, no período de maio a agosto de 2002. As amostras foram colhidas de acordo com fluxograma estabelecido e as etapas estudadas foram: cereja (campo), via seca, via úmida, armazém e café de varrição. Dessas amostras, 10 apresentaram OTA, que variou na sua quantificação de 3 a 101 ng.g⁻¹. A maior prevalência de OTA foi a do café de varrição 57%, a via úmida apresentou uma prevalência de 10,3% e a via seca 7%. Na etapa cereja o fungo potencialmente toxigênico mais encontrado foi *Penicillium* spp, e quanto aos insetos, as larvas de Diptera e os Homoptera; na via úmida foram encontradas linhagens do *Aspergillus* seção *Nigri* e *Circundatti* e *Penicillium* spp, a infestação predominante foi a broca do café e os ácaros da família Acaridae; na etapa via seca registrou-se o isolamento de fungos do gênero *Penicillium* spp e *Aspergillus* seção *Nigri*, a broca do café foi a infestação predominante junto com os ácaros da família Acaridae, na etapa de armazém foram isolados *Penicillium* spp e *Aspergillus* seção *Nigri*, o inseto predominante foi a broca do café e os ácaros da família Acaridae; no café de varrição foram isolados *Penicillium* spp e *Aspergillus* seção *Nigri* e a broca do café estava presente junto com insetos da Ordem Diptera. Os resultados de cada etapa foram comparados por Análise de Variância em um nível de significância de 95%. Na análise de fatores de risco o café de varrição foi o mais significativo ($p < 0,001$).

1 - INTRODUÇÃO

O café é consumido em grandes quantidades, tanto frio como quente, por 1/3 da população mundial, sendo sua popularidade atribuída ao efeito estimulante (VINCENT, 1989).

Mais de 50 nações que dispõem de terras tropicais, altas e úmidas, são produtoras de café, pois, sua exportação gera ganhos de aproximadamente 10 bilhões de €/ano, sendo, portanto um importante produto agrícola. (VAN DER STEGEN, 2003).

No comércio internacional de café, duas espécies são importantes, a *Coffea arabica* e a *Coffea canephora*. A primeira espécie representa 2/3 da produção mundial e vem principalmente das Américas do Sul e Central, os outros 1/3 da África e da Ásia. Os maiores produtores mundiais de *Coffea arabica* são o Brasil, Colômbia, México e Guatemala, enquanto que na Indonésia, Vietnã, Costa do Marfim, Índia, Uganda e Etiópia predominam *Coffea canephora*. Alguns países exportam quantidades substanciais das duas espécies, ex. Brasil, Equador e Índia (VAN DER STEGEN, 2003).

Um dos perigos à saúde relacionados ao café é a ocratoxina A (OTA), toxina produzida por algumas espécies de fungos. Vários estudos demonstraram a presença de OTA em café verde, café torrado, bebida de café e em café instantâneo (PATEL *et al.*, 1997, STUDER-ROHR *et al.*, 1994, MICCO *et al.*, 1989, TSUBOCHI *et al.*, 1988, LEVI, TRENK, MOHR, 1974), contudo diferentes metodologias são utilizadas para quantificar a OTA nesses produtos.

Devido à importância da OTA para a saúde humana, alguns países consumidores revisaram suas legislações para estabelecer limites de concentração desta toxina no café verde, torrado e em café torrado e moído (WALKER, 1999).

Recentemente, dois alertas máximos foram expedidos pela União Européia ao Itamarati – Ministério da Agricultura, sobre a devolução de lotes de café verde brasileiro exportados, com níveis indesejáveis de OTA ($>10 \text{ ng.g}^{-1}$) (CHALFOUN, 2003), fazendo com que a pesquisa nesta área fosse priorizada.

A OTA é a causa de nefropatia em porcos e parece estar relacionada com a etiologia de uma enfermidade renal humana, denominada nefropatia endêmica dos Bálcãs e nos tumores do trato urinário. Desde que foram publicados dados sobre sua genotoxicidade, seu risco foi comparado com o da aflatoxina. A origem da OTA, na alimentação, tem preocupado os órgãos de saúde pública de vários países, sendo portando abordados em seus programas de controle (WALKER, 1999).

Quando detectada nos alimentos, as quantidades desta toxina oscilam em geral do limite de detecção, atualmente, menor que 1 ng.g^{-1} a dezenas de ng.g^{-1} . Ocasionalmente, é encontrada em quantidades extremas, em níveis de centenas de ng.g^{-1} , evidenciando o potencial da exposição humana a diferentes condições (FRANK, 1999).

A presença da OTA pode estar relacionada com os artrópodes que infestam as plantações modificando as condições físicas dos frutos, tornando-os mais vulneráveis ao ataque de fungos produtores de OTA (CASTRO e LEITÃO, 2002, BUCHELLI *et al.*, 2000 e VEGA e MERCADIER, 1998).

A crescente preocupação mundial com a segurança e qualidade dos alimentos requer que o processamento dos produtos alimentares tenha acompanhamento desde sua origem até o consumo. O sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) é indicado como o método mais eficiente para garantir a qualidade e segurança alimentar. Assim, o estudo do processamento primário do café verde é uma das principais etapas para o controle deste perigo.

2 - Revisão da Literatura

2.1 Café

Aspectos históricos

Embora existam algumas divergências quanto ao local e a época exata em que se iniciou o cultivo e o uso sistemático do café, parece que foi na África (Etiópia) o aparecimento do gênero *Coffea*, num território denominado “Kaffa” cujo nome se deriva o café. Credita-se ao povo árabe, devido a seus processos expansionistas, serem os grandes disseminadores da espécie por todo o mundo (TAUNAY, 1945, LECOMTE, 1899).

Tudo leva a crer que exemplares nativos dessa espécie podiam ser encontrados em toda a faixa equatorial que atravessa o continente africano, desde a Etiópia até o Congo, alcançando o sul de Angola. A partir de seus centros de origem e de dispersão, o café iniciou sua grande migração ao redor do mundo. Com os árabes, seu cultivo foi levado para as regiões litorâneas do Mar Vermelho. Em 1690, o café foi dali para as ilhas de Java, Bornéu e Sumatra, na Indonésia, levado pelos holandeses. Da Indonésia, rapidamente partiu para as terras do atual Sri Lanka, no Oceano Índico, por onde chegou à Índia e penetrou no continente asiático (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ, ABIC, 2005).

No início do século XVII, o café proveniente dessas regiões alcançava altos preços no mercado europeu e já era fartamente comercializado pelos holandeses e venezianos (ABIC, 2005). Na América do Sul, a primeira região invadida pelo café foi o Suriname e depois a Guiana Francesa (TAUNAY, 1945).

A entrada do cafeeiro no Brasil aconteceu em 1727 e seu introdutor foi o Sargento Mor Francisco Mello Palheta, oficial de linha no exército português, que trouxe de Caiena para Belém os primeiros grãos de café plantados no Brasil. A esposa do

governador de Caiena, Cláudio d'Orvilliers, presenteou Palheta com as primeiras árvores e muitas sementes, agradecida pela sua lisura ao resolver conflito de invasão de terras da época (entre franceses e portugueses), fato relatado pelo bispo do Pará, Fr. João de São José de Queirós (TAUNAY, 1945).

Embora o café tenha sido introduzido no norte do país, acabou por se instalar definitivamente na Região Sudeste devido a fatores climáticos exigidos pela cultura. Foi, principalmente, no Rio de Janeiro e depois em São Paulo e Minas Gerais que se localizou a riqueza cafeeira do Brasil. No final do século XVIII, o café chegava ao Vale do Paraíba, no Estado de São Paulo: era o início da grande saga do café do Brasil. Alguns anos depois, na região de Campinas, porta de entrada para as áreas paulistas de "terra roxa", as plantações de café começaram a mostrar todo o seu potencial econômico (ABIC, 2005)

No século XIX, o café já era o maior artigo de exportação brasileira e o Estado de São Paulo já aparecia nas listas dos grandes produtores e exportadores de café. Em 1920, o Brasil passou a ocupar o primeiro lugar entre os países exportadores de café de todo o mundo, posição esta que manteve por muitos anos e que ligou seu nome, de maneira definitiva, com a imagem do café (TAUNAY, 1945). Embora, o Brasil continue ainda como maior exportador de café sua participação é decrescente. Na década de 20 o café representava 70% das exportações brasileiras, em 1960 baixou para 50% e na década de 90 para 22% (ORMOND, De PAULA, FAVARET FILHO, 1999).

As plantações foram se diversificando, os governos e os produtores começaram a investir em pesquisas para o melhoramento da espécie e para a criação de novas linhagens e no desenvolvimento de técnicas de plantio, colheita e beneficiamento. Existem inúmeras variedades de cafés conhecidos como Arábica de maior ou menor produtividade, rusticidade e resistência às pragas e às intempéries; mais ou menos exigentes de cuidados dos quais se obtêm grãos, pós e bebidas de

qualidades e preços também extremamente variados (INTITUTO AGRONÔMICO de CAMPINAS, IAC, 2005).

Algumas variedades muitas vezes obtidas por meio de experimentos de seleção, cruzamentos, hibridação ou por puro acaso genético nasceram e se desenvolveram em terras e solos brasileiros. A produção comercial de café realiza-se somente em terras altas tropicais e subtropicais úmidas, normalmente não expostas a geadas. *Coffea arábica* (café arábica) e *Coffea canephora* (café robusta) são as espécies de importância comercial (IAC, 2005).

Dentre os países produtores de café no mundo, o Brasil é o único sujeito a geadas e secas. Essas adversidades climáticas quando ocorrem, causam importantes impactos na produção nacional de café com reflexos expressivos no mercado internacional. As geadas com efeitos catastróficos à cafeicultura nacional ocorreram nos anos de 1902, 1918 e 1975. Além das geadas, em 1963 e 1985 registrou-se seca nas regiões produtoras de café provocando drásticas reduções nas safras dos anos subseqüentes (IAC, 2005).

Aspectos econômicos

De todo café do mundo, $\frac{3}{4}$ é produzido por pequenos agricultores, sendo estimado que 250 milhões de pessoas são dependentes da produção de café. (VAN DER STEGEN, 2003)

O Brasil, o maior produtor de café, é responsável por 28% da produção mundial. Em segundo lugar aparece a Colômbia com 14%, seguida pela Indonésia com 7%, México e Vietnã com 5%. A África participa com 20% da produção mundial sendo o seu maior produtor a Costa do Marfim. A América Central participa com 14% e outros países com 7%. A produção mundial de café nos últimos dez anos situou-se, em média, em 97 milhões de sacas de 60 kg (INSTITUTO AGRONOMICO do PARANÁ, IAPAR, 2005).

O principal Estado brasileiro produtor de café é Minas Gerais (MG) (53%), seguidos do Espírito Santo (ES) (21%), São Paulo (SP) (11%), Paraná (PR) (5%), Bahia (BA) (5%), Rondônia (RO) (3%) e de outros (3%). São Paulo e Paraná possuem o parque cafeeiro constituído, exclusivamente, por *Coffea arábica*, enquanto a Bahia, Minas Gerais, Espírito Santo, por *Coffea arábica* e *Coffea canephora* e, finalmente, Rondônia, por *Coffea canephora*. Bahia e Rondônia são áreas emergentes da cafeicultura brasileira, apresentando uma forte expansão do parque cafeeiro devido às condições climáticas favoráveis e ao emprego de novas tecnologias. A produção brasileira de café, safra 2006/2007 foi de 42 milhões de sacas de 60 kg/ produto beneficiado, sendo 33 milhões de café arábica e 9 milhões de café robusta. Na safra anterior, o total colhido foi 32 milhões de sacas. (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, CONAB, 2007).

Os países ricos consomem mais café que aqueles com renda menor, podendo-se relacionar o maior consumo de café com as baixas temperaturas como no norte da Europa. A Finlândia lidera o ranking, com consumo médio de 12,4 kg/hab/ano, seguida pela Suécia com 11,4 kg/hab/ano, Noruega com 11,3 kg/hab/ano e a Dinamarca com 10,5 kg/hab/ano. Os EUA, com uma demanda anual de 18 milhões de sacas de 60 kg, destacam-se como o maior consumidor, contudo o consumo per capta é de apenas 4,01 kg/hab/ano. Na Alemanha e na França, grandes consumidores, o consumo per capta é de 7,6 e 5,7 kg/hab/ano respectivamente. Na Itália, Espanha e Reino Unido, o consumo per capta de café é de 4,8 kg/hab/ano, 4,3 e 2,5 kg/hab/ano respectivamente. No Brasil, o consumo per capta gira em torno de 3,7 kg/hab/ano, pequeno quando comparado com alguns países europeus, porém em volume anual, algo perto de 11,4 milhões de sacas, ficando atrás apenas dos EUA e Alemanha (IAPAR, 2005).

Aspectos botânicos

O café pertence à família Rubiaceae, sendo reconhecidos três gêneros de cafeeiro: *Coffea*, *Psilanthus* e *Nostolachma*. As classificações mais recentes

agrupam os cafeeiros em dois gêneros: *Coffea* e *Psilanthus*. O gênero *Coffea* compreende os subgêneros *Coffea* e *BaraCoffea*. Enquanto o subgênero *BaraCoffea* é representado por sete espécies, o subgênero *Coffea* abriga 80 espécies sendo aproximadamente 25 oriundas da África Continental e 55 de Madagascar (FAZUOLI, 2004)

Dentre as espécies conhecidas, *C. arábica* (café arábica) e *C.canephora* (café robusta) são as duas mais importantes no mercado internacional. Cerca de 70% do café negociado no mundo é do tipo arábica e 30% robusta. As outras espécies de café têm importância para serem utilizadas em programas de melhoramento de acordo com as características agrônômicas que possuem. (FAZUOLI, 2004).

A intensidade da floração se regula pela intensidade de luz e a floração começa com as primeiras chuvas após um período de seca e requerem novas chuvas após a floração, para assegurar um bom desenvolvimento do fruto. Apresenta ciclo bianual de produção de frutos, por sua alta sensibilidade. A maturação dos frutos é irregular de forma que se pode ver num mesmo talhão frutos cerejas, frutos verdes e flores (FAZUOLI, 2004).

A espécie arábica é de grande significado econômico para as regiões que a cultivam, especialmente as Américas, uma vez que seu produto é de qualidade superior (aroma e sabor mais apreciados no mundo inteiro) e de maior aceitação em todos os mercados consumidores. Existem várias variedades de *C.arabica* e mais de 40 mutantes já descritos (FAZUOLI, 2004).

C. canephora tem distribuição geográfica mais ampla. A variabilidade existente dentro da espécie é muito grande em relação ao tamanho e forma da planta, folhas, frutos e sementes. O sistema radicular dos representantes desta espécie é bem desenvolvido e a resistência às principais moléstias e pragas são acentuadas. O teor de cafeína e de sólidos solúveis em suas sementes é superior aos encontrados no café arábica (FAZUOLI, 2004).

2.1.1 Processamento de café verde.

Após a colheita dos frutos de café, dois diferentes tipos de processamento primário são utilizados: a via seca e a via úmida.

No Brasil a maior parte do café é produzida pela via seca, onde é seco com casca num processo que não contamina o meio ambiente, chamado de natural em substituição ao termo de terreiro. Atualmente, vem ganhando interesse o processo pela via úmida por produzir uma bebida mais apreciada e com isso agregando um importante atributo de qualidade ao produto, tornando-o mais rentável para o produtor (SÃO PAULO, 2001).

A via úmida é utilizada em duas versões: cereja descascado, utilizada pela maioria dos cafeicultores paulistas e desmucilado (SÃO PAULO, 2001). Nesta via os frutos do cafeeiro são separados pelo seu grau de maturação em frutos bóias, frutos verdes e cerejas, sendo separados no lavador e no descascador. Na versão cereja descascado, o fruto cereja é descascado e seco com a mucilagem. Na versão desmucilado, a mucilagem é removida, utilizando-se fermentação natural em tanques ou máquinas, chamadas desmuciladores, ou mecânica com areia, antes da secagem.

O café produzido pela via úmida apresenta vantagens, como a diminuição da área de terreiro e do tempo necessário para a secagem. Com a utilização desses processos, o volume ocupado por esses cafés nos secadores, silos e tulhas representa uma racionalização de até 60% em termos de espaço (ANDRADE, PEREIRA e VILLELA, 2005). Entretanto, requer altos investimentos e é mais trabalhoso.

2.1.1.1 Preparação para colheita

A limpeza da lavoura e a preparação do solo em volta do cafeeiro (arruação), antes da colheita e a limpeza no final da colheita são procedimentos importantes para que não permaneçam no solo frutos que originarão focos de infestação por insetos. A preparação das instalações da fazenda para o início da colheita é um fator importante de qualidade do produto. As instalações (terreiros, tulhas, etc.) e maquinários (lavadores, secadores, beneficiadores) devem ser limpos antes de cada colheita (SÃO PAULO, 2001).

2.1.1.2 Colheita

A colheita deve ser programada conforme o período de maturação da lavoura. A maior dificuldade prática na determinação do ponto de início de colheita baseia-se no fato de que a mesma deve ser efetuada com um máximo de frutos maduros denominados de frutos cereja, uma porcentagem mínima de frutos imaturos verdes e sem que uma grande quantidade de frutos secos tenha caído. A arruação e a colheita devem iniciar quando as plantas apresentarem a maioria de frutos no estágio cereja de 80 a 90% (CHALFOUN, 2005).

A colheita poderá ser feita de várias maneiras, sendo que a mais amplamente utilizada pelas fazendas visitadas é pela derriça em pano ou lona plástica. Inicialmente, colocam-se lonas ou panos, embaixo dos cafeeiros, para evitar que os grãos tenham contato com o chão. Deste modo, a colheita é feita de uma só vez e os frutos apanhados simultaneamente, em vários estágios de maturação: maduros, parcialmente secos, passa e imaturos. Cafés colhidos seletivamente têm maior qualidade desde que bem processados (SÃO PAULO, 2001). A qualidade do café depende além do processamento propriamente dito, de vários fatores como: variedade, clima, solo, tratamento fitossanitário, dentre outras (PEREIRA, VASCONCELOS e SALES, 1999).

O café deve ser rapidamente encaminhado para o local de preparo, jamais permanecendo amontoado de um dia para o outro, pois assim os frutos podem sofrer um rápido processo de deterioração e, conseqüentemente, perda de qualidade (SÃO PAULO, 2001).

2.1.1.3 Pós-colheita

Lavador e despulpador

FIGURA 1: Lavador e separador de frutos de café.

Os frutos colhidos são encaminhados para os lavadores, próximos ao terreiro, onde são separados por densidade, Figura 1. Os lavadores têm duas funções, a primeira é separar os diferentes frutos por peso e a segunda é limpá-los eliminando impurezas como terra, paus, etc. Dos lavadores são obtidas as duas parcelas:

- a) bóia constituída de frutos mais leves que bóiam, refere-se àqueles que secaram na planta, apresentando alguma anormalidade em seu processo de maturação (frutos brocados, mal granados),
- b) frutos cerejas e verdes, que são mais densos e afundam.

Esta última parcela é encaminhada ao despulpador, Figura 2, que separa frutos cerejas dos frutos verdes, onde há a separação dos envoltórios dos frutos cereja (epicarpo e mesocarpo), (CHALFOUN, 2005).

. **FIGURA 2:** Despulpador e desmucilador de frutos de café.

Secagem

a) Terreiros

Após a passagem dos frutos pelo lavador e despulpador, obtêm-se três parcelas de frutos: cereja descascado, bóia e verde. Cada parcela é encaminhada ao terreiro específico. A parcela bóia e verde dará origem ao café coco, Figura 3, e a parcela cereja descascado originará o café pergaminho, Figura 4, que passará pelo terreiro para uma pré-secagem antes de ser encaminhada para o secador mecânico onde completará sua secagem.

A secagem ao sol pode ser em diversos tipos de terreiros: terra, asfalto, cimento, tijolo e suspenso e obedece a certos cuidados. No início, a parcela bóia deve ser esparramada em camadas finas de 2 a 3 cm de altura, observando-se sempre a direção do sol. Deve ser revolvido, no mínimo, 10 vezes ao dia, para acelerar a secagem e evitar o aparecimento de grãos fermentados e mofados, facilmente identificados e rejeitados pelo mercado. À noite deve ser amontoado e coberto por lonas; o mesmo procedimento é realizado em caso de clima chuvoso. Dependendo das condições climáticas, para o café atingir uma umidade em torno de 12-13% leva aproximadamente de 8 a 10 dias (SÃO PAULO, 2001).

FIGURA 3: Terreiro de café coco, via seca.

A parcela verde é esparramada em camadas mais grossas, cerca de 50 cm e revolvido cinco vezes ao dia, até que os frutos escureçam, isto é, tornem-se pretos por fora. Após esse procedimento procede-se como na parcela bóia. A secagem lenta e à baixa temperatura do fruto verde evita que os grãos se tornem verde-escuro ou preto-verde (SÃO PAULO, 2001).

A parcela cereja descascado é levada para o terreiro em camadas finas, não mais que 2,5 cm de altura e revolvido umas 20 vezes para evitar que os grãos grudem uns nos outros, podendo passar algumas horas no terreiro e seguir para o secador mecânico ou ser seco no próprio terreiro (SÃO PAULO, 2001).

FIGURA 4: Terreiro de café cereja descascado, via úmida.

b) Secador mecânico

A maioria dos secadores mecânicos é de fomalha com fogo indireto (trocador de calor) ou queimador de gás para evitar que o café fique com cheiro de fumaça, Figura 5. A própria casca do café poderá ser utilizada como combustível barato.

Os cafés colocados no secador deverão possuir teor de umidade uniforme. A massa de café dentro do secador não poderá ultrapassar 45°C para a parcela bóia, 40°C para cereja descascado e 30°C para frutos verdes, nesta última parcela para evitar sua transformação em defeitos verde-escuro e preto-verde. O café deve ser seco até atingir 11% de umidade e armazenado em tulhas (PEREIRA, VASCONCELOS E SALES, 1999).

FIGURA 5: Secador Mecânico horizontal.

Tulhas

O armazenamento do café, tanto em coco como em pergaminho, após a secagem, deve ser feito a granel em tulhas tecnicamente preparadas para tal fim. As tulhas além da função de guardar o café recém saído do terreiro ou do secador devem funcionar durante todo o período de armazenagem e de repouso, como reguladoras e homogeneizadoras da secagem e eliminadoras de possíveis odores adquiridos durante o tempo de exposição do café ao calor. Devem ser planejadas estrategicamente de forma a facilitar o seu carregamento e funcionar como alimentadoras das máquinas de benefício. As tulhas devem ser construídas de material de alvenaria e revestidas de madeira, bambu ou de outro material isolante de calor e que atenda as necessidades de um bom armazenamento do produto,

como mostra a Figura 6. Devem ser dotadas de um bom sistema de aeração e insolação, a fim de evitar oscilações bruscas de temperatura no seu interior e a formação de umidade sobre o café. O café coco ou pergaminho poderá ficar depositado em tulhas durante meses, desde que em condições ambientais favoráveis (temperatura em torno de 20°C e umidade relativa do ar de 65%), teor de umidade entre 11 e 12% para o café coco e 12 a 13 % para o despulpado, após o beneficiamento (SEGGES, 2001).

A

B

FIGURA 6: Tulhas para descanso e armazenamento de café (A), detalhe da construção da tulha (B).

Beneficiamento

Beneficiar o café é o ato de retirar, por máquinas e equipamentos apropriados, a casca (epicarpo + mesocarpo + endocarpo) do café coco ou o endocarpo do café pergaminho que envolve o grão após secagem, Figura 7. O beneficiamento do café consta das operações de limpeza feitas na bica de jogo, na retirada de pedras, o descascamento e a classificação (separação pelo tamanho dos grãos). A bica de jogo é um conjunto de peneiras que pelos movimentos oscilatórios,

retiram do café vindo da tulha, as impurezas maiores ou menores do fruto seco. O descascador poderá funcionar por fricção ou percussão. No primeiro, há dois cilindros paralelos, com a distância regulável entre eles, de acordo com o tamanho do coco ou do pergaminho, de modo que, por meio do atrito a casca ou palha seja retirada, enquanto que, no descascador por percussão a casca ou palha é retirada por meio de impacto (SEGGES, 2001).

As cascas são separadas dos grãos por ventilação, proporcionada por um sistema de ventiladores que são regulados para retirar, de forma eficiente, somente as cascas. O café descascado que se desloca para a periferia da peneira, é recolhido por um elevador de canecas e transportado para a máquina classificadora. Esta poderá funcionar acoplada ou não à máquina de beneficiamento e tem a função de classificar os grãos de café segundo o tamanho e formato. O rendimento médio do café arábico, em coco, após o beneficiamento é de 50%, e em pergaminho, 80% (SEGGES, 2001).

A

B

FIGURA 7: Máquina beneficiadora de café (A), detalhe da peneira separadora (B).

Ensacamento

Após o beneficiamento, o café verde é ensacado em bica corrida ou separado nas peneiras desejadas para ser comercializado ou armazenado. A saca de café verde deve ter o peso bruto de 60,5 quilos e estar devidamente identificado com o carimbo de seu proprietário. As sacas são empilhadas sobre estrados de madeira, representada na Figura 8, que é o mais indicado por favorecer a ventilação, ou em lençóis plásticos a fim de evitar o contato com o solo (SEGGES, 2001).

FIGURA 8: Sacas de 60 Kg de café verde, empilhadas.

2.2 Ocratoxina A

2.2.1 Aspectos gerais

As ocratoxinas são metabólitos secundários de fungos produzidos por algumas espécies do gênero *Aspergillus* e por *Penicillium verrucosum* sob condições propícias de temperatura e de atividade de água (Aa) e podem estar contidas no micélio desses fungos, no interior de seus esporos e serem liberados no alimento (O'BRIEN; DIETRICH, 2005; BEUX e SOCCOL, 2004).

As ocratoxinas são um grupo de sete derivados da isocumarina ligada a uma amida que, por sua vez, está unida a um grupo β -fenilalanina (Figura 9). Apresenta intensa fluorescência sob luz ultravioleta, nas cores verde e azul, quando em soluções ácidas e alcalinas, respectivamente (FURLANI; SOARES, 1999).

OTA

Peso molecular 403,8

R1	R2	R3	R4	R5	nome
Fenilalanina	Cl	H	H	H	Ocratoxina A
Fenilalanina	H	H	H	H	Ocratoxina B
Etil éster fenilalanina	Cl	H	H	H	Ocratoxina C

Figura 9: Estrutura química das ocratoxinas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, WHO, 2001).

Estruturalmente, as três toxinas diferem levemente entre si. Entretanto, essas diferenças são decisivas no seu efeito tóxico, sendo a ocratoxina A (OTA) a mais comum e a mais tóxica. A ocratoxina B (OTB) com um átomo de H no R₂ a torna

20 vezes menos tóxica que a OTA. A ocratoxina C (OTC) não possui efeito tóxico significativo, porém, recentemente, descobriu-se seu grande potencial tóxico em células humanas, monócitos line THP-1 (O'BRIEN; DIETRICH, 2005).

2.2.2 Aspectos toxicológicos da OTA

A toxicidade das micotoxinas pode ser subdividida em aguda, crônica, mutagênica e teratogênica. A preocupação reside, também, na possibilidade do aparecimento de tumores malignos relacionados com a ingestão repetida de baixas doses (sub-aguda) de micotoxina (BEUX e SOCCOL, 2004).

A OTA tem sido ligada à origem de diversos males tanto em animais como em humanos, sendo descrita como nefrotóxica, carcinogênica, teratogênica, imunotóxica e hepatotóxica em animais de laboratório e domésticos. É indicada como o provável agente causal de nefropatias (Nefropatia Endêmica dos Bálcãs e Nefropatia Crônica Intersticial) e tumores uroteliais em humanos (MONACI; PALMISANO, 2004).

Em alguns países do leste Europeu (Bulgária, Romênia, Sérvia, Croácia, Bósnia e Herzegovina, Eslovênia e Macedônia), a OTA foi associada com a alta incidência de uma doença renal conhecida como Nefropatia Endêmica dos Bálcãs (POFHOL-LESZKOWICZ *et al.*, 2002, TATU *et al.*, 1998 e STOEV, 1998). O consumo de alimentos contaminados com OTA, durante a gravidez e/ou infância, é suspeito de induzir lesões no DNA testicular que na puberdade promoveria o câncer testicular. Taxas de incidência de câncer testicular em 20 países correlacionaram significativamente com o consumo per capita de café e carne de porco (SCHWARTZ, 2002, LINDSEY, 2002)

A OTA foi causa de anomalias em recém nascidos, em testes conduzidos com animais de laboratório, tais como, ratos, hamsters e camundongos. A dose DL50 é

de 22 mg/kg em ratos; 3,6 mg/kg em galinhas de um dia e 6 mg/kg em suínos (MONACI; PALMISANO, 2004).

O efeito primário da OTA é a inibição da fenilalanina-t-RNA-sintetase, inibição da respiração mitocondrial e o distúrbio da homeostase intracelular de Ca^{++} que é inerente ao processo de peroxidação lipídica (MONACI; PALMISANO, 2004, DIRHEIMER, 1996). Quando ingerida, como contaminante, é persistente em seres humanos, devido a seu mecanismo de eliminação toxicocinético desfavorável. Sua meia vida sangüínea, após uma única dose oral, é de 35 dias. A OTA não é nem armazenada nem depositada no corpo, sua distribuição é heterogênea e pode causar injúria grave nos rins. A OTA é classificada, pela International Agency For Research On Câncer, como composto carcinogênico do grupo 2B, possível carcinógeno para humanos (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, IARC, 1993). Um possível mecanismo para efeitos genotóxicos da OTA foi sugerido por LEBRUN e FOLLMANN, 2002.

2.2.3 Exposição humana e avaliação de risco

A produção de OTA por espécies toxigênicas de fungos do gênero *Aspergillus* spp e *Penicillium verrucosum*, em alimentos e rações, depende de vários fatores ambientais, por ex.: temperatura, umidade e condições de armazenamento (RAMOS *et al.*, 1998). Conseqüentemente, a exposição humana a OTA é causa de preocupação. A ingesta de OTA pela população da Comunidade Européia foi avaliada e o comitê Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) estabeleceu que uma ingestão semanal provisória tolerada de 100ng/kg pc (WHO, 1991).

A OTA foi encontrada em amostras de sangue humano em países do leste europeu (PERAICA *et al.*, 2001, PERAICA *et al.*, 1999, RADIC *et al.*, 1997; SOLTI *et al.*, 1997), da Suécia e Noruega (THUVANDER *et al.*, 2001), Japão (UENO *et al.*, 1998), Itália (PALLI *et al.*, 2001), Tunísia (MAAROUFI *et al.*, 1995) e Líbano

(ASSAF *et al.*, 2004). A contaminação do leite humano também mereceu atenção (NAVAS, SABINO; RODRIGUEZ-AMAYA, 2005, SKAUG *et al.*, 2001, MICCO *et al.*, 1995 e MIRAGLIA *et al.*, 1995).

O governo alemão desenvolveu um estudo de dois anos e meio para determinar a exposição de humanos à OTA e os níveis de contaminação em alimentos. Os resultados mostraram que aproximadamente, 57% das 6476 amostras de alimentos analisadas continham OTA em níveis maiores que 0,01 ng.g⁻¹. Excetuando os cereais, os mais contaminados foram carnes e produtos cárneos. Os rins foram os órgãos mais atingidos, seguidos do fígado, músculo e tecido gorduroso. A ocorrência de OTA em lingüiça suína também foi alta. Níveis elevados de OTA foram encontrados em sangue humano (WOLFF *et al.*, 2000).

A OTA ocorre em produtos derivados de carne animal como resultado, tanto de contaminação direta do substrato com a toxina, como pela transmissão indireta de animais alimentados com rações contaminadas. Os ruminantes tais como carneiros e vacas são menos sensíveis à toxina que animais monogástricos. Esse fato pode estar relacionado à alta capacidade dos ruminantes em degradá-la, devido ao fluido ruminal que induz a hidrólise da OTA, convertendo-a para OTA- α (OZPINAR *et al.*, 1999).

Em alguns experimentos a OTA foi administrada em porcos durante um mês, sendo verificado o tempo de eliminação da toxina pelo organismo. Foi observado que a OTA desapareceu dos músculos e do tecido adiposo de porcos após 2 semanas e do fígado e dos rins após 3 semanas e 4 semanas, respectivamente (KROGH *et al.*, 1976; GALTIER, ALVINERI; CHARPENTEAU, 1981).

RUPRICK; OSTRY (1991), mediram os níveis de OTA em frangos que foram alimentados com 850 μ g de OTA por kg durante 6 semanas. Os resultados não excederam a 5 ng.g⁻¹; a meia vida da OTA foi de 3,3 horas que foi comparada com a de porcos que é 72 horas.

O'BRIEN; DIETRICH (2005) realizaram uma revisão para atender questões de diversas agências internacionais interessadas em definir limites seguros legais para concentração de OTA nos produtos alimentícios (grãos, carnes, vinhos e café), em alimentos processados e ração animal.

2.2.4 Metodologia e legislação

A OTA pode ocorrer em várias matérias primas: cereais, feijões, sementes oleaginosas, condimentos, frutas secas, café, cerveja, vinho e, devido ao efeito de carreamento, é encontrada no leite, sangue de suínos, fígado e rins, assim como em carnes de aves e de animais que se alimentaram com ração contaminada. Estas observações levaram a uma pronta adoção de limites regulatórios em vários países, implicando no desenvolvimento em larga escala de métodos analíticos oficiais validados (MONACI; PALMISANO, 2004).

LEVI; TRENK; MOHR (1974) publicaram método para quantificação de OTA em café verde, cujo limite de detecção era 20 ng.g^{-1} . As recuperações obtidas em 3 níveis de concentração variaram de 60,5% a 85,6%.

NAKAGIMA *et al.* (1990) introduziram pela primeira vez a coluna de imunoafinidade para limpeza do extrato de amostras de café em grãos, café instantâneo em pó e bebida de café. O extrato limpo foi submetido à cromatografia líquida de alta eficiência com excelentes resultados. O limite de detecção do método foi de $0,5 \text{ ng.g}^{-1}$ para grãos de café, e de $0,025 \text{ ng.g}^{-1}$ para bebida de café.

Métodos de análise validados e universalmente aplicáveis são insuficientes, especialmente para baixas concentrações que variam em ng.g^{-1} . A eficiência das colunas de limpeza de imunoafinidade devem ser constantemente monitorada. Sob o ponto de vista de resultados positivos, é consenso que devam ser

confirmados por derivatização e sistemas cromatográficos ou por espectrometria de massa (MOSS, 1996).

FURLANI (1998) testou diferentes clarificantes para limpeza de extrato de OTA e apenas as colunas de imunoafinidade foram capazes de remover os interferentes existentes nos extratos de café, otimizando desta forma os cromatogramas.

PITET e ROGER (2002) desenvolveram método para quantificação que utiliza CCD e extração de OTA otimizada e obtiveram um limite de detecção de 10 ng.g^{-1} . O método em CCD é rápido, simples e robusto, pode-se analisar mais de 20 amostras em um dia de trabalho e o custo analítico é bem menor que a metodologia CLAE.

A amostragem é considerada um grande problema, pois a distribuição da OTA nos alimentos é heterogênea. Os planos de amostragem devem ser considerados em ações regulatórias, no que diz respeito à concentração e ao limite de OTA. Os cereais e seus derivados são os principais produtos que contribuem para o valor da ingestão na comunidade europeia (MOSS, 1996; JORGENSEN; BILDE, 1996).

A Comunidade Europeia proíbe a comercialização de produtos alimentares com quantidades excessivas de contaminantes do ponto de vista da saúde pública (EUROPEAN UNION, EU, 2005). Desde que o Comitê Científico de Alimentos da Comissão Europeia (SCF) considerou que a OTA é um contaminante nos alimentos, os países membros da Comunidade Europeia, como Reino Unido e Alemanha, iniciaram levantamentos da presença de OTA em café e derivados. Outros países introduziram limites nacionais, conforme Quadro 1:

QUADRO 1: Países que possuem limites máximos de OTA em café verde e torrado (EU, 2005 e FONSECA, 2006)

Países	Café verde	Café Torrado
Itália	8ng.g ⁻¹	4 ng.g ⁻¹
Finlândia	10ng.g ⁻¹	-
Grécia	20 ng.g ⁻¹	20 ng.g ⁻¹
Singapura	2,5 ng.g ⁻¹	2,5 ng.g ⁻¹
Cuba	5,0 ng.g ⁻¹	-
Uruguai	50 ng.g ⁻¹	-
Indonésia	ausência	-

2.2.5 Fatores que propiciam o desenvolvimento de fungos e a produção de OTA

Vários fatores influenciam a produção de toxinas: atividade de água, temperatura, pH e composição e estrutura da matriz. A característica da linhagem isolada é um fator importante. As concentrações de OTA dependem do substrato (MOSS, 1996).

2.2.5.1 Fatores abióticos

Temperaturas ótimas e atividades de água (Aa) ideais constituem um grande perigo à proliferação de fungos e formação de OTA, em grãos de café verde. Os modelos de crescimento secundário são diferentes em certos aspectos do crescimento microbiológico em função das condições ambientais. Muitos modelos para fungos filamentosos descrevem crescimento radial máximo como função do pH, temperatura ou Aa. O crescimento de *A. ochraceus* e a produção de OTA em café verde são influenciados pela temperatura e Aa. A Aa mínima para o crescimento de *A. ochraceus* é de 0,80 e a temperatura ótima é 30 °C; para

produção de OTA a Aa mínima deve ser 0,85, a temperatura entre 20 e 30 °C. A taxa de crescimento do fungo decresce quando a temperatura e a Aa são reduzidas (PARDO *et al.*, 2005).

PALÁCIOS-CABRERA *et al.* (2005) estudaram três isolados de *A.niger*, *A.carbonarius* e *A. ochraceus* em três diferentes meios: Czapeck Yeast Extract Agar (CYA) Aa 0,997, Dichloran 18% Glycerol Agar (DG18), Aa 0,955, e Malt Yeast 40% Glucose Agar (MY40G), Aa 0,897, em 5 diferentes temperaturas: 8, 25, 30, e 41 °C. O meio de cultura não foi limitante para nenhuma das três espécies. A temperatura inibitória de crescimento para os três foi de 8°C. *A. niger* e *A. carbonarius* tiveram sua própria característica de crescimento, especialmente a temperaturas maiores que 35 °C. Enquanto que *A. niger* cresceu muito bem a 41 °C em todos os meios.

SUAREZ-QUIROZ *et al.*(2004) estudaram como o processamento de café (via seca e úmida) afeta a possibilidade de uma re-infecção com cepas toxigênicas em cafés verdes durante o armazenamento, levando em consideração as características físico-químicas dos grãos como pH, cafeína e ácido clorogênico. Os fatores estudados foram Aa, temperatura, pH e tipo de processo, cada fator em 3 níveis de processo (via seca, via úmida: fermentativo e mecânico). Os resultados foram significativos para Aa, temperatura e a interação Aa-Temperatura e em menor significância, para o processo. O crescimento do fungo não foi afetado na presença de ácido clorogênico, sendo que a cafeína reduziu o crescimento, enquanto a produção de OTA foi inibida por ambos.

PALÁCIOS-CABRERA *et al.*(2004) estudaram a produção de OTA em diferentes teores de umidade (80, 87 e 95%), em temperatura estável à 25 °C e em temperaturas intermitentes de 25 e 14 °C, simulando as temperaturas diurnas e noturnas alternadas de 12 em 12 horas. As Aa também foram registradas. A produção de OTA foi analisada em períodos de 39 e 60 dias, após o café ter alcançado teor de umidade estável. Os resultados mostraram que nas Aa entre

0,78 e 0,80 houve pouca ou nenhuma produção de OTA. Em temperaturas alternadas e Aa 0,84 e 0,86, a produção de OTA aumentou. Os autores concluíram que a alternância de temperaturas em transporte de café, principalmente o marítimo, deve ser considerada como um fator de risco no aparecimento da OTA.

A espécie *P. verrucosum* cresce a baixa Aa (abaixo de 0,80) e a baixas temperaturas, numa faixa de 0-31 °C, com um crescimento ótimo a 20 °C, sendo as plantações de cereais seu maior habitat. *A. ochraceus* cresce entre 8 e 37 °C, com uma temperatura ótima na faixa de 24-31 °C. As condições ótimas de crescimento são alcançadas em uma Aa de 0,95-0,99 enquanto que o mínimo é Aa é de 0,79 em meios contendo açúcar e 0,81 em meio com NaCl. A espécie *A. niger* cresce entre 6-47 °C, com uma temperatura ótima na faixa de 35-37 °C, é um fungo xerofílico com germinação relatada a Aa 0,77 e a 35 °C. *A. niger* é muito comum em climas quentes, tanto no campo como em alimentos armazenados. Essa espécie é muito difundida nos trópicos, mas não é comumente toxigênica (PITT; HOCKING, 1997). Segundo HEENAN; SHAW; PITT (1998), *A. carbonarius* é um importante produtor de OTA nos trópicos.

2.2.5.2 Fatores bióticos

A distribuição e abundância das espécies numa comunidade dependem não somente dos fatores abióticos, mas também de fatores bióticos que envolvem as ações dos seres vivos entre si, criando condições favoráveis à sua existência ou suprimindo-as.

Fungos

Os fungos são seres eucarióticos, heterotróficos, aclorofilados e quimiotróficos, que obtém energia mediante reações químicas nas quais substratos adequados

são oxidados. São ubíquos e, portanto encontrados no ar, no solo, na água em vegetais e animais (BEUX; SOCCOL, 2004).

Os fungos filamentosos ou bolores são capazes de crescer em todos os tipos de alimentos (FILTENBORG; FRISVAD; THRANE, 1996). A razão pela qual determinada espécie predomina em um produto particular é desconhecida, pensando-se estar correlacionada com as características das espécies e das propriedades dos alimentos (FILTENBORG; FRISVAD, SAMSON, 2000). O desenvolvimento dos fungos ocorre sob condições ambientais favoráveis e está associado com a produção de uma série de metabólitos secundários, muitos destes nocivos aos vertebrados. Tais metabólitos são conhecidos como micotoxinas e são quimicamente diversos, podendo estar contidos no micélio, no interior dos esporos ou liberados no alimento contaminado por esses microrganismos (BEUX; SOCCOL, 2004).

No gênero *Aspergillus*, várias espécies foram relatadas como sendo produtoras de OTA: *A. sulphureus*, *A. sclerotiorum* e *A. melleus* (MOSS, 1996). CIEGLER, 1972 relatou, além dessas, *A. alliaceus* e *A. ostianus*. No gênero *Penicillium*, muitas identificações foram relatadas, mas atualmente se aceita o *P. verrucosum* como produtor de OTA (PITT, 1987, CIEGLER *et.al.*, 1973). A produção de OTA por *Aspergillus* seção *Nigri* recebeu considerável atenção desde a primeira descrição da produção de OTA pelo *A. niger* var. *niger* (ABARCA *et.al.* 1994) e foi HORIE, 1995 quem primeiro relatou a produção de OTA pelo *A. carbonarius*.

A quantidade de nutrientes disponíveis, a temperatura, a atividade de água e o oxigênio são os fatores mais importantes que governam o crescimento e a produção de micotoxinas pelos fungos. As condições nas quais acontece a produção de toxina são, geralmente, mais restritas às de crescimento do fungo.

BEUX, 2004 estudou a biodiversidade microbiana em frutos cerejas de café e a ação fungistática de leveduras e bactérias lácticas foram avaliadas contra

Aspergillus ochraceus produtor de OTA e concluiu que algumas cepas apresentaram potencial antagônico.

A contagem total de bolores e leveduras nos alimentos é útil para avaliar a qualidade do alimento e o grau de deterioração sendo um componente essencial para programas de garantia da qualidade. O meio de cultura mais amplamente difundido é o ágar dextrose batata acidificado onde resulta em bom desempenho (TANIWAKI, SILVA e IANAMAKA, 2001).

Insetos e ácaros

Os insetos têm mostrado servir como vetores mecânicos para um grande número de fungos (VEGA; MERCADIER; DOWD, 2000).

VEGA; MERCADIER (1998), coletaram grãos infestados com a broca do café (*Hypothenemus hampei* (Ferrari), Coleoptera:Scolytidae em Uganda e Benin, e isolaram *A.ochraceus* de insetos que emergiram dos grãos. Em Uganda, de 636 insetos emergidos de grãos e coletados em 26 pontos, 34 (5,3%) estavam infectados pelo principal fungo produtor de OTA, o *A.ochraceus*. Em Benin 564 insetos originados de um único ponto 98 (17,4%) estavam infectados por *A.ochraceus*).

A broca do café é uma das pragas que provoca maiores prejuízos à cafeicultura, pois atacando os frutos afeta diretamente a produção. Dependendo do nível da infestação, os prejuízos podem chegar a 21% somente pela perda de peso. Além disso, a qualidade do café fica prejudicada, uma vez que os grãos brocados e quebrados aumentam proporcionalmente ao aumento da infestação da praga, resultando num produto de tipo e valor comercial inferiores. A cada 5 grãos brocados e/ou quebrados encontrados na amostra, o lote de café correspondente é penalizado com um defeito no sistema de classificação (FERREIRA *et al* 2003).

CASTRO e LEITÃO (2002) num estudo sobre as Boas Práticas Agrícolas e aplicação do sistema APPCC no cultivo e processamento industrial do café obtido pela via seca, sugeriram que o ataque dos frutos pela broca do café e larva das moscas-das-frutas aumentava a infecção dos grãos por fungos produtores de OTA.

O café armazenado deve ser inspecionado periodicamente, a fim de se detectar qualquer indício de infestação por insetos ou por roedores. Entre as pragas de armazém, o *Araecerus fasciculatus* (caruncho das tulhas) besouro de cor marrom com pequenos pontos escuros, ataca, no campo, os frutos secos, café coco ou beneficiado e neles permanecem nas tulhas ou armazéns. Os grãos afetados apresentam furos e galerias irregulares, de diâmetro maior do que os ocasionados pela broca do café. A proliferação deste inseto encontra condição ideal à temperatura acima de 27°C e umidade relativa do ar superior a 60% e ainda, teor de umidade do café acima dos limites desejados a sua boa conservação (SEGGES, 2001).

As traças são pequenas mariposas, cujas larvas se alimentam dos grãos de café e da sacaria em fibra de juta. As mariposas põem ovos sobre a sacaria, dando origem às larvas, que penetram nas sacas de café, corroem os grãos na sua superfície de forma irregular como se fossem caminhos. Os casulos, a aglomeração de excrementos e os fios de seda secretados por esses insetos sobre a sacaria denunciam a infestação por esses insetos (SEGGES, 2001).

Segundo SINHA; WALLACE (1973), os fungos, ácaros e insetos se desenvolvem em pontos da massa dos grãos onde o teor de umidade está acima de 12%. Desses focos, ácaros, insetos e fungos se espalham gradualmente pelos grãos, sempre em nichos favoráveis quanto à temperatura e umidade relativa, sendo que a microflora e fauna geralmente são dominadas por ácaros.

Foi demonstrado por FRANZOLIN *et al.* (1999), num estudo em condições controladas, a habilidade de ácaros da espécie *Tyrophagus putrescentiae* (Acari:Acaridae) em carregar os esporos de fungos de *Aspergillus flavus* aderidos ao seu corpo e no seu aparelho intestinal, demonstrando que a presença do fungo contribuiu para o crescimento dos ácaros. Em troca, os ácaros difundiram seus esporos viáveis através dos grãos.

2.2.6 Ocorrência de fungos e OTA em café

No café verde a OTA é produzida por algumas espécies do gênero *Aspergillus*, sendo as mais importantes *A.ochraceus*, *A.niger* e *A. carbonarius* em climas tropicais e subtropicais e por *Penicillium verrucosum* em climas temperados.

SILVA *et al.* (2000), isolaram 107 leveduras do processamento de café. Noventa foram identificadas até gênero, sendo os principais: *Pichia*, *Cândida*, *Arsula* e *Saccharonycopsis*. Fungos filamentosos foram isolados e gêneros identificados: *Cladosporium* (39.7%), *Fusarium* (34.2%) e *Aspergillus* (2.7%). A abundância e a diversidade de espécies de microrganismos foram determinadas em café produzido pela via seca.

LEONI *et al.* (2001) examinaram cafés verdes provenientes de cinco Estados produtores (MG, PR, SP, ES e BA) destinados ao consumo interno brasileiro. A OTA foi quantificada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, utilizando-se colunas de imunoafinidade para limpeza da amostra. Das 132 amostras analisadas, 27 estavam contaminadas com OTA numa média de 7,1 ng.g⁻¹, com variação de 0,7-47,8 ng.g⁻¹. Os autores tentaram associar os defeitos de classificação dos grãos com o aparecimento da OTA, porém não houve relação entre a contaminação e o defeito.

JOOSTEN *et al.*(2001), para investigarem a hipótese de que as espécies de fungos do gênero *Aspergillus* seção *Nigri* (*niger* e *carbonarius*) eram os

responsáveis pelo aparecimento de OTA, em café nas zonas tropicais, examinaram a micoflora de frutos de cafés colhidos da árvore e frutos que estavam em processo de secagem de duas fazendas no Sul da Tailândia. Isolaram 30 cepas de *A. carbonarius* e investigaram a influência de vários parâmetros ambientais na produção de OTA. Os resultados sugeriram que o café tailandês possui uma alta ocorrência de *A. carbonarius*.

URBANO *et al.* (2001) isolaram fungos, potencialmente produtores de OTA, em café em diferentes estágios de maturação. A toxina foi quantificada durante a fase de terreiro e em café armazenado. A capacidade de cada isolado, em produzir OTA, foi testada tanto pelo método do “plug agar” como o da extração com clorofórmio.

FREITAS *et al.* (2001), isolaram fungos de frutos de café, sendo vários *Aspergillus* seção *Circundatti*, *Nigri*, *Flavus* e *Glaucus*. Estudaram a ocorrência e o grau de severidade da infecção de fungos do gênero *Aspergillus* em diversas propriedades cafeeiras, concluíram que a contaminação interna dos grãos é variável, havendo alternância de espécies ou grupos.

BUCELLI e TANIWAKI (2002) realizaram uma revisão sobre a origem e do impacto do aparecimento de OTA em café na pós-colheita. Concluíram que, com as informações que dispunham, o aparecimento da OTA se dava, provavelmente, entre o tempo de colheita e sua chegada na indústria e que altas umidades representariam um fator de risco para o desenvolvimento de fungos produtores de OTA e da produção da própria micotoxina.

No Brasil, a presença de OTA no café e nos seus derivados tem preocupado pesquisadores da área de saúde pública e da agricultura. SABINO; RODRIGUEZ-AMAYA (2002) realizaram uma revisão dos trabalhos publicados de 1991 a 2000 sobre a pesquisa de micotoxinas no Brasil, encontraram 39 trabalhos sobre a ocorrência de OTA. As autoras relataram a preocupação sobre a contaminação de

café pela OTA, especialmente, na Europa. Três trabalhos mostraram que a OTA estava presente em baixas concentrações no café brasileiro.

TANIWAKI *et al.* (2003) analisaram 408 amostras de café durante as colheitas de 1999 e 2000, quanto à presença de OTA e fungos potencialmente produtores de OTA. As amostras foram provenientes de três regiões paulistas e uma mineira. Os tipos de frutos examinados foram: imaturos, maduros, cerejas que já tinham passado do ponto de maturação nas árvores e do chão e grãos obtidos durante a secagem e armazenamento na fazenda produtora. Foram isolados fungos *A. carbonarius*.

De MORAES e LUCHESE (2003) avaliaram a OTA em café verde proveniente do Estado do Rio de Janeiro verificando a influência da colheita e dos procedimentos de secagem. Das 54 amostras avaliadas 22 continham OTA em níveis de 0,3 a 160 ng.g⁻¹.

MARTINS, MARTINS e GIMENO (2003) estudaram a ocorrência de fungos e de OTA em café verde (*Coffea arábica*) originário do Brasil. Das 60 amostras analisadas, 91,7% estavam infectadas por fungos, sendo 83,3% *A. niger*, 53,3% *A. ochraceus*, 25% *A. flavus*, 16,6% *Cladosporium* e 10% *Penicillium* spp. Vinte amostras (33,3%) continham OTA variando de 0,2 a 7,3 ng.g⁻¹, todas abaixo do limite sugerido pela União Européia que é de 8 ng.g⁻¹.

Pesquisadores brasileiros conduziram estudo para avaliar a presença de fungos e de OTA em café verde em 45 amostras de café de 11 diferentes localidades no Estado de Minas Gerais. A comunidade externa ao grão resultou em 96% de *Aspergillus* spp e 42% de *Penicillium* spp. Com a desinfecção externa dos grãos com hipoclorito de sódio a 1% para avaliar a infecção interna aos grãos os resultados foram 47% para fungos do gênero *Aspergillus* spp e 24% para *Penicillium* spp. Dos *Aspergillus*, foram encontradas 10 espécies seção *Circundatti* com 75% dos isolados produtores de OTA, seção *Nigri* 3 isolados sem produção

de OTA. A técnica utilizada para avaliar o potencial toxigênico dos isolados foi a do ágar coco e método do “plug agar” (BATISTA *et al.*, 2003).

3 - OBJETIVOS

3.1- Objetivo geral.

Estudar a origem da OTA no processamento primário de café verde e avaliar os possíveis fatores de risco que poderiam contribuir para sua presença.

3.2 - Objetivos específicos.

a) Nas etapas do processamento (campo, via seca, via úmida, armazém e varrição) avaliar a ocorrência de:

- insetos e ácaros;
- fungos potencialmente tóxicos;
- bolores e leveduras totais;
- OTA.

4 - MATERIAL e MÉTODOS

4.1 Material

Foram utilizadas amostras de frutos de café, *Coffea arabica*, provenientes da safra de 2002/2003 de três Estados brasileiros: São Paulo, Paraná e Rio de Janeiro. Foram colhidas, de forma asséptica, 109 amostras de 2kg, da seguinte forma:

Campo/Cereja (amostras coletadas na lavoura)

- 14 amostras de cerejas maduras, consideradas como início do processamento.

Via Seca (amostras coletadas no terreiro, na tulha e no secador mecânico).

- 20 de frutos bóias, sendo 10 amostras colhidas em terreiros e 10 nas tulhas,
- 23 de frutos verdes, sendo 11 amostras colhidas no terreiro, 8 nas tulhas e 4 no secador mecânico.

Via Úmida (amostras coletadas no terreiro, na tulha e no secador mecânico)

- 29 de frutos cereja descascados.

Armazém (amostras colhidas no beneficiamento do café)

- 16 de grãos beneficiados, amostras consideradas como final do processamento.

Café de varrição

- Frutos que caíram da árvore e entraram em contato com o solo. Foram coletadas 7 amostras.

4.1.1 Amostragem.

Foram amostradas três fazendas nos municípios de Espírito Santo do Pinhal (SP), Bom Jardim (RJ) e Cornélio Procópio (PR), mostrados na Figura 10. Nas três propriedades havia dois processos de produção de café verde: via úmida e seca.

FIGURA 10: Mapas das regiões amostradas

4.1.1.1 Campo

No pé de café foram colhidos frutos cerejas aleatoriamente, no mínimo em 10 pés e colocados em balde ou bandeja de plástico limpo. Homogeneizados os frutos e retirados 2kg, aproximadamente.

4.1.1.2. Via seca e Via úmida

Terreiro

A coleta de amostras em terreiro de frutos cereja descascados, bóias e verdes iniciava-se em uma extremidade da massa de grãos, andando-se em “zig zag” percorrendo a maior parte da superfície dos grãos, em pontos aleatórios foram colhidas alíquotas, com caneca de aço inox de 1 kg. Essas alíquotas eram colocadas em recipiente plástico limpo de 30 L. O volume colhido foi homogeneizado e retirada uma amostra de aproximadamente 2 kg.

Tulhas.

As amostras das tulhas foram colhidas do modo mais aleatório possível, sendo a maioria das vezes colhidas por funcionários da própria fazenda.

4.1.1.3. Armazém (final de processamento)

Os grãos beneficiados foram colhidos na máquina beneficiadora com uma caneca até encher um recipiente plástico de 30L, o seu conteúdo homogeneizado e retiradas uma amostra de 2 kg.

4.2- MÉTODOS

4.2.1 Fluxograma do processamento

Para elaboração do fluxograma do processamento primário de café verde foram realizadas visitas técnicas às instituições de extensão rural, visitas as fazendas e consulta à literatura técnica, Figura 11.

FIGURA 11: Fluxograma do processamento primário de café verde

4.2.2 Isolamento de fungos toxigênicos

Procedimento:

Cinquenta cerejas foram lavadas em 100 mL de água peptonada a 0,1% em frasco de Duran, lavando a superfícies dos frutos. Foram realizadas diluições em série deste lavado de 10^{-1} até 10^{-4} . Tomou-se uma alíquota de 1 mL de cada diluição que foi misturada em placa de Petri com Agar Dextrose Batata (ADB). As placas foram incubadas de 5 a 7 dias, à temperatura de 25 °C.

Cálculo da UFC/cereja

Calcular a UFC/ mL em determinada diluição, multiplicar pelo fator de diluição e pelo volume total (100mL) e dividir pelo número de frutos lavados (50).

4.2.3 Identificação de gênero de fungos isolados produtores de OTA.

Foram empregadas as metodologias descritas por RAPER; FENNEL (1965), CHRISTENSEN (1982), PITT; HOCKING (1997), PITT (1988), CHALFOUN e BATISTA (2003).

4.2.4 Isolamento de artrópodes

Pesquisa de matéria estranha externa: extração de sujidades leves externas de grãos - Método da Flutuação. A análise foi realizada pelo método oficial nº950.86 descrito na A.O.A.C International (2000) (a)

4.2.5 Identificação de insetos.

Os insetos foram identificados segundo os HALSTEAD (1986),

BORROR; DELONG (1988), BOOTH, COX; MADGE, 1990 e PACHECO; DePAULA (1995).

4.2.6 Identificação de ácaros

Os ácaros isolados, montados em lâminas permanentes e alguns espécimes mantidos em álcool 70%, foram identificados segundo as chaves taxonômicas de HUGDES (1976), KRANTZ (1978) e FLETCHMANN (1989).

4.2.7 Determinação do porcentual de grãos brocados

FDA Technical Bulletin Number 5 – Macroanalytical Procedures Manual – Electronic version 1998. Method for Coffee beans

4.2.8 Determinação da atividade de água (Aa)

A atividade de água foi determinada em equipamento AquaLab CX2

4.2.9 Determinação de ocratoxina A em café verde por cromatografia por camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) após separação por coluna de imunoafinidade.

a) Preparação da solução padrão de OTA

O padrão de OTA foi adquirido da Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, EUA) e preparada conforme descrito no Livro de Métodos Físico-Químicos do IAL, método 407/IV, (BRASIL, 2005)

b) Preparação da amostra:

As amostras foram congeladas em freezer doméstico até o momento da preparação. Os cafés, coco e pergaminho, foram descascados, para

liberarem as sementes. Os cafés verdes são as próprias sementes. As sementes foram trituradas e homogeneizadas em liquidificador.

c) Extração, purificação e quantificação da OTA foram realizadas de acordo com o descrito no Livro de Métodos Físico-Químicos do IAL, métodos 408/IV e 409/IV, (BRASIL,2005).

4.3 Análise estatística

Análise descritiva

Foram construídos gráficos “Boxplots” ou desenhos esquemáticos segundo BUSSAB; MORETTIN, 1985, no programa estatístico MINITAB release 13 e 14(Minitab Inc).

Os desenhos esquemáticos foram utilizados para avaliação dos dados quanto a posição, dispersão, assimetria, caudas e valores extremos. A posição central dos valores foi dada pela mediana (traço que divide a caixa do desenho esquemático em duas partes). Os asteriscos nesses gráficos representam os dados mais afastados, isto é valores discrepantes que não se encaixam no conjunto de dados. O primeiro quartil Q_1 é representado pela base da caixa, o segundo quartil Q_2 é a mediana e o terceiro quartil Q_3 é o topo da caixa. A média é representada nos desenhos por um círculo que encerra uma cruz. Os valores extremos foram calculados obedecendo ao seguinte critério: dados menores que $Q_1 - 3/2 (Q_3 - Q_1)$ e dados maiores que $Q_3 + 3/2 (Q_3 - Q_1)$

As comparações de médias e medianas foram realizadas pela análise de variância (ANOVA) e o teste de Kruskal Wallis, respectivamente no programa estatístico MINITAB release 13 e 14 (Minitab Inc).

Determinação dos fatores de risco,

Inicialmente, foi realizada uma análise univariada com o objetivo de selecionar as variáveis que apresentavam associação com o aparecimento de ocratoxina A. As técnicas de análise adotadas nesta etapa foram o teste exato de Fisher e o teste de Kruskal-Wallis. As variáveis para as quais foram obtidos $p < 0,20$, foram selecionadas para o ajuste de um modelo de regressão logística.

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1-Aspectos gerais das regiões amostradas

São Paulo

A propriedade onde foi feita a coleta se localiza no município de Espírito Santo do Pinhal, a 600m de altitude, área de 90 hectares (ha), cujo solo é ondulado, tipo podzólico com cascalho. As variedades de café foram Mundo Novo em dois espaçamentos (2,5x2 e 3x1) e Icatú (3x1) e precipitação anual de 1500 mm. No ano de 2002 a condição climática de uma forma geral, na região de São João da Boa Vista, de janeiro a abril foi de seca, evento não muito comum para essa época, tornando a região mais seca que de costume. Assim os frutos amadureceram rapidamente e houve uma antecipação da colheita, que teve seu início em março, sendo parte mecânica e parte manual, derriça em pano. A limpeza do café foi por abanação e lavagem mecânica com separação dos tipos de grãos. Os terreiros eram de cimento e asfalto, os secadores mecânicos vertical e horizontal com lenha e gás como combustível. Os cafés dessa propriedade eram vendidos para uma associação que tinha como destino, em primeiro plano, a exportação e depois, o mercado interno.

Rio de Janeiro

A propriedade onde foi feita a coleta se localiza no município de Bom Jardim, região serrana do Rio de Janeiro, numa altitude variável de 800 a 950 m, terreno ondulado de montanha, tipo de solo argiloso, as variedades plantadas foram Catuaí e Rubi. As condições climáticas foram normais da região, onde a temperatura no inverno é de 10 graus e no verão é de 27 graus. A colheita foi manual derriçada no pano, ensacada. A limpeza do café foi feita por abanação e lavagem mecânica com separação dos tipos de grãos. Os terreiros eram de cimento, com secadores mecânicos horizontais com lenha como combustível. Na

via úmida, o café era descascado e depois desmucilado em equipamento, passava pelo terreiro e depois seguia para o secador mecânico. A opção de venda era, em primeiro lugar, a exportação direta, em segundo, a cooperativa e em terceiro, o mercado interno. Não houve nenhum fato climático expressivo fora da normalidade para a região e, durante as coletas de amostras, houve garoa fina ou chuva leve, típica da região.

Paraná

A propriedade onde foi feita a coleta se localiza no município de Cornélio Procopio, medindo 566 ha, solo terra roxa estruturada, altitude de 690m e terreno ondulado. Com precipitação de 1600 mm/ano, cultivares plantados IAPAR 59, Catuaí vermelho, Mundo Novo, Sarchimor e Tupi. A área para o café era de 103 ha, havia área de pastagem e de outras culturas como trigo, soja e milho. Colheita derriça manual no pano, terreiros de cimento e de tijolo, secador horizontal com lenha como combustível. As opções de comércio eram feitas com um corretor que dispunha das melhores opções para o destino do café como, por exemplo a indústria de café solúvel. As condições climáticas desta região não foram muito favoráveis no ano que se realizou a coleta de amostras. Ocorreu um período de seca grande de março a abril, no início da colheita choveu muito acarretando queda de vários frutos e apodrecimento dos frutos no pé, dando origem a talhões heterogêneos com grãos escuros e fungados com alta umidade.

5.2 Campo

Na primeira etapa do processo foram escolhidos apenas os frutos em perfeitas condições de maturação.

Determinação de OTA

Na época do planejamento do projeto, levou-se em consideração o não aparecimento de OTA no fruto cereja no pé. Foi relatado por FRANK, 1999 e BUCHELI et al., 2000 que as cerejas no pé não são susceptíveis à proliferação de *Aspergillus*, a qual é atribuída a existência de uma população de microrganismos que os protege de uma invasão, porém TANIWAKI *et al.* (2003) encontraram OTA em frutos cerejas maduros e super maduros em concentrações inferiores a concentração de 5 ng.g⁻¹ em fruto cereja e De MORAES e LUCHESE (2003) encontraram valor médio de 0,3 ng.g⁻¹ com variação de nd-0,8 ng.g⁻¹.

Análise de fungos

A Tabela 1 mostra a análise descritiva da variável fungo nessa etapa, que teve Aa média de 0,98. Nos frutos cerejas, não houve diferenças significativas entre as regiões quanto à presença de bolores e leveduras.

TABELA 1 - Análise descritiva para bolores e leveduras (log UFC/cereja) isolados na fase de campo, fruto cereja, do processamento primário de café verde.

Variável	N	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Q1	Q3
Bolores	14	3,946	3,925	2,000	6,000	2,900	5,065
Leveduras	14	5,086	5,600	1,450	6,830	4,643	5,833
<i>Penicillium</i>	14	1,220	0,000	0,000	4,180	0,000	3,075

O valor médio para bolores foi de 3,9 log UFC/ cereja e para leveduras 5,1 log UFC/cereja demonstrando que em cada fruto havia população alta de bolores e leveduras. Valores elevados também foram encontrados por URBANO *et al.* (2001) 6,4 log UFC/g em 1998 e 4,8 log UFC/g em 1999, em frutos cerejas.

No total de amostras cerejas, via comum a ambos processamentos, obteve-se 36% de presença de amostras com *Penicillium* spp, único fungo que poderia dar origem a OTA. Não foi detectada a presença fungos do gênero *Aspergillus*.

Nas três regiões estudadas houve diferença significativa ($p < 0,05$) na distribuição de fungos do gênero *Penicillium* spp como demonstrada na Figura 12. No município de Cornélio Procópio não foi isolado e em Bom Jardim/RJ apresentou a maior prevalência. Esta última região estava mais fria e úmida durante as coletas, sendo uma possibilidade para o isolamento desses fungos.

FIGURA 12: Distribuição de fungos *Penicillium* sp nas regiões estudadas Paraná (PR), Rio de Janeiro (RJ) e São Paulo (SP).

Uma explicação plausível para o não isolamento de fungos produtores de OTA nesta fase é a competição de microrganismos estabelecida nos frutos já relatada por outros autores (SUAREZ-QUIROZ *et al.*, 2005; MASOUD; KALTOFT, 2005; BEUX, 2004; BUCHELI *et al.*, 2000 e FRANK, 1999). Médias altas de quatro ciclos log aproximadamente para bolores totais e de cinco ciclos log para leveduras mostram uma alta população de microrganismos nos frutos. Este fato poderia ser

a causa da inibição do crescimento de fungos produtores de OTA que necessitam de condições específicas para proliferação.

A presença de fungos produtores de OTA em fruto cereja de café foi mostrada por TANIWAKI *et al.* (2003) que encontraram, nas safras de 1999 e 2000 em três regiões do Estado de São Paulo e uma do Cerrado Mineiro, infecção interna de 0,25% de *A. ochraceus*, 1,2% *A. niger* e 0% de *A. carbonarius*, evidenciando uma baixa ocorrência.

Num estudo controlado sobre a contaminação de lotes de café arábica por fungos produtores de OTA, pesquisadores relataram diferenças na colonização do *A. niger* e do *A. ochraceus*. Este último teve dificuldades de se estabelecer na presença da flora natural e foi mais susceptível à competição, o que não ocorreu com o *A. niger* que se estabeleceu mais facilmente (SUAREZ-QUIROZ *et al.*, 2005)

Análise de artrópodes

Os insetos mais presentes nas amostras desta etapa foram os Homopteras em 92,9%, seguidas das larvas de Diptera (moscas-das-frutas) presentes em 85,7% das amostras, os Coleopteros (broca do café) em 64,3% e os Hymenopteros em 50,0%. A Figura 13 mostra a análise descritiva dessas variáveis, em comparação nas regiões estudadas.

Embora os insetos da Ordem Homoptera fossem os mais presentes nas amostras de café cereja, a maior média foi da Ordem Diptera, cujas larvas em abundância se encontravam nesta etapa.

FIGURA 13: Frequência de insetos (Ordens Diptera, Homoptera, Coleoptera e Hymenoptera) no café cereja nas regiões estudadas.

Os insetos da Ordem Diptera foram identificados como as moscas-das-frutas, que segundo CASTRO e LEITÃO (2002) sua presença contribui para o aumento da infecção dos frutos por fungos produtores de OTA. Em nossos resultados não encontramos sustentabilidade para essa hipótese, pela baixa média de fungos potencialmente toxigênicos isolados, *Penicillium* spp e presença de Dípteros na região do Rio de Janeiro. Enquanto que as outras regiões apresentaram medianas maiores para Diptera e nenhum fungo potencialmente toxigênico foi isolado.

A broca do café esteve presente em 64% das amostras. As medianas foram 1,0, 3,0 e 0,0 insetos por amostra, para SP, RJ e PR, respectivamente, não havendo diferença significativa entre as regiões ($p > 0,05$). Os grãos brocados não apresentaram homogeneidade de resultados, pois em SP uma única amostra apresentou 25% de seus grãos infestados elevando a média. Segundo vários autores CASTRO; LEITÃO (2002); VEGA; MERCADIER; DOWD (2000) e VEGA; MERCADIER (1998), a broca do café auxilia a dispersão dos esporos de fungos pela planta o que aumentaria a chance de contaminação por fungos toxigênicos, tornando os frutos mais susceptíveis. Os resultados deste estudo não revelaram

grande infecção com fungos potencialmente toxigênicos nesta etapa, embora a broca do café estivesse presente e houvesse grãos brocados, significando invasão do grão pelo inseto, mas aparentemente não colaborando com o incremento da sua micobiota neste momento. Segundo CARRION; BONET (2004) a relação entre a broca do café e a micobiota existente nos frutos é mais complexa do que se havia suposto em trabalhos da literatura científica, onde a broca do café não é o único problema a ser confrontado e outros estudos serão necessários para esclarecer este problema.

Nesta etapa os ácaros de campo foram predominantes nas três regiões, porém sem diferenças significativas ($p>0.05$), a Figura 14 mostra sua distribuição, onde a espécie identificada foi o ácaro do cafeeiro *Brevipalpus phoenix* (Prostigmata:Tenuipalpidae). Possivelmente, em São Paulo, devido à estiagem, houve menor variação, já no Rio de Janeiro e Paraná com ambiente mais úmido, a variação foi maior.

FIGURA 14: Distribuição de ácaros de solo (Ac solo), ácaros de campo (Ac campo) e ácaros da família Acaridae nas regiões estudadas, PR, RJ e SP.

5.3 Via seca

Nesta etapa do processamento, via seca, o produto obtido é o café coco, fruto seco do qual se preserva todo o seu conteúdo, epicarpo, mesocarpo e endocarpo que encerra as sementes (café verde).

Determinação de OTA

Foram analisadas 43 amostras da via seca, contendo dois tipos de frutos, bóa e verde. Esses frutos foram colhidos no terreiro e nas tulhas, mas ambos processados da mesma maneira. Os frutos bóias apresentaram uma prevalência de 15% de OTA que totaliza 7% da via seca conforme Tabela 2.

TABELA 2 - Amostras coletadas do processamento primário de café verde, via seca e prevalência de OTA.

Tipos de frutos	Número de amostras	Prevalência de OTA (%)
Bóa	20	15
Verde	23	0
Via Seca*	43	7

* Numero total de amostras da via seca.

Nas três amostras que continham OTA, as concentrações foram quantificadas por CLAE resultando em 7,8; 25,3 e 63,1 ng.g⁻¹. Dois destes resultados encontram-se acima do limite sugerido pelo mercado comum europeu de 8 ng.g⁻¹, no caso de exportação de café verde.

No presente estudo o resultado médio da quantificação de OTA em frutos bóa, foi de 4,8 ng.g⁻¹ com variação de não detectável (nd) a 63,1 ng.g⁻¹ que vem de acordo com TANIWAKI et al. (2003) que encontraram valor médio de 2,1 ng.g⁻¹, com variação de concentração de 0,2 a 48 ng.g⁻¹; com De MORAES e LUCHESI (2003)

que encontraram $1,3 \text{ ng.g}^{-1}$ na média e variando de nd a $8,8 \text{ ng.g}^{-1}$ e URBANO *et al.* (2001) que encontraram média de 17 ng.g^{-1} em café de terreiro no Norte do Paraná.

Neste estudo somente os frutos bóias apresentaram OTA, não sendo encontrada nos frutos verdes (Tabela 2), que vai de encontro ao relatado por BUCHELI *et al.* (2000) que relacionam o aparecimento da OTA com frutos maduros, supermaduros e cerejas danificadas e não com os frutos verdes, os quais não possuem quantidades de açúcares livres e, dada a sua extrema firmeza, não favorece o desenvolvimento dos fungos. Os mesmos autores mostraram que a concentração de OTA no café verde obtido pela via seca tem 100 vezes menos OTA que as suas cascas, evidenciando que a OTA ficaria nas camadas mais superficiais do fruto.

As medidas de Aa das amostras de frutos bóias retiradas dos terreiros nas três regiões estudadas, estão representadas na Figura 15.

FIGURA 15: Medidas de Atividade de água (Aa) de frutos bóias colhidos em terreiro, na via seca, nas três regiões estudadas. As estrelas indicam amostras com OTA.

Observando os dados desta etapa, via seca, notam-se diferentes situações na fase de terreiro, com parcelas que permaneceram 7 e 8 dias no terreiro e suas Aa

ainda permaneciam altas 0,841 e 0,763 respectivamente, sem produção de OTA. Em São Paulo, uma amostra com dois dias e Aa de 0,824 apresentou concentração de 25,3 ng.g⁻¹ e outra no Paraná com 4 dias e Aa 0,888 com 63,1 ng.g⁻¹. A OTA foi detectada em São Paulo e Paraná e não foi encontrada no Rio de Janeiro. Os resultados ainda mostram que os frutos que permaneceram pelo menos 4 dias nos terreiros com Aa maior que 0,840 tinham condições propícias para produção de OTA, se tivessem os inóculos de fungos e se as temperaturas ambientais fossem médias em torno de 25 °C.

De acordo com CASTRO; LEITÃO (2002) a demora na secagem, natural ou artificial, faz com que o produto permaneça em condições críticas de umidade favorecendo a produção de OTA se os frutos estiverem contaminados com bolores produtores. Os mesmos autores citam FRANK que comenta trabalhos de campo e de laboratório nos quais sugere que a maioria, se não toda a contaminação, ocorre no final dos primeiros dias de secagem no terreiro ou até antes.

Porém, nos dados deste estudo verificou-se baixa prevalência de OTA, evidenciando que os fatores abióticos não são suficientes para determinar o cenário ideal para seu aparecimento. Se fosse desta forma, a prevalência de OTA seria maior nas amostras, este fato sugere que os fatores bióticos podem estar influenciando na baixa prevalência de OTA, pela competição existente, nos frutos bóa, de microrganismos, conforme relatada por vários autores (SUAREZ-QUIROZ *et al.*, 2005; MASOUD; KALTOFT, 2005; BUCHELI *et al.*, 2000 e FRANK, 1999), não permitindo que os fungos ocratoxigênicos se estabeleçam.

A variação das Aa na fase de terreiro indica que há condições para o desenvolvimento do fungo e da produção de OTA, porém os fungos produtores de OTA ainda terão que passar pela competição de microrganismos existentes nos grãos onde somente os mais aptos se estabelecerão. Segundo MASOUD; KALTOFT (2005) que estudaram o crescimento e produção de OTA pelo fungo *Aspergillus ochraceus*, concluíram que algumas leveduras presentes na

fermentação natural reduziram o crescimento do fungo e a biossíntese de OTA em meios de cultura estudados.

Na fase de tulhas houve uma amostra com OTA na concentração de $7,8 \text{ ng.g}^{-1}$, mostrada na Figura 16.

FIGURA 16: Medidas de atividade de água (Aa) de frutos bóias colhidos em tulha na via seca, nas três regiões estudadas. A estrela indica amostra com OTA.

Os dados obtidos mostram baixa variabilidade de Aa entre as amostras; os frutos se encontravam em umidade baixa, própria para sua conservação. Esta condição ligada a condições ideais de Boas Práticas Agrícolas reforça que a contaminação pode ter ocorrido anteriormente à tulha, pois não havia condição ideal de Aa para produção de OTA.

Análise de fungos

A Tabela 3 mostra a análise descritiva das variáveis bolores totais, leveduras e fungos potencialmente toxigênicos na via seca.

TABELA 3 - Análise descritiva da via seca para bolores, leveduras, *Aspergillus* seção *Nigri* e *Penicillium* spp

Variável	N	Média	Mínimo	Q1	Mediana	Q3	Máximo
Bolores	43	4,134	1,000	3,260	4,510	5,000	6,300
Leveduras	43	5,662	3,600	4,980	5,790	6,480	7,300
<i>A Nigri</i>	43	0,604	0,000	0,000	0,000	1,300	5,000
<i>Pen</i>	43	1,415	0,000	0,000	0,000	3,000	5,300

A Nigri - *Aspergillus* seção *Nigri*, e *Pen* *Penicillium* spp

O resultado de fungos mostra uma grande quantidade de leveduras e bolores totais e os fungos toxigênicos em concentrações bem menores. As médias de bolores e leveduras foram de 4,1 log de UFC/cereja e 5,7 log de UFC/cereja, respectivamente. Este cenário retrata alta população de microrganismos no fruto do café. URBANO *et al.* (2001) encontraram alta concentração de bolores e leveduras totais em cafés que se encontravam no terreiro, com média de 4.3×10^8 (8,7 log UFC/g) e 2.6×10^6 (6,4 log de UFC/g).

A média para *Aspergillus* seção *Nigri* foi de 0,6 log de UFC/cereja e para *Penicillium* spp 1,4 log de UFC/cereja. A Figura 17 representa a análise descritiva da distribuição de fungos potencialmente toxigênicos nas três regiões estudadas. A análise de variância evidenciou que as médias entre *Aspergillus* seção *Nigri* e *Penicillium* spp entre as regiões eram diferentes ($p < 0,05$), exceto para *A. ochraceus* que estava ausente.

A distribuição de *Penicillium* spp no PR e RJ foi semelhante com médias de 1,77 e 1,87 log UFC/cereja, respectivamente. A distribuição do *Aspergillus* seção *Nigri* foi semelhante no PR e SP com médias de 1,05 log UFC/cereja e 0,74 log UFC/cereja, respectivamente.

FIGURA 17: Distribuição de fungos potencialmente toxigênicos, na via seca, para as três regiões de coleta.

Esses resultados poderiam ser explicados pela situação climática das regiões de coleta, onde São Paulo foi o Estado mais quente e seco relativo à temperatura ambiente e Rio de Janeiro o mais frio e úmido e o Estado do Paraná atípico, mais úmido que de costume, mas com temperaturas médias maiores que o clima serrano do Rio de Janeiro.

Os frutos bóias apresentaram maior infecção por *Penicillium* spp e os frutos verdes foram os menos infectados. Nas três amostras positivas para OTA foram isolados *Penicillium* spp.

Estes dados vêm de acordo com o estudo elaborado por SUAREZ-QUIROZ *et al.* (2005) onde relataram diferenças substanciais de colonização entre duas espécies de fungos, *A. ochraceus* e *A. niger*. O primeiro foi incapaz de se estabelecer, propriamente, na presença da microflora nativa, o segundo se estabeleceu mais facilmente. Contudo, *A. niger* não produziu toxina tão rapidamente, ou em altas quantidades como fez *A. ochraceus* sob condições do estudo. O não estabelecimento do *A. ochraceus* não significa ausência de risco, seus conídeos

permanecem vivos durante o processo e mantêm seu potencial para se desenvolver quando a condição lhes for favorável.

Outros autores isolaram fungos potencialmente toxigênicos de frutos de café na via seca em baixas concentrações como TANIWAKI *et al.* (2003) que encontraram um percentual de infecção interna de 1,3%, 2,7% e 0,5% de *A.ochraceus*, *A.niger* e *A. carbonarius*, respectivamente. Urbano *et al.* (2001) isolaram *A.ochraceus* e *A.niger* em café de terreiro em 15,5% e 12,5%, 0,5% e 6,5% e 22,5% e 6,0% das amostras coletadas no Norte do PR, Noroeste de SP e Norte de SP, respectivamente.

Análise de artrópodes

A distribuição de insetos está demonstrada na Figura 18, sendo os Coleópteros particularmente da família Scolytidae (broca do café) os predominantes, porém não houve homogeneidade dos dados, apresentando uma diferença acentuada da etapa de campo para o terreiro, com diminuição destes artrópodes.

FIGURA 18: Distribuição de insetos, via seca, para as três regiões de coleta.

Se compararmos os artrópodes presentes na etapa de campo com a via seca, vemos que o processo de secagem ocasionou mudança. A maioria dos insetos

desapareceu, permanecendo a broca do café. Para o fruto verde, a região de Bom Jardim (RJ) foi a que apresentou maior infestação e Cornélio Procópio (PR) a menor.

A Tabela 4 mostra a análise descritiva dos insetos presentes nos diferentes tipos de frutos bóias e verdes. Os frutos bóias foram mais infestados que os verdes ($p=0,006$), embora estes últimos tenham apresentado picos maiores de infestação. A mediana para os grãos brocados nos frutos bóias foi de 2,8%, isto é, a cada 100 grãos aproximadamente três estavam infestados. Não houve associação ($p>0,05$) entre o teor de infestação e o aparecimento da OTA.

Tabela 4 - Análise descritiva da infestação por insetos em frutos bóia e verdes na via seca

Variável	fruto	média	mediana	Min	Max	Q1	Q3
DIP	bóia	0,56	0,00	0,00	4,00	0,00	0,00
	verde	1,64	0,00	0,00	29,00	0,00	0,00
COL	bóia	20,7	3,00	0,00	181,0	0,00	23,3
	verde	5,14	1,00	0,00	85,00	0,00	2,25
HYM	bóia	0,18	0,00	0,00	3,00	0,00	0,00
	verde	0,09	0,00	0,00	2,00	0,00	0,00
% GrBr	bóia	3,26	2,80	0,00	7,00	1,30	5,70
	verde	1,73	0,60	0,00	13,20	0,30	1,40

DIP : larvas de Díptera, COL: Coleóptera, HYM: Hymenoptera, GrBr: grãos brocados

Os ácaros de campo desapareceram e os ácaros de solo (oribatídeos) estiveram em pouca quantidade, como mostra a Figura 19. A análise descritiva dos dados para ácaros evidenciou a falta de homogeneidade dos dados e muitos pontos foram considerados dados discrepantes.

FIGURA 19: Distribuição de ácaros na via seca para as três regiões de coleta.

Os ácaros oribatídeos têm um papel importante na degradação da matéria orgânica presente nos solos. Na secagem do café, poderiam contribuir para isso, pois seus hábitos de triturar os vegetais aumentando a superfície dos mesmos e com isso colaborando na ação dos microrganismos. Nesta etapa, a população de microrganismos é alta nos frutos e alguns ácaros da família Acaridae são fungívoros, portanto é possível que sua presença esteja relacionada com a abundância de alimento. Mesmo com a presença de ácaros não houve evidências para se acreditar que esses artrópodes disseminassem os esporos de fungos, parece que toda essa população faz parte de um ecossistema estável e controlado.

5.4 Via úmida

Nesta etapa, as camadas externas (epicarpo e mesocarpo) do fruto cereja são retiradas e a mucilagem remanescente no grão poderá ser removida de diferentes maneiras, por fermentação, abrasão, lavagem com produtos químicos, etc. Neste estudo, as amostras provenientes do Rio de Janeiro eram descascadas e a mucilagem foi retirada por um equipamento, desmucilador, que lavava os frutos. Estes eram encaminhados para o terreiro onde havia secagem parcial e após

seguiram para o secador mecânico. Nos Estados de São Paulo e Paraná, os frutos eram descascados e secos parcialmente em terreiros e depois colocados em secador mecânico.

Determinação de OTA

Nas 29 amostras de frutos cereja descascados, coletadas e analisadas, a OTA foi detectada em 10,3% das amostras do Paraná e todas provenientes das tulhas. Nas amostras que continham OTA as concentrações foram quantificadas por CLAE, resultando em 3;0, 3,9 e 10,4 ng.g⁻¹.

Neste estudo, o resultado médio de OTA obtido em café pergaminho foi de 0,5 ng.g⁻¹ com variação de nd a 10,4 ng.g⁻¹. As concentrações foram menores que as da via seca. Este dado está de acordo com o relatado por BUCHELI e TANIWAKI (2002) que comentaram sobre o impacto significativo da via úmida no decréscimo da OTA e que, segundo SUAREZ-QUIROZ *et al.* (2005), em estudo controlado, dentro da via úmida houve diferenças na concentração da OTA dependendo do método utilizado para remoção da mucilagem dos frutos de café sendo que os métodos fermentativos favoreceram o aparecimento da OTA. Segundo os autores, sua penetração em direção ao endosperma se dá por difusão.

Na via úmida, diferentemente da via seca, não houve ocorrência de OTA no café pergaminho nas amostras que se encontravam no terreiro, embora as atividades de água fossem propícias para o desenvolvimento de fungos. As medidas de Aa estão apresentadas na Figura 20.

Figura 20: Medidas de atividade de água (Aa) em amostras de terreiro da via úmida, nas regiões estudadas.

Várias amostras permaneceram em terreiro com Aa ideal à produção de OTA, porém não foi detectada sua presença, o que poderia explicar este fato é a retirada da mucilagem dos frutos que serviria como substrato para o desenvolvimento dos fungos e a diminuição do tempo de terreiro.

A OTA foi detectada em três amostras provenientes do PR colhidas na tulha, nas outras duas regiões (SP e RJ) não estava presente, como mostra a Figura 21.

FIGURA 21: Medidas de atividade de água (Aa) de frutos cereja descascados colhidos em tulha na via úmida, nas três regiões estudadas. As estrelas indicam contaminação por OTA.

A ordem crescente para OTA foi inversa ao tempo de tulha, como mostra a Tabela 5, o café que passou 20 dias era o que possuía menor quantidade 3 ng.g^{-1} , o de 9 dias $3,9 \text{ ng.g}^{-1}$ e o que passou um dia continha $10,4 \text{ ng.g}^{-1}$.

TABELA 5 - Amostras da via úmida provenientes da tulha, Cornélio Procópio/PR.

Tulha	Aa	OTA (ng.g^{-1})
1dia	0,669	10,4
3dias	0,575	nd
5dias	0,636	nd
9dias	0,656	3,9
12dias	0,574	nd
20dias	0,633	3

Esses dados evidenciam que o aparecimento da OTA pode não ter ocorrido na tulha, pois o café que acabara de chegar, no período de um dia, já continha OTA e sua Aa estava em nível seguro. O café que passou 20 dias na tulha continha 3 ng.g^{-1} e se houvesse qualquer problema com a tulha, como vazamentos, a

concentração possivelmente, deveria ser bem maior. No Paraná, a causa mais provável dessa contaminação poderia ser as condições climáticas da região no momento da colheita dos frutos.

Foi verificado por TANIWAKI *et al.* (2003) que para explicar altas concentrações de OTA encontradas em armazéns, levaram em conta falhas constatadas na infraestrutura da propriedade, como por exemplo, elevadores de tulha quebrados e secadores mecânicos mal posicionados, que possibilitaram o aumento da temperatura e da umidade ambiente, provocando o desenvolvimento de fungos e produção de OTA.

Análise de fungos

A Tabela 6 mostra a análise descritiva de bolores, leveduras e fungos potencialmente toxigênicos, que nesta etapa apresentou Aa média de 0,77 com variação mínima de 0,55 e máxima de 0,99.

TABELA 6 - Análise descritiva da via úmida para bolores, leveduras, *Aspergillus* seção *Nigri*, *A. ochraceus* e *Penicillium* spp (log UFC/cereja)

Variável	N	Média	Mínimo	Q1	Mediana	Q3	Maximo
Bolores	29	3,129	1,000	1,000	3,560	4,290	5,200
Leveduras	29	4,902	1,000	3,955	5,180	6,005	6,780
<i>A. Nigri</i>	29	0,183	0,000	0,000	0,000	0,000	4,000
<i>A. ochraceus</i>	29	0,193	0,000	0,000	0,000	0,000	3,300
<i>Penicillium</i>	29	1,123	0,000	0,000	0,000	2,405	4,300

A Nigri Aspergillus seção *Nigri*;

O resultado de fungos mostra bolores e leveduras totais em quantidades maiores que os fungos potencialmente toxigênicos. As médias de bolores e leveduras foram de 3,1 e 4,9 log de UFC/cereja, respectivamente. As leveduras apresentaram a maior média e *Aspergillus* seção *Nigri* e *A. ochraceus* as menores, sugerindo que essas altas concentrações presentes na superfície dos grãos

poderiam estar relacionadas às condições em que os frutos foram processados, mas que devido às características da via úmida não favorecem o desenvolvimento de fungos.

A. ochraceus foram isolados em SP e no PR, sendo que somente na amostra do PR houve coincidência da detecção de OTA (3 ng.g^{-1}) e a presença desse fungo na mesma amostra.

Na Figura 22 está representada a análise descritiva da distribuição dos fungos potencialmente toxigênicos nas regiões estudadas.

FIGURA 22: Distribuição de fungos potencialmente toxigênicos, via úmida, para as três regiões de coleta.

Os fungos *Penicillium* spp foram os fungos mais encontrados nas três regiões, não havendo diferenças significativas ($p>0,05$) entre as médias das regiões. Contudo, pode-se observar que a maior variação entre as regiões foi no Estado do Paraná, que poderia estar relacionada a vários fatores e entre eles, os climáticos ou de práticas de agricultura. Os fungos *Aspergillus* seção *Nigri* só apareceram no Paraná. Estes dados vêm de encontro com Frank (1999) que relatou que a via

úmida parece ser menos susceptível a infecção por *Aspergillus* spp e a contaminação por OTA.

Análise de artrópodes

Dentre os insetos, os que se destacaram foram da Ordem Coleóptera, em particular a broca do café. Nesta etapa houve o desaparecimento dos outros insetos Homoptera, Diptera e Hymenoptera. Não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre as regiões, como observado na Figura 23. Contudo, pode-se observar uma menor variação entre as amostras no Estado do Rio de Janeiro.

FIGURA 23: Distribuição de insetos da Ordem Coleoptera (broca do café) via úmida, para as três regiões de coleta (PR, RJ e SP).

Nesta fase, a presença de amostras positivas para grãos brocados foi de 86% e para insetos da Ordem Coleoptera de 76%.

A distribuição dos grãos brocados ao longo do tempo, representada na Figura 24, mostra que em três situações houve altos picos da broca do café, duas no RJ e

uma no PR que não apresentou associação significativa ($p>0,05$) entre a presença dessas infestações e a contaminação da OTA.

FIGURA 24: Distribuição de porcentual de grãos brocados durante a via úmida, em fruto pergaminho.

A via úmida eliminou vários insetos, mas não a broca do café. Este fato sugere que apesar deste processo estar bem controlado com baixas contagens, não foi possível sua eliminação e sim o seu controle o que será muito importante no tempo de armazenamento.

Nesta fase os ácaros de campo não foram encontrados e os ácaros presentes foram os da família Acaridae (74%). A Figura 25 mostra que o Estado do PR apresentou maior mediana para este tipo de ácaro, porém não houve diferença significativa ($p>0,05$) quando se compararam as três regiões.

FIGURA 25: Distribuição de ácaros, via úmida, para as três regiões de coleta.

Os ácaros, de campo e de solo, desapareceram nesta via, contudo os da família Acaridae permaneceram. Poderia haver várias explicações para permanência destes ácaros, uma delas estaria relacionada com a presença da população de bolores e leveduras totais presentes nas superfícies dos frutos, da qual esse tipo de ácaro poderia se alimentar.

5.5 Armazém

O café verde é o produto do beneficiamento do café pergaminho (via úmida) ou do café coco (via seca), onde são retiradas suas camadas externas. Este procedimento poderá acontecer na própria fazenda ou nas cooperativas, onde permanecerá até ser vendido, para indústrias de torrefação nacionais ou para exportação. Foram coletadas 16 amostras de café verde; sendo 10 amostras do Estado de São Paulo, 5 do Rio de Janeiro e somente uma do Estado do Paraná

Determinação de OTA

No resultado deste estudo não houve detecção de OTA. As amostras coletadas permaneceram em média 40 dias nas tulhas e no momento da coleta estavam sendo beneficiadas. Esse resultado sugere que até o momento do beneficiamento o café se encontrava sem OTA.

Vários autores encontraram OTA em café verde como BATISTA *et al.* (2003) que constataram uma prevalência de OTA em café verde de 11% com média de 2,5 ng.g⁻¹, com variação de 0,47 a 4,82 ng.g⁻¹; TANIWAKI *et al.* (2003) relataram média 3,25 ng.g⁻¹ com variação de <0,2 a 109 ng.g⁻¹; MARTINS; MARTINS; GIMENO. (2003) obtiveram variação de 0,2 a 7,3 ng.g⁻¹; LEONI *et al.* (2001) uma concentração média foi de 7,1 ng.g⁻¹, com variação de 0,7 a 47,8 ng.g⁻¹ em café verde.

Embora vários autores tenham encontrado OTA em café verde, este estudo se concentrou na produção primária uma vez que as amostras foram colhidas na fazenda em que foram produzidas, sendo somente avaliado o armazenamento de 40 dias. Nos estudos acima citados os autores utilizaram café verde vindos de países produtores ou cafés ensacados, variando o período de armazenamento, tipos de transporte, principalmente os de longa distância que poderiam ser fatores importantes no aparecimento da OTA.

Análise de fungos

A Tabela 7 mostra o resumo da análise descritiva das variáveis bolores, leveduras e fungos potencialmente toxigênicos. A Aa média desta fase foi de 0,54, com mínima de 0,42 e máxima de 0,63.

TABELA 7 - Análise descritiva da via seca para bolores, leveduras, *Aspergillus* seção *Nigri*, e *Penicillium* spp (log UFC/cereja)

Variável	N	Média	Mínimo	Q1	Mediana	Q3	Maximo
Bolores	16	2,310	1,000	1,000	2,595	3,248	3,600
Leveduras	16	2,827	1,000	1,383	2,895	3,768	4,960
<i>A.Nigri</i>	16	0,486	0,000	0,000	0,000	0,000	3,780
Pen	16	1,096	0,000	0,000	0,650	2,245	3,150

A.Nigri - *Aspergillus* seção *Nigri* e Pen *Penicillium* spp

O resultado de fungos mostra uma diminuição na carga de bolores e leveduras totais de 2,31 e 2,83 log de UFC/cereja, respectivamente, sugerindo que as etapas anteriores foram conduzidas propriamente e de acordo com as Boas Práticas Agrícolas e que as condições de armazenamento nas tulhas propiciaram a manutenção da qualidade do café. Ao contrário de URBANO *et al.* (2001) que isolaram uma média de bolores e leveduras, em 1998, de $8,5 \times 10^8$ UFC/g e, em 1999, de $9,4 \times 10^5$ UFC/g em café de armazém; ainda isolaram *A.ochraceus* e *niger*, fato que pode estar relacionado às precárias condições de armazenamento que poderiam existir nas propriedades estudadas.

No presente estudo, em 50% das amostras houve presença de fungos do gênero *Penicillium* spp e em 18,8% de *Aspergillus* seção *Nigri*, cuja distribuição está demonstrada na Figura 26, mostrando que *Penicillium* spp foram os fungos mais presentes sem diferenças significativas entre os Estados de São Paulo e Rio de Janeiro. *A. seção Nigri* foram mais presentes em São Paulo. Acredita-se que essa diferença entre as regiões poderia estar relacionada com as condições climáticas da região de coleta de São Paulo, que apresentou um período anormal de estiagem e temperaturas ambientais altas.

FIGURA 26: Distribuição de fungos na fase de armazém em SP e RJ.

Vários autores constataram a presença de fungos potencialmente ocratoxigênicos em café verde por diversas metodologias (BATISTA *et al.*, 2003; TANIWAKI *et al.* 2003; MARTINS; MARTINS; GIMENO, 2003) mostrando que o isolamento depende de vários fatores como tempo de armazenagem, transporte, metodologias utilizadas, entre outros.

Análise de artrópodes

A presença de grãos brocados nesta etapa foi de 93,8% e não houve diferença significativa entre RJ e SP. A presença de insetos coleópteros (broca do café) nas amostras analisadas foi de 87,5% e 62,5% de ácaros. Na Figura 27 está a distribuição da frequência dos insetos e ácaros. Pode-se observar que no Estado do Rio de Janeiro teve a maior ocorrência da broca do café e de ácaros da família Acaridae.

FIGURA 27: Distribuição de insetos e ácaros na fase de armazém.

Segundo CASTRO e LEITÃO (2002), no armazenamento se houver esporos de fungos externamente na superfície dos grãos estes serão um problema potencial e o ataque por insetos facilitaria a contaminação dos grãos. Neste estudo, apesar da presença de grãos brocados, da broca do café e de ácaros, as condições de Boas Práticas Agrícolas foram bem controladas e com isso não favoreceu o desenvolvimento de fungos e de insetos.

5.6 Café de varrição

Neste trabalho deparou-se com um tipo de amostra que não fazia parte do processamento normal de café verde, o café de varrição. Pode-se encontrá-lo por vários motivos. Neste estudo foi encontrado mais no Estado do Paraná dada à condição climática existente do ano da coleta das amostras. Próximo da época da colheita de café choveu muito, o que levou a maioria dos grãos cair no chão e os que permaneceram nos pés, muitos apodreceram. Este é um cenário muito ruim para a produção de café verde, isto é, depende da natureza, o que é incontrolável para o homem. O contato do café com o solo e sua duração favorecem a infecção do fruto por fungos produtores de OTA.

Determinação de OTA

Foram colhidas 7 amostras de café de varrição, sendo que seis foram do PR e uma de SP. A prevalência de OTA nessas amostras foi de 57% como mostra a Figura 28. A média foi de $32,7 \text{ ng.g}^{-1}$ e a variação de nd a $101,0 \text{ ng.g}^{-1}$. As 4 amostras positivas foram do Paraná e apresentaram OTA acima dos limites tolerados por países importadores ($19,6$; $23,0$; $52,6$ e $101,0 \text{ ng.g}^{-1}$).

FIGURA 28: Gráfico setorial representando a presença (verde) e ausência (vermelho) de OTA encontrada no café de varrição.

Esses dados mostram que além de uma elevada prevalência de OTA, as concentrações eram maiores que as encontradas nas etapas normais do processamento. Estes dados vão de acordo com De MORAES e LUCHESI (2003) que encontraram altas concentrações de OTA em café de varrição que foram tratados por diferentes processamentos: na via úmida encontraram média de $22,5$; variando de nd a $73,7 \text{ ng.g}^{-1}$; na via seca registraram apenas uma amostra de varrição, com concentração de 160 ng.g^{-1} .

As mesmas autoras encontraram OTA em concentrações que variaram de 3,6 a 71,6 ng.g⁻¹ em produção de café orgânico, feitos com frutos de cafés que foram derriçados diretos no solo (café de varrição). Em outro caso relatam que encontraram numa pequena propriedade, uma única amostra de café que fora elaborado com frutos derriçados no solo e secos em terreiro de terra, cuja concentração de OTA foi de 563 ng.g⁻¹, evidenciando que o contato dos frutos com o solo e o tempo desse contato são fatores de risco para o aparecimento da OTA.

No estudo de TANIWAKI *et al.* (2003) foi relatado que algumas amostras cuja concentração de OTA fora elevada tinham como origem cafés que haviam caído no chão. De MORAES e LUCHESI (2003) relatam que o café de varrição representa uma parcela do café produzido e não é rejeitado, porém é misturado a outros cafés verdes.

Análise de fungos

A Tabela 8 mostra carga de bolores e leveduras totais e fungos potencialmente toxigênicos, que nesta etapa apresentou Aa média de 0,697 com variação mínima de 0,584 e máxima de 0,934.

TABELA 8 - Análise descritiva de café de varrição para bolores, leveduras, *Aspergillus* seção *Nigri* e do gênero *Penicillium* spp

Variable	N	Média	Minimo	Q1	Mediana	Q3	Maximo
Bolores	7	3,930	2,510	2,900	3,450	4,900	5,560
Leveduras	7	4,854	3,700	4,410	5,150	5,260	5,530
<i>A.Nigri</i>	7	0,471	0,000	0,000	0,000	0,000	3,300
<i>Penicillium</i>	7	1,123	0,000	0,000	0,000	2,300	4,560

A nigri Aspergillus seção *Nigri*

Os resultados para fungos mostram grande quantidade de leveduras e bolores totais e fungos potencialmente toxigênicos em menores quantidades. As médias

de bolores e leveduras foram de 3,9 e 4,8 log UFC/cereja, respectivamente. Os fungos *Penicillium* spp foram os mais presentes. A. seção *Nigri* e *Penicillium* spp foram testados para produção de OTA e os resultados foram negativos. Os resultados indicam que apesar das amostras apresentarem altas concentrações de OTA, o principal fungo produtor desta micotoxina, *A. ochraceus* não foi encontrado.

Análise de artrópodes

A presença de grãos brocados foi de 87,5%, de Coleóptero (broca do café) foi 57,1% e 42,9% continham larvas de Díptera. O aparecimento de insetos da Ordem Díptera poderia estar relacionado com o fato de que a amostra apresentava Aa alta permitindo a sua presença, comuns em frutos cerejas. Nesta etapa também foram encontrados 42,9% de ácaros da família Acaridae, similarmente aos resultados das etapas anteriores.

5.7 Comparação das etapas de processamento

Para verificar a diferença entre as etapas campo, via seca, via úmida e armazém foi realizada análise de variância (ANOVA) a um nível de significância de 95% de confiança, entre as médias dos teores de OTA determinados nas amostras analisadas. Primeiramente, foi realizado o referido tratamento estatístico nas etapas normais e posteriormente incluiu-se o café de varrição.

A comparação entre as etapas indica um F_{obs} 0,73 ($p=0,537$) sugerindo que não houve diferença significativa para apoiar a hipótese que as médias fossem diferentes. Como houve poucos resultados positivos para OTA, nas vias seca e úmida cujas prevalências da OTA foram de 7% e 10,3%, respectivamente, foi testada a análise paramétrica (Kruskal Wallis $p=0,407$) que confirmou o mesmo resultado da ANOVA. Na Tabela 9 encontram-se os dados obtidos no estudo, e

observa-se um maior intervalo de confiança na etapa da via seca em relação à via úmida. Este fato poderia ser explicado pelas características da via seca.

TABELA 9 - Valores médios, desvio padrão e intervalos de confiança de OTA encontrados nas etapas de processamento.

Etapas do processo	N	Média $\pm$ DP	Intervalo de Confiança
Campo	14	0,0 $\pm$ 0,0	0,0000.....0,0000
Via Seca	43	2,24 $\pm$ 10,31	-0,9568.....5,4112
Via Úmida	29	0,50 $\pm$ 2,04	-0,2711.....1,2780
Armazém	16	0,0 $\pm$ 0,0,	0,0000.....0,0000
Varrição	7	28,0 $\pm$ 37,38	-6,538.....62,595

Na via seca, o fruto é submetido à secagem em terreiro. Este fruto sofre degradação da matéria orgânica em seu interior até se obter uma umidade ideal para armazenamento. A série de eventos que acontece é uma competição entre microrganismos e artrópodes existentes nos frutos e no ambiente. A matéria orgânica deve ser quebrada de forma controlada para não acontecer fermentações indesejáveis levando o produto a conter aromas não próprios. Toda passagem dos frutos bóia e verde pelo terreiro deve ser constantemente controlada para que cada fruto receba o cuidado e técnica exata de secagem, segundo as Boas Práticas Agrícolas. Por sua vez, os terreiros devem ter capacidade física de receber os lotes de frutos que são produzidos, serem construídos ou estarem localizados em áreas específicas da fazenda que não agreguem nesta etapa umidade, impurezas, etc. Quanto ao terreiro em si, a parte física, é um ponto de controle do produtor e deve ser monitorado anualmente antes de cada colheita, seguindo as normas de construção e manutenção. Porém, não é um ponto crítico de controle, pois mesmo não se controlando os terreiros não houve associação positiva entre a produção de OTA e a manutenção do terreiro, neste estudo. Também se pode evidenciar que a prevalência de OTA é baixa e que ela pode ser formada devido às condições propícias, porém estará

controlada uma vez que a competição dos microrganismos pela matéria orgânica dos frutos será alta e os fungos potencialmente toxigênicos não se estabelecem satisfatoriamente, principalmente *A. ochraceus*, o maior produtor de OTA.

Como visto por TANIWAKI *et al.* (2003) várias razões foram investigadas para explicar altas concentrações encontradas de OTA, pois na situação relatada o terreiro da propriedade estudada era muito pequeno em relação à produção de café e as camadas de frutos de café eram mais grossas, o que as Boas Práticas Agrícolas não recomendam; a localização do terreiro era numa bacia e uma névoa sempre estava presente, aumentando a umidade local. Esses fatores juntos aumentam a probabilidade do aparecimento da OTA. No trabalho realizado por URBANO *et al.* (2001) verificou-se que a presença de OTA nos frutos foi resultado de um mau controle dos procedimentos de colheita, condições precárias de secagem e inadequadas de armazenagem, permitindo a proliferação de fungos toxigênicos.

Diferentemente, no caso do café de varrição, quando os dados analíticos obtidos foram avaliados pela análise de variância, houve mudança da sua significância ($p < 0,001$), apoiando a hipótese de que a sua média é diferente e a concentração encontrada é superior, indicando um F_{obs} 9,74 ($p = 0,000$). A Figura 29 mostra a distribuição de OTA nas diversas etapas incluindo as amostras de café de varrição.

FIGURA 29: Distribuição de OTA nas diversas etapas do processamento primário de café verde

Os resultados descritos na Tabela 9 e mostrados na Figura 29 para café de varrição mostram que há um aumento significativo da prevalência, da média e dos teores encontrados de OTA em relação às demais etapas e, ainda evidenciam uma grande variação. Este fato sugere que essa variação existente nesse tipo de café poderia ter origem em função de vários fatores como, as condições climáticas, o *stress* da planta, o tempo em que o fruto permaneceu no solo, entre outros.

5.8 Fatores de risco versus o aparecimento da OTA

A presença da OTA foi avaliada num determinado período de tempo, em três regiões distintas. O estudo foi realizado em propriedades que mantinham as Boas Práticas Agrícolas e recebiam orientação de alguma instituição de extensão rural, o que representou uma condição para a análise das etapas de processamento.

Primeiramente, foi realizada uma análise univariada com o objetivo de selecionar os fatores de risco que poderiam apresentar associação com o aparecimento de OTA. As técnicas de análise adotadas nesta etapa foram o teste exato de Fisher e o teste de Kruskal-Wallis no nível de significância de 95% de confiança. As variáveis selecionadas foram escolhidas para o ajuste de um modelo de regressão logística a partir de um $p < 0,20$. O resultado da significância dessa análise encontra-se na Tabela 10, entre as variáveis significantes estão a região e o café de varrição.

TABELA 10 - Significância da análise de associação entre os fatores de riscos estudados e presença de OTA

Fatores de risco	Significância da análise estatística
Etapas do processamento (campo, via seca, via úmida, armazém, varrição)	$p = 0,001^*$
Regiões (São Paulo, Rio de Janeiro e Paraná)	$p = 0,001^*$
Ácaros de solo	$p = 0,774$
Ácaros de campo	$p = 0,628$
Ácaros da família Acaridae	$p = 0,491$
Diptera (larvas)	$p = 0,635$
Insetos Homoptera	$p = 0,204$
Aa (atividade de água)	$p = 0,361$
% brocados	$p = 0,680$
Bolores	$p = 0,809$
Leveduras	$p = 0,553$
<i>A. seção Nigri</i>	$p = 0,533$
<i>Penicillium</i>	$p = 0,569$

* teste significativo

A análise de regressão logística foi realizada para estimar o risco de aparecimento de OTA associado com os fatores selecionados. O modelo de regressão foi ajustado para as variáveis significativas e o resultado encontra-se na Tabela 11. O

fator mais fortemente relacionado ao risco da presença de OTA no processamento primário de café verde foi o café de varrição e segundo fator é a região.

TABELA 11 - Razão de chances para os fatores significantes relacionados a presença da OTA.

Fator de Risco	"OR Odds Ratio" Razão de Chances	Intervalo de Confiança 95%
Região	7,43	1,35-----40,98
Varrição	9,47	1,51-----59,40

Os resultados da regressão logística mostraram um risco de 9,5 (95% IC 1,5-59,4) do aparecimento da OTA estar associada ao café de varrição. A possibilidade dos frutos que caíram no solo entrar em contato com fungos produtores de OTA, cujo ambiente é adequado para a preservação dos esporos, é maior em relação aos que não caíram. O tempo que esse fruto passará em contato com o solo, as condições de umidade, as temperaturas ambientais, o *stress* da planta, fatores de competição entre microrganismos ou outras condições é que determinarão o desenvolvimento dos fungos e a produção de OTA. Os resultados deste estudo mostraram que o café de varrição tem nove vezes mais chances de conter OTA que um café que não caiu no chão.

A região foi o segundo fator associado ao aparecimento da OTA apresentando um risco de 7,4 (95% IC 1,35- 40,98), porém muitas das amostras que caíram ao solo foram em consequência das condições climáticas de uma determinada região, sugerindo um possível fator de confusão. Contudo, na análise das variáveis etapa por etapa foi observado que muitas das diferenças entre os resultados obtidos foram atribuídas às regiões, evidenciando sua importância. Desta forma, este resultado deve ser novamente avaliado.

Este estudo confirma, ainda, que o café de varrição representa um fator de risco. Portanto, deve ser considerado como um Ponto Crítico de Controle (PCC), pois

não há nenhuma etapa posterior no processamento que diminua os teores de OTA, pelo contrário, o café verde produzido sem OTA poderá vir a desenvolver fungos e, conseqüentemente, produzir OTA se as condições ambientais de armazenamento e transporte não forem realizadas segundo procedimentos adequados. Desta forma, a produção de café verde que utiliza café de varrição deveria sofrer monitoramento, com limites críticos dos níveis de concentração de OTA que seriam estabelecidos pelos estudos toxicológicos. O destino dessa produção deveria estar registrado na propriedade para haver rastreabilidade em toda a cadeia seguida pelo café. Atualmente, como foi relatado por De MORAES e LUCHESE (2003), esse tipo de café é adicionado a cafés de melhor qualidade e por essa razão os lotes misturados deveriam ser controlados para segurança final do produto.

6 - CONCLUSÕES

Pelos resultados do estudo, pode-se concluir que:

- O fator de risco mais fortemente relacionado ao aparecimento da OTA é o café de varrição.
- A prevalência de OTA é baixa na via seca, porém a concentração é alta, devido a condições favoráveis que esta via apresenta.
- Na via úmida a prevalência de OTA é baixa e as concentrações são inferiores as da via seca. Esta etapa agrega qualidade ao produto, embora seu custo seja mais elevado.
- A ocorrência de fungos ocratoxigênicos, principalmente de *A. ochraceus* é baixa. O processamento diminui a carga de bolores e leveduras totais.
- O processamento primário de café verde eliminou os artrópodes, exceto a broca do café.
- Os fungos e os artrópodes não apresentaram risco para o aparecimento da OTA, quando as Boas Práticas de Agricultura são adotadas.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABARCA, M.L.; BRAGULAT, G.; CASTELLÁ, G.; CABAÑES, F.J. Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60, p.2650-2652, 1994.

ANDRADE, E.; PEREIRA, R.; VILLELA, T. **Composição química do café sob diferentes processamentos**. In: COFFEE break: o portal do agronegócio do café. O cafezal. Artigos e projetos. Disponível em: <http://www.coffeefbreak.com.br>: Acesso em: 23 mar. 2005.

ASSAF, H.; BETBEDER, A.M.; CREPPY, E.E.; PALLARDY, M.; AZOURI, H. Ochratoxin levels in human plasma in Lebanon. **Human and Experimental Toxicology**, v.23, n.10, p.495-501, 2004.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ. **História do café**. Disponível em: http://www.abic.com.br/scafe_historia.html. Acesso em: 24 fev. 2005.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of Association of Official Analytical Chemists**. 17.ed. Gaithersburg, 2000 (a). p.46.

BATISTA, L.C.; CHALFOUN, S.M.; PRADO, G.; SCWAN, R.F; WHEALS, A.E. Toxigenic fungi associated with processed (green) coffee beans (*Coffea arabica* L.). **International Journal of Food Microbiology**, v.85, n.3, p.293-300, 2003.

BEUX, M.; SOCCOL, C.R. Microbiota isolada durante as fases de pré e pós-colheita dos grãos de café associada à qualidade e sanidade da bebida. **Boletim CEPPA**, v.22, n.1, p.155-172, 2004. Disponível em; <http://calvados.c3sl.ufpr.br/ojs2/index.php/alimentos/article/view/1187/988>. Acesso 24 jan. 2007

BEUX, M.R. **Café- Estudo da Biodiversidade microbiana de frutos de café do Brasil, seleção de cepa de leveduras e bactérias lácticas com ação fugistática contra *Aspergillus ochraceus* produtor de ocratoxina A**. Curitiba, 2004. (Tese de Doutorado – Universidade Federal do Paraná). Disponível em: <http://dspace.c3sl.ufpr.br/dspace/items-by-thor?author=Beux%2C+Marcia+Regina>. Acesso : 24 jan. 2007.

BOOTH, R.G.; COX, M.L.; MADGE, R.B. **Coleoptera**. London: International Institute of Entomology, Natural History Museum, 1990. 384p. (IIE Guides to insects of importance to man).

BORROR, D.J.; DeLONG, D.M. **Introdução ao estudo dos insetos**. São Paulo: Edgar Blucher, 1988. 653p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos/Instituto Adolfo Lutz**. 4ed., Brasília:Ministério da Saúde, 2005. p.778-789.

BUCHELI, P.; KANCHANOMAI, C.; MEYER, I.; PITTER, A. Development of ochratoxin A during Robusta (*Coffea canephora*) coffee cherry drying. **Journal of Agricultural of Food Chemistry**, v.48, n.4, p.1358-1362, 2000.

BUCHELI, P.; TANIWAKI, M.H. Review research on the origin, and on the impact of post-harvest handling and manufacturing on the presence of ochratoxin A in coffee. **Food Additives and Contaminants**, v.19, n.7, p.655-665, 2002.

BUSSAB, W.O.; MORETTIN, P.A. **Estatística básica**. 4.ed., São Paulo: Atual, 1985. 329p.

CARRION, G.; BONET, A. Mycobiota associated with the coffee berry borer (*coleoptera:sycolytidae*) and its galleries in fruit. **Annals of the Entomological Society of America**, v.97, n.3, p.492-499. 2004.

CASTRO, M.F.P.M.; LEITÃO, M.F.F. Boas práticas agrícolas e aplicação do sistema appcc no cultivo e processamento industrial do café obtido pela via seca. **Higiene Alimentar**, v.16, n.96, p.29-42, 2002.

CHALFOUN, S.M.; BATISTA, L.R. Fungos associados a frutos e grãos do café: *Aspergillus Penicillium*. Brasília: EMBRAPA, 2003. 69p.

CHALFOUN, S.M.S. **Produção de café de qualidade: colheita e preparo**. In: COFFEE break: o portal do agronegócio do café. O cafezal. Artigos e projetos. Disponível em: <http://www.coffeebreak.com.br>. Acesso em: 23 mar. 2005.

CHRISTENSEN, M. The *Aspergillus ochraceus* group: two new species from western soils and a synoptic key. **Mycologia**, v.74, n.2, p.210-225, 1982.

CIEGLER, A. Bioproduction of ochratoxin A and penicillic acid by members of *Aspergillus ochraceus* group. **Canadian Journal of Microbiology**, v.8, p.631-636, 1972.

CIEGLER, A.; FENNEL, D.J.; SANSING, G.A.; DETROY, R.W.; BENNET, G.A. Mycotoxin-producing strains of *Penicillium viridicatum* classification into subgroups. **Applied Microbiology**, v.26, p.271-278, 1973.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Central de informações agropecuárias. Safras. **Café 2006/2007**. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conabweb/index.php?PAG=132> Acesso em: 14 mar. 2007.

De MORAES, M.H.P.; LUCHESE, R.H. Ochratoxin A on green coffee: influence of harvest and drying procedures. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, n.19, p.5824-5828, 2003.

DIRHEIMER, G. Mechanistic approaches to ochratoxin toxicity. **Food Additives and Contaminants**, v.13, suppl., p.45-48, 1996.

EUROPEAN UNION. Commission regulation (EC) n.123, de 26 janeiro de 2005. Emenda da Regulation (EC) n.466, considera ochratoxin A. In: EUROPEAN UNION. Documents. European Law. EUR-LEX. **Official Journal of the European Union**, 2005, L025, v.48, 28 jan. 2005. p.3. Disponível em: <http://eur-lex.europa.eu/JOIndex.do?year=2005&serie=L&textfield2=25&Submit=Search>. Acesso em: 5 abril 2005.

FAZUOLI, L.C. Melhoramento genético do cafeeiro. In: REUNIÃO ITINERANTE DE FITOSSANIDADE DO INSTITUTO BIOLÓGICO, 10, Mococa, 2004. **Anais**. São Paulo: Instituto Biológico, p.2-28, 2004.

FDA. Center for Food Safety and Applied Nutrition. Technical Bulletin Number 5: **Macroanalytical procedures manual, 1984**. [Electronic version, 1998]. Macroanalytical methods. Beverage and beverage materials. Method for coffee beans. Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/mpm-toc.html>. Acesso em: 28 out 2002.

FERREIRA, A.J.; MIRANDA, J.C.; BUENO, V.H.P.; ECOLE, C.C.; CARVALHO, G.A. Bioecologia da broca-do-café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867) (Coleoptera:Scolytidae), no agroecossistema cafeeiro do cerrado de Minas Gerais. **Ciência e agrotecnologia**, v.27, n.2, p.422-431, 2003.

FILTENBORG, O.; FRISVAD, J.C.; THRANE, U. Moulds in food spoilage. **International Journal of Food Microbiology**, v.33, p.85-102, 1996.

FILTENBORG, O., FRISVAD, J.C., SAMSON, R.A. Specific association of fungi to foods and influence of physical environmental factor, In: Samson, R.A., Hoekstra, E.S., Frisvad, J.C., Filtenborg, O. (Eds), **Introduction to Food and Airborne Fungi**, 6th Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, p. 306-320, 2000.

FONSECA, H. Micotoxina on line. Legislação Nacional e Internacional de Micotoxinas. Disponível em: www.micotoxinas.com.br . Acesso em outubro de 2006.

FLECHTMANN, C.H.W. **Ácaros de importância agrícola**. São Paulo: Nobel, 1989. 189p.

FRANK, M. **Prevención contra las micotoxinas y descontaminación sistema de HACCP y su potencial para combatir las micotoxinas: una evaluación de la ocratoxina A em la producción del café**. In: FAO/OMS/PNUMA CONFERENCIA INTERNACIONAL, 3, Túnez, 1999. Proceedings. Túnez:PNUMA, 1999. 1-13p.

FRANZOLIN, M.R.; GAMBALE, W.; CUERO, R.G.; CORREA, B. Interaction between toxigenic *Aspergillus flavus* Link and mites (*Tyrophagus putrescentiae* Schrank) on maize grains: effects on fungal growth and aflatoxin production. **Journal of Stored Products Research**, v.35, n.3, p.215-224, 1999.

FREITAS, R.F.; PFENNING, L.H.; CHAUFLON, S.M.; BATISTA, L.R.; MAIA, T.J.A.F.; SANTOS, A.F.C. Ocorrência e Severidade da Contaminação de grãos de café (*Coffea arabica* L.) por fungos do gênero *Aspergillus* em diversas propriedades de Minas Gerais. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 2, Vitória, 2001. **Anais**. Brasília: EMBRAPA, p.245-248, 2002.

FURLANI, R.P.Z. **Ocratoxina A em café brasileiro**. Campinas, 1998, 61p. (Tese de Mestrado – Faculdade de Engenharia de Alimentos – Universidade Estadual de Campinas).

FURLANI, R.P.Z.; SOARES, L.M.V. Revisão: ocratoxina A em Café. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.2, n.1/2, p.1-6, 1999.

GALTIER, P.; ALVINERIE, M.; CHARPENTEAU, J. The pharmacokinetic profiles of ochratoxin A in pigs, rabbits and chicken. **Food and Cosmetics Toxicology**, v.19, p.735-738, 1981.

HALSTEAD, D.G.H. Keys for the identification of beetles associated with stored products. I. Introduction and key to families. **Journal of Stored Products Research**, v.22, p.163-203, 1986.

HEENAN, C.N.; SHAW, K.J.; PITT, J.I. Ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* isolates and detection using coconut cream agar. **Journal of Food Mycology**, v.1, p.67-72, 1998.

HORIE, Y. Productivity of ochratoxin A of *Aspergillus carbonarius* in *Aspergillus* section Nigri. **Nippon Kingakukai Kaiko**, v.36, p.73-76, 1995. *apud* BUCHELI, P.; TANIWAKI, M.H. Review research on the origin, and on the impact of post-harvest handling and manufacturing on the presence of ochratoxin A in coffee. **Food Additives and Contaminants**, v.19, n.7, p.655-665, 2002.

HUGDES, A.M. **The mites of stored food and houses**. 2.ed. London: HMSO, 1976. 400p. (Technical bulletin. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, 9).

INSTITUTO AGRONÔMICO DE CAMPINAS. Centro de Análise e Pesquisa do Agronegócio do Café: "Alcides Carvalho" **Principais contribuições para a cafeicultura paulista e nacional**. Disponível em: <http://www.iac.sp.gov.br>. Acesso em: 17 mar. 2005.

INSTITUTO AGRONÔMICO DO PARANÁ. **O café no mundo**. Disponível em: <http://www.iapar.br>. Acesso em: 18 abril 2005.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CÂNCER. **Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins**. Lyon, Geneva: IARC Press, WHO, 1993. p.489-521. (IARC monographs on evaluation of carcinogenic risks to human, v.56).

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 and Food Microbiology**, v.65, p.39-44, 2001.

JORGENSEN, K.; BILDE, B. Occurrence and estimated dietary intakes of ochratoxin A in European countries: results from a SCOOP project. **Food Additives and Contaminants**, v.13, suppl., p.15-16, 1996.

KRANTZ, G. W. **Manual of acarology**. 2.ed. Corvallis:Oregon State University Book Stores, 1978. 509p.

KROGH, P.; ELLING, F.; HALD, B.; LARSEN, A.E.; LILLEHOJ, E.B.; MADSEN, A.; MORTENSEN, H.P. Time-dependent disappearance of ochratoxin A a residues in tissues of bacon pigs. **Toxicology**, v.6, p.235-242, 1976.

LEBRUN, S.; FÖLLMANN, W. Detection of ochratoxin A-induced DNA damage in MDCK cells by alkaline single cell gel electrophoresis (comet assay). **Archives of Toxicology**, v.75, p.734-741, 2002.

LECOMTE, H. **Le café**. Paris: Imprimerie Durand, 1899. 342p.

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**, v.21, n.1, p.105-107, 2001.

LEVI, C.P.; TRENK, H.L.; MOHR, H.K. Study of occurrence of ochratoxin A in green coffee beans. **Journal of the Association Official Analytical Chemists**, v.57, n.4, p.866-870, 1974.

LINDSEY, H. Ochratoxin A may cause testicular cancer. **Lancet Oncology**, v.3, p.129, 2002.

MAAROUFI, K.; ACHOUR, A.; BETBEDER, A.M.; HAMMAMI, M.; ELLOUZ, F.; CREPPY, E.E.; BACHA, H. Foodstuffs and human blood contamination by mycotoxin ochratoxin A: correlation with chronic interstitial nephropathy in Tunisia. **Archives of Toxicology**, v.69, n.8, p.552-558, 1995.

MARTINS, M.L.; MARTINS, H.M.; GIMENO, A. Incidence of microflora and ochratoxin A in green coffee beans (*Coffea arabica*). **Food Additives and Contaminants**, v.20, n.12, p.1127-1131, 2003.

MASOUD, W.; KALTOFT, C.H. The effects of yeasts involved in fermentation of *Coffea arabica* em East África on growth and ochratoxin A (OTA) production by *Aspergillus ochraceus*. **International Journal of Food Microbiology**, v.106, p.229-234, 2006. [Short communication].

MICCO, C.; GROSSI, M.; MIRAGLIA, M.; BRERA, C. A study of contamination by ochratoxin A of green and roasted coffee beans. **Food Additives and Contaminants**, v.6, n.3, p.333-339, 1989.

MICCO, C.; MIRAGLIA, M.; BRERA, C.A.; CORNELI, S.; AMBRUZZI, A. Evaluation of ochratoxin A in human milk in Italy. **Food Additives and Contaminants**, v.12, n.3, p.351-354, 1995.

MIRAGLIA, M.; DE DOMINICIS, A.; BRERA, C.; CORNELI, S.; CAVA, E.; MENGHETTI, E. Ochratoxin A levels in human milk and related food samples: an exposure assessment. **Natural Toxins**, v.3, p.436-444, 1995.

MONACI, L.; PALMISANO, F. Determination of ochratoxin A in foods: state of art and analytical challenges. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.378, n.1, p.96-103, 2004.

MOSS, M.O. Mode of formation of ochratoxin A. **Food Additives and Contaminants**, v.13, suppl., p.5-9, 1996.

NAKAGIMA, M.; TERADA, H.; HISADA, K.; TSUBOUCHI, H.; YAMAMOTO, K.; UDA, T.; ITOH, Y.; KAWAMURA, O.; UENO, Y. Determination of ochratoxin A in coffee beans and coffee products by monoclonal antibody affinity chromatography. **Food and Agricultural Immunology**, v.2, p.189-195, 1990.

NAVAS, S.A.; SABINO, M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Aflatoxin M1 e OTA in human milk bank in the city of São Paulo, Brazil. **Food Additives and Contaminants**, v.22, n.5, p.457-462, 2005.

O'BRIEN, E.; DIETRICH, D.R. Ochratoxin A: the continuing enigma. **Critical Reviews in Toxicology**, v.35, p.33-60, 2005.

ORMOND, J.G.P.; De PAULA, S.R.L.; FAVERET FILHO, P. **Café: (re)conquista dos mercados**. BNDES Setorial, Rio de Janeiro, n.10, p. 3-56, set. 1999. Disponível em: <http://www.bndes.gov.br/conhecimento/Bnset/set1001.pdf> Acesso em: 24 abr. 2007.

OZPINAR, H.; AUGONYTE, G.; DROCHNER, W. Inactivation of ochratoxin A in ruminal fluid variation of pH-value and fermentation parameter in vitro system. **Environmental toxicology and pharmacology**, v.7, p.1-9, 1999.

PACHECO, I.A.; De PAULA, D.C. **Insetos de grãos-armazenados: identificação e biologia**. Campinas: Fundação Cargill, 1995. 228p.

PALACIOS CABRERA, H.; TANIWAKI, M.H.; HSHIMOTO, J.M.; MENEZES, H.C. Growth of *Aspergillus ochraceus* and *A. niger* on Culture media at Different Water Activities and Temperatures. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.36, p.24-28, 2005.

PALACIOS CABRERA, H.; TANIWAKI, M.H.; MENEZES, H.C.; IAMANAKA, B.T. The production of ochratoxin A by *Aspergillus ochraceus* in raw coffee at diferent equilibrium relative humidity and under alternating temperatures. **Food Control**, v.15, p.531-535, 2004.

PALLI, D.; MIRAGLIA, M.; SAIEVA, C.; MASALA, G.; CAVA, E.; COLATOSTI, M.; CORSI, A.M.; RUSSO, A.; BRERA, C. Serum levels of OTA in helth adults in Tuscany: Correlation with individual characteristic and between repeat measurements. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v.8, p.265-269, 2001.

PARDO, E.; MARÍN, S.; RAMOS, A.J.; SANCHIS, V. Effect of water activity and temperature on mycelial growth and ochratoxin A production by isolates of *Aspergillus ochraceus* on irradiated green coffee beans. **Journal of Food Protection**, v.68, n.1, p.133-138, 2005.

PATEL, S.; HAZEL, C.M.; WINTERTON, A.G.M.; GLEADLE, A.E. Survey of ochratoxin A in UK retail coffee. **Food Additives and Contaminants**, v.14, p.217-222, 1997.

PERAICA, M.; DOMIJAN, A.M.; FUCHS, R.; LUCIC, A.; RADIC, B. The occurrence of ochratoxin A in blood in general population of Croatia. **Toxicology Letters**, v.110, p.105-112, 1999.

PERAICA, M.; DOMIJAN, A.M.; LUCIC, A.; RADIC, B.; DELAS, F.; HORVAT, M.; BOSANAC, I.; BALIJA, M.; GRGICEVIC, D. Variations of ochratoxin A concentration in the blood of health populations in some Croatian cities. **Archives of Toxicology**, v.75, p.410-414, 2001.

PEREIRA, R.C.A.; VASCONCELOS, S.S.; SALES, F. Colheita e beneficiamento de café. (**Embrapa. Instruções Técnicas**, n.21, p.1-3, 1999). Disponível em <http://www.cpafac.embrapa.br/pdf/it21.pdf>. Acesso em: 8 maio 2003.

PITTET, A.; ROYER, D. Rapid, Low Cost Thin-Layer Chromatographic Screening Method for the Detection of Ochratoxin A in Green Coffee at a Control Level of 10 µg/kg. **J. Agric. Food Chem.** 50, 243-247, 2002

PFOHL-LESZKOWICZ, A.; PETKOVA-BOCHAROVA, T.; CHERNOZEMSKY, I.N.; CASTEGNARO, M. Balkan endemic nephropathy and associated urinary tract tumors: a review on aetiological causes and the potential role of mycotoxins. **Food Additives and Contaminants**, v.19, n.3, p.282-302, 2002.

PITT, J.I. **A laboratory guide to common *Penicillium* species**. 2.ed. North Ryde: CSIRO Food Research Laboratory, 1988. 187p.

PITT, J.I. *Penicillium viridicatum*, *Penicillium verrucosum* and production of ochratoxin A. **Applied and Environmental Microbiology**, v.53, p.266-269, 1987.

PITT, J.I.; HOCKING, A.D. **Fungi and food spoilage**. 2.ed. London: Blackie Academic & Professional, 1997. 450p.

RADIC, B.; FUCHS, R.; PERAICA, M.; LUCIC, A. Ochratoxin A in human sera in the area with endemic nephropathy in Croatia. **Toxicology Letters**, v.91, p.105-109, 1997.

RAMOS, A.J.; LABERNIA, N.; MARÍN, S.; SANCHIS, V.; MAGAN, N. Effect of water activity and temperature on growth and ochratoxin production by three strains of *Aspergillus ochraceus* on a barley extract medium and barley grains. **International Journal of Food Microbiology**, v.44, n.1/2, p.133-140, 1998.

RAPER, K.B.; FENNEL, D.I. **The genus *Aspergillus***. Baltimore: Williams & Wilkins, 1965. 686p.

RUPRICH, J.; OSTRY, V. Long-term administration of mycotoxin, ochratoxin in chickens and residues in meat and animal feed. **Vet Med**, v.36, p.685-693, 1991.

SABINO, M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Mycotoxin research in Brazil: the last decade in review. **Brasilian Journal of Microbiology**, v.33, p.1-11, 2002.

SÃO PAULO (Estado). Secretaria de Agricultura e Abastecimento. Coordenadoria de Assistência Técnica Integral. Divisão de Extensão Rural. **Manual de qualidade: o caminho para o lucro**. São Paulo: CATI-DEXTRU, 2001. [Folder].

SCHWARTZ, G.G. Hypotheses: does ochratoxin A causes testicular câncer. **Cancer Causes and Control**, v.13, p.91-100, 2002.

SEGGES, J.H. **Focalizando o café e a qualidade**. Rio de Janeiro: Seropédica, Universidade Rural, 2001. 104p.

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* in Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v.60, p.251-260, 2000.

SINHA, R.N.; WALLACE, H.A.H. Population dynamics of stored-product mites. **Oecologia**, v.12, p.315-327, 1973.

SKAUG, M.A.; HELLAND, I.; SOLVOLL, K.; SAUGSTAD, O.D. Presence of ochratoxin A in human milk in relation to dietary intake. **Food Additives and Contaminants**, v.18, p.321-327, 2001.

SOLTI, L.; SALAMON, F.; BARNA-VETRO, I.; GYONGYOSI, A.; SZABO, E.; WOLFLING, A. Ochratoxin A content of human sera determined by a sensitive Elisa. **Journal of Analytical Toxicology**, v.21, p.44-48, 1997.

STOEV, S.D. The role of ochratoxin A as a possible cause of Bálkân endemic nephropathy and risk evaluation. **Veterinary and Human Toxicology**, v.40, p.352-360, 1998.

STUDER-ROHR, I.; DIETRICH, D.R.; SCHLATTER, J.; SCHLATTER, C. Ochratoxin A and coffee: the occurrence of ochratoxin A in coffee. **Food and Chemical Toxicology**, v.33, p.341-355, 1994.

SUAREZ-QUIROZ, M.; GONZALEZ-RIOS, O.; BAREL, M.; GUYOT, B.; SCHORR-GALINO, S.; GUIRAUD, J.P. Effect of the post-harvest processing procedure on

OTA occurrence in artificially contaminated coffee. **International Journal of Food Microbiology**, v.103, p.339-345, 2005.[Short Communication]

TANIWAKI, M.H.; SILVA, N.; IANAMAKA, B.T. Comparison of culture media, simplate and petrifilm for enumeration of yeasts and molds in food. **Journal of Food Protection**, v.64, n.10, p.1592-1596, 2001.

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**, v.82, p.173-179, 2003.

TATU, C.A.; OREM, W.H.; FINKELMAN, R.B.; FEDER, G.L. The etiology of balkan endemic nephropathy: still more questions than answers. **Environmental Health Perspectives**, v.106, p.689-700, 1998.

TAUNAY, A.E.A. **Pequena história do café no Brasil**. Rio de Janeiro: Departamento Nacional do Café, 1945. 558p.

THUVANDER, A.; PAULSEN, J.E.; AXEBERG, K.; JOHANSSON, N.; VIDNES, A.; ENGHARDT-BARBIERI, H.; TRYGG, K.; LUND-LARSEN, K.; JAHRL, S.; WINDENFALK, A.; BOSNES, V.; ALEXANDER, J.; HULT, K.; OLSEN, M. Levels of ochratoxin A in blood from Norwegian and Swedish blood donors and their possible correlation with food consumption. **Food and Chemical Toxicology**, v.39, n.12, p.1145-1151, 2001.

TSUBOUCHI, H.; TERADA, H.; YAMAMOTO, K.; HISADA, K.; SAKABE, Y. Ochratoxin A found in commercial roast coffee. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.36, p.540-542, 1988.

UENO, Y.; MAKI, S.; LIN, J.; FURUYA, M.; SUGIURA, Y.; KAWAMURA, O. A 4-year study of plasma ochratoxin A in a selected population in Tokyo by immunoassay and immunoaffinity column-linked HPLC. **Food and Chemical Toxicology**, v.36, p.445-449, 1998.

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

VAN DER STEGEN, G.H.D. Enhancement of coffee quality by mold prevention. **Food Control**, v.14, p.245-249, 2003.

VEGA, F.E.; MERCADIER, G. Insects, coffee and ochratoxin A. **Florida Entomologist**, v.81, p.543-544, 1998.

VEGA, F.E.; MERCADIER, G.; DOWD, P.F. Fungi associated with coffee berry borre *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae). In: **ASIC COFFEE CONFERENCE**, 18, Helsinki, 1999. **Proceedings**. Lausanne: Association Scientifique Internationale du Café, 1999. p.229-238.

VINCENT, J.C. Green coffee processing. In: CLARKE, R.J.; MACRAE, R., eds. **Coffee technology**. London: Elsevier Applied Science, 1989.

WALKER, R. **Micotoxinas de creciente interés ocratoxinas**. In: FAO/OMS/PNUMA CONFERENCIA INTERNACIONAL, 3, Túnez, 1999. **Proceedings**. Túnez:PNUMA, 1999. 1-9p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Safety evaluation of certain mycotoxins in food**: fifty-sixth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). Geneva: WHO, 2001. (WHO Food Additives Series, n.47).

WOLFF, J.; BRESCH, H.; CHOLMAKOV-BODECHIENEL, C.; ENGEL, G.; GARAI, M.; MAJERUS, P.; ROSNER, H.; SCHEUER, R. Ochratoxin A: representative food consumption survey and epidemiological analysis. **Archiv für Lebensmittelhygiene**, v.51, p.81-128, 2000.