



CAROLINE LIMA ANGÉLICO

APLICAÇÃO DO AGENTE BIOLÓGICO
Cladosporium cladosporioides (Fresen) de Vries
“CLADOSPORIN” COMO BIOPROTETOR DA
QUALIDADE DO CAFÉ (*Coffea arabica* L.)

LAVRAS - MG

2012

CAROLINE LIMA ANGÉLICO

**APLICAÇÃO DO AGENTE BIOLÓGICO *Cladosporium cladosporioides*
(Fresen) de Vries “CLADOSPORIN” COMO BIOPROTETOR DA
QUALIDADE DO CAFÉ (*Coffea arabica* L.)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, área de concentração em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de Doutor.

Orientador

Prof. Dr. Carlos José Pimenta

Co-orientadora

Dra. Sára Maria Chalfoun

LAVRAS - MG

2012

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Angélico, Caroline Lima.

Aplicação do agente biológico *Cladosporium cladosporioides*
(Fresen) de Vries “Cladosporin” como bioprotetor da qualidade do café
(*Coffea arabica* L.) / Caroline Lima Angélico. – Lavras : UFLA, 2012.
321 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.

Orientador: Carlos José Pimenta.

Bibliografia.

1. Produto biológico. 2. Competição de micro-organismos. 3.
Composição química. 4. Qualidade. I. Universidade Federal de Lavras.
II. Título.

CDD – 663.937

CAROLINE LIMA ANGÉLICO

**APLICAÇÃO DO AGENTE BIOLÓGICO *Cladosporium cladosporioides*
(Fresen) de Vries “CLADOSPORIN” COMO BIOPROTETOR DA
QUALIDADE DO CAFÉ (*Coffea arabica* L.)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, área de concentração em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 27 de fevereiro de 2012

Prof. Dr. Luís Roberto Batista

DCA/UFLA

Dr. Marcelo Ribeiro Malta

EPAMIG

Prof.Dr. Rubens José Guimarães

DAG/UFLA

Prof. Dr. Carlos José Pimenta

Orientador

Dra. Sára Maria Chalfoun

Co-orientadora

LAVRAS - MG

2012

À Irmã Benigna

OFEREÇO.

Aos meus pais,
ao Rodrigo,
ao Fabricio, meu filho amado,

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, pela vida e disposição para enfrentar seus obstáculos e surpresas.

À Irmã Benigna, por estar sempre ao meu lado por meio de todas as graças alcançadas.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Ciência dos Alimentos, pela oportunidade de realização do curso de Doutorado.

Ao CNPq, por financiar meu curso de doutorado com o pagamento mensal e pontual da bolsa de estudos.

À minha mãe, Maria da Graça Teixeira Lima, por todo o apoio, amor e inspiração para a criação do meu filho.

Ao meu pai, José Eugênio Angélico pela atenção, ajuda e carinho diários.

Ao meu marido, Rodrigo Castilho Senna, agradeço a paciência, as brincadeiras, o amor, os questionamentos, o financiamento e principalmente o nosso filho.

Ao meu filho Fabricio, agradeço simplesmente pela sua existência! Mamãe o ama e comemora a conclusão deste trabalho redigido muitas vezes com você no colo!

À querida sobrinha Giulia, pelas alegrias obtidas por seus esforços e inteligência e também pelos momentos de descontração, trazendo-me sempre as “novidades” e ao Guilherme, por ser um amor de sobrinho e afilhado e um ótimo padrinho para o Fabricio.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Carlos José Pimenta, mais uma vez agradeço com todo o meu coração a atenção de sempre, a enorme paciência, a confiança e a liberdade para que eu realizasse minhas obrigações no meu

momento. Quero que saiba que, com um orientador do seu nível, são poucos que conseguem ter o prazer de trabalhar.

À pesquisadora, Dra. Sára Maria Chalfoun, o meu mais profundo agradecimento, não ha palavras para descrever o quanto é importante na minha vida pessoal e profissional. Um exemplo de pessoa guerreira, paciente, humana e justa com uma ética indiscutível e que mesmo passando por momentos difíceis, não perde a serenidade e a razão.

Ao Dr. Marcelo Cláudio Pereira, agradeço a fundamental ajuda durante toda a minha trajetória acadêmica e, principalmente, durante este estudo, desde a instalação e condução de todo o experimento. Sem você, meu amigo, seria praticamente impossível a realização deste trabalho. Obrigada por tudo mesmo!

Agradeço em especial à Fazenda Santa Helena, em Alfenas-MG, nas pessoas do Prof. Dr. Puggina e Dr. Célio Landi que acreditaram na seriedade do trabalho, disponibilizando as instalações, material e pessoal que foram indispensáveis na realização do experimento, além do engenheiro agrônomo Pedro Landi e dos técnicos Paulinho e Marcos Evandro. Agradeço muito ainda “as mulheres” responsáveis pela aplicação do produto e colheita dos frutos de café, principalmente a Cláudia, bem como o terreirista Manoelzinho que foi muito importante para a secagem dos cafês.

À pesquisadora Dra. Deila Magna agradeço pela amizade, carisma e apoio fundamental nas análises estatísticas.

Ao pesquisador da EPAMIG/URESMA Dr. Sílvio Júlio de Rezende Chagas, pela disponibilidade, pela valiosa amizade e pelo carinho de sempre.

Ao Dr. Marcelo Malta agradeço pela atenção, pelo apoio nas análises cromatográficas, além da disponibilidade em participar da banca com valiosas sugestões.

Agradeço ao professor Rubinho, pela gentileza de sempre e disponibilidade em participar da banca, contribuindo muito para a melhoria do meu trabalho.

Às estagiárias Tamara e Ana Cristina pelos momentos de descontração e grande colaboração na formulação do produto “Cladosporin”.

À secretária do DCA, Lucilene, pela paciência sendo muito atenciosa e gentil.

Ao pessoal do Laboratório Central de Análises do Departamento de Ciência dos Alimentos (DCA), agradeço muito pelo apoio indispensável na realização de análises químicas e físicas, além das aulas práticas, proporcionando não somente um ambiente agradável de trabalho como também um local para troca de experiências pessoais e ótimos momentos de descontração. À você Tina, meu mais sincero agradecimento por ser essa pessoa tão especial que oferece ajuda sem esperar nada em troca e, ao Sr. Miguel obrigada pela valiosa ajuda.

Ao Renato Leal agradeço pela boa vontade de sempre e pela valiosa contribuição por realizar as análises com o HPLC.

A Juliana Ribeiro, colega de doutorado, agradeço pela imensa ajuda ao assumir as aulas práticas em razão dos fortes enjoos da gravidez. Eca!

À Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG/URESM), agradeço pela oportunidade de realização das análises microbiológicas no Laboratório de Fitopatologia e análises químicas no Laboratório de Qualidade do Café Dr. Alcides Carvalho.

Agradeço os laboratoristas da EPAMIG/URESM Vicentina “Vicen”, pelo auxílio nas análises microbiológicas, pela amizade e cumplicidade e ao Samuel “Samuca” pela realização das análises químicas.

Aos pesquisadores da EPAMIG/URESM: Dr. Vicente Luiz, Dra. Lenira Santa Cecília e Dr. Júlio César pelo incentivo no decorrer do curso.

Ao Dr. Paulo Rebelles agradeço pelo apoio imprescindível ao colaborar prontamente e diversas vezes com o empréstimo do microscópio em seu

laboratório e ao amigos Marcinho e Marçal, agradeço o auxílio para captar e salvar as imagens.

À Helô, do Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Fitopatologia.

Aos amigos e indispensáveis colaboradores deste trabalho na época locados na EPAMIG/URESM: Pedro Paulo Rebelles, Daniel Nascimento e William pela grande ajuda, valiosa amizade e pelos vários momentos de boas gargalhadas junto a formulação do produto na Biofábrica, bem como na instalação e condução do experimento no campo.

À eficiente e carismática secretária da EPAMIG/URESM Claudinha agradeço pela paciência e sempre disponibilidade em me atender.

Aos amigos de curso Adriene Ribeiro, Joyce, Roseane Evangelista, Érika Rodrigues, Suzana Chitarra, Juliana Ribeiro, Larissa Ferreira, Vanderley e Sabrina agradeço pelo apoio e a amizade.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 3 - Agente biológico *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries no controle de micro-organismos associados ao café (*Coffea arabica* L.)

Tabela 1	Valores médios (%) dos diferentes estádios de maturação e colonização do <i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen) de Vries no momento da colheita do café antes e após a aplicação do “Cladosporin”. Ano Agrícola 2010/2011.....	112
Tabela 2	Valores médios (%) do índice de ocorrência de fungos associados a frutos de café antes e após a aplicação do “Cladosporin”. Ano Agrícola 2009/2010.....	120
Tabela 3	Valores médios (%) do índice de ocorrência de fungos associados a frutos de café antes e após a aplicação do “Cladosporin”. Ano Agrícola 2010/2011.....	122

CAPÍTULO 4 - Viabilidade do agente biológico bioprotetor da qualidade do café *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries no produto “Cladosporin” em diferentes temperaturas de armazenamento.....

Tabela 1	Crescimento micelial <i>in vitro</i> de <i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen) de Vries no produto “Cladosporin” em diferentes temperaturas de armazenamento. Lavras, MG, 2012.....	147
----------	---	-----

Tabela 2	Esporulação in vitro de <i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen) de Vries no produto “Cladosporin” em diferentes temperaturas de armazenamento. Lavras, MG, 2012.....	150
CAPÍTULO 5 - Avaliação física, química, físico-química e sensorial de cafés antes e após a aplicação do agente biológico <i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen) de Vries no produto “Cladosporin”.....		
Tabela 1	Valores de Condutividade Elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$) da fração boia e cereja + verde de cafés antes e após a aplicação do “Cladosporin”. Lavras, 2012.....	167
Tabela 2	Valores de Condutividade Elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$) da fração boia de cafés antes e após a aplicação do “Cladosporin”. Lavras, 2012.....	168
Tabela 3	Valores de Condutividade Elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$) da fração cereja + verde de cafés antes e após a aplicação do “Cladosporin”. Lavras, 2012.....	171
Tabela 4	Valores de Lixiviação de Potássio (ppm/g) da fração boia e cereja + verde em cafés antes e após a aplicação do “Cladosporin”. Lavras, 2012.....	174
Tabela 5	Valores de Lixiviação de Potássio (ppm/g) da fração boia em cafés antes e após a aplicação do “Cladosporin”. Lavras, 2012.....	175
Tabela 6	Valores de Lixiviação de Potássio (ppm/g) da fração cereja + verde de cafés antes e após a aplicação do “Cladosporin”. Lavras, 2012.....	177

Tabela 7	Valores de Atividade de PFO (u/min/g) da fração boia e cereja + verde de cafés antes e após a aplicação do “Cladosporin”. Lavras, 2012.....	181
Tabela 8	Valores de Atividade de PFO (u/min/g) da fração boia em cafés antes e após a aplicação do “Cladosporin”. Lavras, 2012.....	182
Tabela 9	Valores de Atividade de PFO (u/min/g) da fração cereja + verde em cafés antes e após a aplicação do “Cladosporin”. Lavras, 2012.....	185
Tabela10	Valores de Compostos Fenólicos Totais (%) da fração boia e cereja + verde de cafés antes e após a aplicação do “Cladosporin”. Lavras, 2012.....	188
Tabela 11	Valores de Compostos Fenólicos Totais (%) da fração boia em cafés antes e após a aplicação do “Cladosporin”. Lavras, 2012.....	189
Tabela 12	Valores de Compostos Fenólicos Totais (%) da fração cereja + verde em cafés antes e após a aplicação do “Cladosporin”. Lavras, 2012.....	192
Tabela 13	Valores de massa de 50 grãos (g) da fração boia e cereja + verde de cafés antes e após a aplicação do “Cladosporin”. Lavras, 2012.....	195
Tabela 14	Valores de Massa de 50 grãos (g) da fração boia em cafés antes e após a aplicação do “Cladosporin”. Lavras, 2012.....	196
Tabela 15	Valores de Massa de 50 grãos (g) da fração cereja + verde em cafés antes e após a aplicação do “Cladosporin”. Lavras, 2012.....	198

Tabela 16	Teores de Sólidos Solúveis (%) da fração boia e cereja + verde de cafés antes e após a aplicação do “Cladosporin”. Lavras, 2012.....	201
Tabela 17	Teores de Sólidos Solúveis (%) da fração boia em cafés antes e após a aplicação do “Cladosporin”. Lavras, 2012.....	202
Tabela 18	Teores de Sólidos Solúveis (%) da fração cereja + verde em cafés antes e após a aplicação do “Cladosporin”. Lavras, 2012.....	204
Tabela 19	Teores de Açúcares Totais (%) da fração boia e cereja + verde de cafés antes e após a aplicação do “Cladosporin”. Lavras, 2012.....	206
Tabela 20	Teores de Açúcares Totais (%) da fração boia em cafés antes e após a aplicação do “Cladosporin”. Lavras, 2012.....	207
Tabela 21	Teores de Açúcares Totais (%) da fração cereja + verde em cafés antes e após a aplicação do “Cladosporin”. Lavras, 2012.....	210
Tabela 22	Valores de Acidez Titulável Total (NaOH 0,1N/100g) da fração boia e cereja + verde de cafés antes e após a aplicação do “Cladosporin”. Lavras, 2012.....	214
Tabela 23	Valores de Acidez Titulável Total (NaOH 0,1N/100g) da fração boia em cafés antes e após a aplicação do “Cladosporin”. Lavras, 2012.....	215
Tabela 24	Valores de Acidez Titulável Total (NaOH 0,1N/100g) da fração cereja + verde em cafés antes e após a aplicação do “Cladosporin”. Lavras, 2012.....	217

Tabela 25	Perfil de Ácidos Orgânicos (%) da fração boia de cafés antes e após a aplicação do “Cladosporin” no ano agrícola 2009/2010. Lavras, 2012.....	219
Tabela 26	Perfil de Ácidos Orgânicos (%) da fração cereja + verde de cafés antes e após a aplicação do “Cladosporin” no ano agrícola 2009/2010. Lavras, 2012.....	220
Tabela 27	Teores de Cafeína (%) da fração boia em cafés antes e após a aplicação do “Cladosporin” no ano agrícola 2009/2010. Lavras, 2012.....	225
Tabela 28	Teores de Cafeína (%) da fração cereja + verde em cafés antes e após a aplicação do “Cladosporin” no ano agrícola 2009/2010. Lavras, 2012.....	227
Tabela 29	Teores de Cafeína (%) da fração boia e cereja + verde em cafés antes e após a aplicação do “Cladosporin” no ano agrícola 2009/2010. Lavras, 2012.....	228
Tabela 30	Teores de Trigonelina (%) da fração boia em cafés antes e após a aplicação do “Cladosporin” no ano agrícola 2009/2010. Lavras, 2012.....	229
Tabela 31	Teores de Trigonelina (%) da fração cereja + verde em cafés antes e após a aplicação do “Cladosporin” no ano agrícola 2009/2010. Lavras, 2012.....	231
Tabela 32	Teores de Trigonelina (%) da fração boia e cereja + verde em cafés antes e após a aplicação do “Cladosporin” no ano agrícola 2009/2010. Lavras, 2012.....	232

Tabela 33	Teores de Ácido clorogênico (5 ACQ) (%) da fração boia em cafés antes e após a aplicação do “Cladosporin” no ano agrícola 2009/2010. Lavras, 2012.....	233
Tabela 34	Teores de Ácido clorogênico (5 ACQ) (%) da fração cereja + verde em cafés antes e após a aplicação do “Cladosporin” no ano agrícola 2009/2010. Lavras, 2012.....	235
Tabela 35	Teores de Ácido clorogênico (5 ACQ) (%) da fração boia e cereja + verde em cafés antes e após a aplicação do “Cladosporin” no ano agrícola 2009/2010. Lavras, 2012.....	236
Tabela 36	Classificação pela prova de xícara em cafés da fração boia antes e após a aplicação do “Cladosporin” de acordo com o provador 1. Lavras – MG. Ano Agrícola 2008/2009.....	237
Tabela 37	Classificação pela prova de xícara em cafés da fração boia antes e após a aplicação do “Cladosporin” de acordo com o provador 2. Lavras – MG. Ano Agrícola 2008/2009.....	239
Tabela 38	Classificação pela prova de xícara em cafés da fração boia antes e após a aplicação do “Cladosporin” de acordo com o provador 3. Lavras – MG. Ano Agrícola 2008/2009.....	241
Tabela 39	Média geral da classificação pela prova de xícara na fração boia no ano 1. Lavras, 2012.....	243
Tabela 40	Classificação pela prova de xícara em cafés da fração boia antes e após a aplicação do “Cladosporin” de acordo com o provador 1. Lavras – MG. Ano Agrícola 2009/2010.....	245
Tabela 41	Classificação pela prova de xícara em cafés da fração boia antes e após a aplicação do “Cladosporin” de acordo com o provador 2. Lavras – MG. Ano Agrícola 2009/2010.....	247

Tabela 42	Classificação pela prova de xícara em cafés da fração boia antes e após a aplicação do “Cladosporin” de acordo com o provador 3. Lavras – MG. Ano Agrícola 2009/2010.....	249
Tabela 43	Média geral da classificação pela prova de xícara na fração boia no ano 2. Lavras, 2012.....	251
Tabela 44	Classificação pela prova de xícara em cafés da fração cereja + verde antes e após a aplicação do “Cladosporin” de acordo com o provador 1. Lavras – MG. Ano Agrícola 2008/2009.....	253
Tabela 45	Classificação pela prova de xícara em cafés da fração cereja + verde antes e após a aplicação do “Cladosporin” de acordo com o provador 2. Lavras – MG. Ano Agrícola 2008/2009.....	255
Tabela 46	Classificação pela prova de xícara em cafés da fração cereja + verde antes e após a aplicação do “Cladosporin” de acordo com o provador 3. Lavras – MG. Ano Agrícola 2008/2009.....	257
Tabela 47	Média geral da classificação pela prova de xícara na fração cereja + verde no ano 1. Lavras, 2012.....	258
Tabela 48	Classificação pela prova de xícara em cafés da fração cereja + verde antes e após a aplicação do “Cladosporin” de acordo com o provador 1. Lavras – MG. Ano Agrícola 2009/2010.....	260

Tabela 49	Classificação pela prova de xícara em cafés da fração cereja + verde antes e após a aplicação do “Cladosporin” de acordo com o provador 2. Lavras – MG. Ano Agrícola 2009/2010.....	262
Tabela 50	Classificação pela prova de xícara em cafés da fração cereja + verde antes e após a aplicação do “Cladosporin” de acordo com o provador 3. Lavras – MG. Ano Agrícola 2009/2010.....	264
Tabela 51	Média geral da classificação pela prova de xícara na fração cereja + verde no ano 2. Lavras, 2012.....	265
	ANEXOS.....	276

LISTA DE FIGURAS

	CAPÍTULO 2 - Competição <i>in vitro</i> entre <i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen) de Vries e fungos potencialmente toxigênicos.....	
Figura 1	Teste de germinação <i>in vitro</i> de <i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen) de Vries.....	77
Figura 2	Teste de germinação <i>in vitro</i> de <i>Aspergillus ochraceus</i> G. Wilh.....	80
Figura 3	Teste de germinação <i>in vitro</i> de <i>Aspergillus niger</i> Tiegh.....	82
Figura 4	Teste de germinação <i>in vitro</i> de <i>Fusarium verticillioides</i> (Saccardo) Nirenberg.....	84
Figura 5	Competição <i>in vitro</i> entre <i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen) de Vries e <i>Aspergillus ochraceus</i> G. Wilh.....	87
Figura 6	Competição <i>in vitro</i> entre <i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen) de Vries e <i>Aspergillus niger</i> Tiegh.....	89
Figura 7	Competição <i>in vitro</i> entre <i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen) de Vries e <i>Fusarium verticillioides</i> (Saccardo) Nirenberg.....	91
Figura 8	Hiperparasitismo <i>in vitro</i> entre <i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen) de Vries e <i>Aspergillus ochraceus</i> G. Wilh com 10 dias de competição.....	95
	CAPÍTULO 3 - Agente biológico <i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen) de Vries no controle de microorganismos associados ao café (<i>Coffea arabica</i> L.)	

Figura 1	Dados climáticos da área experimental referentes aos meses de janeiro a abril do ano 1. Alfenas, 2011.....	114
Figura 2	Dados climáticos da área experimental referentes aos meses de maio a agosto do ano 1. Alfenas, 2011.....	115
Figura 3	Dados climáticos da área experimental referentes aos meses de janeiro a abril do ano 2. Alfenas, 2011.....	116
Figura 4	Dados climáticos da área experimental referentes aos meses de maio a agosto do ano 2. Alfenas, 2011.....	117
	CAPÍTULO 4 - Viabilidade do agente biológico bioprotetor da qualidade do café <i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen) de Vries no produto “Cladosporin” em diferentes temperaturas de armazenamento.....	
Figura 1	Agente biológico <i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen) de Vries após 15 dias de desenvolvimento no substrato.....	144
Figura 2	Crescimento micelial <i>in vitro</i> de <i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen) de Vries no produto “Cladosporin” em diferentes temperaturas de armazenamento. Lavras, MG, 2012.....	148
Figura 3	Desenvolvimento <i>in vitro</i> de <i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen) de Vries no produto “Cladosporin”.....	149
	CAPÍTULO 5 - Avaliação física, química, físico-química e sensorial de cafés antes e após a aplicação do agente biológico <i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen) de Vries no produto “Cladosporin”.....	

Figura 1	Valores de Condutividade Elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$) em cafés da fração boia antes e após a aplicação do “Cladosporin”. Lavras, 2012.....	170
Figura 2	Valores de Condutividade Elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$) da fração cereja + verde em cafés antes e após a aplicação do “Cladosporin”. Lavras, 2012.....	172
Figura 3	Valores de Lixiviação de Potássio (ppm/g) em cafés da fração boia antes e após a aplicação do “Cladosporin”. Lavras, 2012.....	176
Figura 4	Valores de Lixiviação de Potássio (ppm/g) em cafés da fração cereja + verde antes e após a aplicação do “Cladosporin”. Lavras, 2012.....	179
Figura 5	Valores de Atividade de PFO (u/min/g) em cafés da fração boia antes e após a aplicação do “Cladosporin”. Lavras, 2012.....	184
Figura 6	Valores de Atividade de PFO (u/min/g) em cafés da fração cereja + verde antes e após a aplicação do “Cladosporin”. Lavras, 2012.....	187
Figura 7	Valores de Compostos Fenólicos Totais (%) em cafés da fração boia antes e após a aplicação do “Cladosporin”. Lavras, 2012.....	190
Figura 8	Valores de Compostos Fenólicos Totais (%) em cafés da fração cereja + verde antes e após a aplicação do “Cladosporin”. Lavras, 2012.....	194
Figura 9	Valores de Massa de 50 grãos (g) em cafés da fração boia antes e após a aplicação do “Cladosporin”. Lavras, 2012.....	197

Figura 10	Valores de Massa de 50 grãos (g) em cafés da fração cereja + verde antes e após a aplicação do “Cladosporin”. Lavras, 2012.....	199
Figura 11	Teores de Sólidos Solúveis (%) em cafés da fração cereja + verde antes e após a aplicação do “Cladosporin”. Lavras, 2012.....	205
Figura 12	Teores de Açúcares Totais (%) em cafés da fração boia antes e após a aplicação do “Cladosporin”. Lavras, 2012.....	209
Figura 13	Teores de Açúcares Totais (%) em cafés da fração cereja + verde antes e após a aplicação do “Cladosporin”. Lavras, 2012.....	212
Figura 14	Valores de Acidez Titulável Total (NaOH 0,1N/100g) em cafés da fração boia antes e após a aplicação do “Cladosporin”. Lavras, 2012.....	216
Figura 15	Picos dos compostos bioativos Cafeína, Trigonelina e Ácido Clorogênico (5ACQ) em cafés antes e após a aplicação do “Cladosporin” no ano agrícola 2009/2010. Lavras, 2012.....	223
Figura 16	Teores de Cafeína (%) em cafés da fração boia antes e após a aplicação do “Cladosporin” no ano agrícola 2009/2010. Lavras, 2012.....	226
Figura 17	Teores de Cafeína (%) em cafés da fração cereja + verde antes e após a aplicação do “Cladosporin” no ano agrícola 2009/2010. Lavras, 2012.....	227
Figura 18	Teores de Trigonelina (%) em cafés da fração boia antes e após a aplicação do “Cladosporin” no ano agrícola 2009/2010. Lavras, 2012.....	230

Figura 19	Teores de Trigonelina (%) em cafés da fração cereja + verde antes e após a aplicação do “Cladosporin” no ano agrícola 2009/2010. Lavras, 2012.....	232
Figura 20	Teores de Ácido clorogênico (5 ACQ) (%) em cafés da fração boia antes e após a aplicação do “Cladosporin” no ano agrícola 2009/2010. Lavras, 2012.....	234
Figura 21	Teores de Ácido clorogênico (5 ACQ) (%) em cafés da fração cereja + verde antes e após a aplicação do “Cladosporin” no ano agrícola 2009/2010. Lavras, 2012.....	235

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1.....	24
1	INTRODUÇÃO GERAL.....	25
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	28
2.1	Qualidade do café	28
2.1.2	Qualidade do café associada a micro-organismos.....	29
2.2	Utilização de agentes de biocontrole.....	31
2.3	<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen) de Vries como agente bioprotetor da qualidade do café.....	35
2.4	Parâmetros físicos, químicos, físico-químicos e classificação por tipo e pela bebida (prova de xícara) associados à qualidade do café.....	38
2.4.1	Massa de 50 grãos.....	38
2.4.2	Condutividade elétrica e lixiviação de potássio.....	38
2.4.3	Sólidos Solúveis.....	40
2.4.4	Açúcares totais.....	41
2.4.5	Acidez titulável total.....	42
2.4.6	Polifenoxidase (PFO).....	42
2.4.7	Compostos bioativos em café.....	43
2.4.7.1	Compostos fenólicos totais.....	45
2.4.7.2	Ácidos Clorogênicos.....	46
2.4.7.3	Cafeína.....	48
2.4.7.4	Trigonelina.....	48
2.5	Classificação do café.....	50
	REFERÊNCIAS.....	52

	CAPÍTULO 2 - Competição <i>in vitro</i> entre <i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen) de Vries e fungos potencialmente toxigênicos.....	64
1	INTRODUÇÃO.....	67
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	69
2.1	Plaqueamento dos frutos.....	69
2.2	Identificação dos gêneros <i>Cladosporium</i> , <i>Aspergillus</i> e <i>Fusarium</i>	70
2.2.1	Identificação do isolado do gênero <i>Cladosporium</i>	70
2.2.2	Identificação dos isolados do gênero <i>Aspergillus</i>	70
2.2.3	Identificação do isolado do gênero <i>Fusarium</i>	71
2.3	Competição entre os fungos.....	71
2.3.1	Teste <i>in vitro</i> para determinação do início da germinação dos esporos fúngicos.....	71
2.3.2	Competição <i>in vitro</i> entre o gênero <i>Cladosporium</i> e os outros fungos.....	72
2.4	Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	73
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	74
3.1	Identificação das espécies fúngicas isoladas.....	74
3.1.1	Gênero <i>Cladosporium</i>	74
3.1.2	Gênero <i>Aspergillus</i> da <i>Seção Circumdati</i>	74
3.1.3	Gênero <i>Aspergillus</i> da <i>Seção Nigri</i>	75
3.1.4	Gênero <i>Fusarium</i>	75
3.2	Teste <i>in vitro</i> para determinação do tempo de início da germinação dos esporos fúngicos de cada espécie isoladamente.....	76

3.2.1	<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen) de Vries.....	77
3.2.2	<i>Aspergillus ochraceus</i> G. Wilh.....	79
3.2.3	<i>Aspergillus niger</i> Tiegh.....	81
3.2.4	<i>Fusarium verticillioides</i> (Saccardo) Nirenberg.....	83
3.3	Competição <i>in vitro</i> entre o gênero <i>Cladosporium</i> e os outros fungos	86
3.3.1	Competição <i>in vitro</i> entre <i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen) de Vries e <i>Aspergillus ochraceus</i> G. Wilh.....	86
3.3.2	Competição <i>in vitro</i> entre <i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen) de Vries e <i>Aspergillus niger</i> Tiegh.....	88
3.3.3	Competição <i>in vitro</i> entre <i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen) de Vries e <i>Fusarium verticillioides</i> (Saccardo) Nirenberg.....	90
3.4	Hiperparasitismo entre <i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen) de Vries e <i>Aspergillus ochraceus</i> G. Wilh.....	94
4	CONCLUSÕES.....	96
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	97
	REFERÊNCIAS.....	98
	CAPÍTULO 3 - Agente biológico <i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen) de Vries no controle de microorganismos associados ao café (<i>Coffea arabica</i> L.)	102
1	INTRODUÇÃO.....	105
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	107
2.1	Localização do ensaio e metodologia de coleta das amostras.....	107

2.2	Estádio de maturação dos frutos e porcentagem de colonização de <i>C. cladosporioides</i> (Fresen) de Vries após a aplicação do “Cladosporin” nos diferentes tratamentos....	109
2.3	Plaqueamento dos frutos.....	109
2.4	Índice de ocorrência (IO):.....	110
2.5	Análise Estatística.....	111
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	112
3.1	Estádio de maturação dos frutos e porcentagem de colonização de <i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen) de Vries após a aplicação do “Cladosporin” nos diferentes tratamentos.....	112
3.2	Plaqueamento dos frutos.....	119
3.1.1	<i>Fusarium sp.</i>	123
3.1.2	Fungos toxigênicos do gênero <i>Penicillium</i> e Seções <i>Circumdati</i> e <i>Nigri</i>	126
3.1.3	Leveduras.....	128
3.1.4	<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen) de Vries.....	130
3.2	Sucessão de micro-organismos.....	132
4	CONCLUSÕES.....	133
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	135
	REFERÊNCIAS.....	136
	CAPÍTULO 4 - Viabilidade do agente biológico bioprotetor da qualidade do café <i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen) de Vries no produto “Cladosporin” em diferentes temperaturas de armazenamento.....	138

1	INTRODUÇÃO.....	141
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	143
2.1	Obtenção, multiplicação e utilização do agente biológico <i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen) de Vries.....	143
2.2	Avaliação da viabilidade do agente biológico <i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen) de Vries no produto “Cladosporin”.....	144
2.3	Análise Estatística.....	145
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	146
3.1	Avaliação do crescimento micelial e esporulação do agente biológico <i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen) de Vries no produto “Cladosporin” em diferentes temperaturas de armazenamento.....	146
4	CONCLUSÕES.....	154
	REFERÊNCIAS.....	155
	CAPÍTULO 5 - Avaliação física, química, físico-química e sensorial de cafés antes e após a aplicação do agente biológico <i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen) de Vries no produto “Cladosporin”.....	156
1	INTRODUÇÃO.....	159
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	161
2.1	Localização do ensaio e descrição dos tratamentos.....	161
2.2	Metodologia utilizada nas análises físicas, químicas, físico-químicas e classificação pela bebida (prova de xícara).....	163
2.2.1	Condutividade Elétrica.....	163

2.2.2	Lixiviação de Potássio.....	163
2.2.3	Atividade da Polifenoloxidase.....	164
2.2.4	Compostos fenólicos totais.....	164
2.2.5	Massa de 50 grãos.....	164
2.2.6	Sólidos solúveis totais	164
2.2.7	Açúcares totais.....	164
2.2.8	Acidez titulável total.....	164
2.2.9	Perfil de ácidos orgânicos.....	164
2.2.10	Compostos Bioativos: Cafeína, Trigonelina e Ácido Clorogênico 5 ACQ).....	165
2.2.11	Classificação pela bebida (Prova de xícara).....	166
2.2.12	Análise estatística.....	166
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	167
3.1	Condutividade Elétrica.....	167
3.2	Lixiviação de Potássio.....	174
3.3	Atividade da Polifenoloxidase (PFO).....	181
3.4	Compostos Fenólicos Totais.....	188
3.5	Massa de 50 grãos.....	195
3.6	Sólidos Solúveis.....	201
3.7	Açúcares Totais.....	206
3.8	Acidez Titulável Total.....	214
3.9	Perfil de Ácidos Orgânicos.....	219
3.10	Compostos Bioativos (Cafeína, Trigonelina, Ácido Clorogênico).....	223
3.10.1	Cafeína.....	223
3.10.2	Trigonelina.....	229

3.10.3	Ácido Clorogênico.....	233
3.11	Classificação pela prova de xícara.....	237
3.11.1	Fração Boia – Ano 1.....	237
3.11.2	Fração Boia – Ano 2.....	245
3.11.3	Fração Cereja + Verde – Ano 1.....	353
3.11.4	Fração Cereja + Verde – Ano 2.....	260
4	CONCLUSÕES.....	267
	REFERÊNCIAS.....	269

RESUMO GERAL

O produto à base do agente bioprotetor da qualidade do café *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries é uma alternativa promissora para a aplicação nos frutos de café ainda na lavoura, por se tratar de um produto biológico contendo um micro-organismo com características GRAS (General Regarded as Safe) e com reconhecida ação deletéria sobre fungos prejudiciais à qualidade do produto final. A aplicação do produto nos frutos poderia promover a manutenção ou a melhoria da qualidade de cafés com histórico de problemas de bebida, principalmente em regiões com alta umidade relativa do ar. O produto “Cladosporin” foi aplicado em diferentes doses e épocas em frutos de café da cultivar Catuaí Amarelo IAC 62, com 3 anos de idade, durante dois anos consecutivos em uma lavoura da Fazenda Santa Helena, no município de Alfenas – MG, localizada às margens da represa de Furnas. Os testes de viabilidade apontaram que refrigeração e congelamento foram as melhores temperaturas para a manutenção do fungo; apenas uma aplicação, num intervalo de 60 dias antes da colheita na menor dose testada, é suficiente para que ocorra uma colonização de *Cladosporium* nos frutos e diminua, consideravelmente, a incidência de fungos potencialmente toxigênicos; *Cladosporium* inibiu a germinação dos fungos potencialmente toxigênicos por período superior a 20 dias e hiperparasitou o conídio de *Aspergillus ochraceus* G. Wilh, alterando sua estrutura e textura; os parâmetros condutividade elétrica, lixiviação de potássio, sólidos solúveis totais, açúcares totais e atividade da polifenoloxidase se apresentaram como importantes marcadores de qualidade. Conclui-se que a aplicação do “Cladosporin” promoveu melhoria da qualidade nos cafés com resultados mais significativos para a fração boia.

Palavras-chave: café, produto biológico, competição de micro-organismos, composição química, qualidade.

GENERAL ABSTRACT

The biological agent *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries product is a promising alternative for the application in coffee fruits because it is a product containing a biological organism with characteristics GRAS (General Regarded as Safe) and with recognized deleterious action about fungi that are deleterious to the final product quality. The application of a product in coffee fruits could promote the maintenance or improvement the coffee quality with beverage problems, particularly in regions with high relative humidity. The product “Cladosporin” was applied in different doses and times in coffee fruits Catuaí Yellow IAC 62 with 3 years for two consecutive years in a plantation of Santa Helena Farm in Alfenas - MG, located at margins of lake. The viability test showed that refrigerator and freezer temperatures were the best for maintaining the viability of the fungus for; only one application, within 60 days before fruit harvest, using the lowest dosis tested, is enough to better colonization of *Cladosporium* in coffee fruits and considerably decrease the incidence of potentially toxigenic fungi; *Cladosporium* promoted inhibition of spore germination of fungi potencial toxigenic for more than 20 days and by addition to antibiosis was able to hiperparasitism the conidia of *Aspergillus ochraceus* G. Wilh, changing its structure and texture; The results showed that electrical conductivity, leaching of potassium, soluble solids, total sugars and polifenoxidasis activity how importants quality markers. Through the obtained results it was concluded that the application of “Cladosporin” promoted improvement of quality coffee with more significant results for the fraction “boia” (overripe berries dried on tree).

Key words: coffee, biological product, microorganisms competition, chemical composition, quality.

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO GERAL

O café é produzido no Brasil desde a época imperial. Durante toda a sua história tem-se demandado grande quantidade de mão de obra, sendo, portanto, importante fonte de renda para a economia do país, participando de forma significativa na formação de capital no setor agrícola brasileiro, sendo uma importante commodity.

Pesquisas apontam que 9 em cada 10 brasileiros acima de 15 anos consomem café diariamente, o que o faz ser a segunda bebida com maior penetração na população, atrás apenas da água e à frente dos refrigerantes e do leite (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DO CAFÉ - ABIC, 2011) e, ainda, atribui o crescimento do consumo a um conjunto de fatores dentre os quais estão a melhoria contínua da qualidade do café oferecido aos consumidores, com base no Selo de Pureza e no PQC – Programa de Qualidade do Café, lançado pela ABIC em final de 2004; o Círculo do Café de Qualidade – CCQ, com o qual a ABIC deseja estimular o consumo de café fora do lar, sempre com melhor qualidade; a consolidação do mercado de cafés tipo Gourmet ou Especiais; a melhora muito significativa da percepção do café quanto aos aspectos dos benefícios do café para a saúde; a melhora das condições econômicas no Brasil, com aumento do consumo e do poder de compra da população e os investimentos em publicidade e promoção.

O preço do café é em função da sua qualidade, principalmente pelos países importadores bastante exigentes em qualidade. Dessa forma, a receita nacional em razão das exportações de cafés poderia aumentar não somente em função da produtividade, mas também em decorrência da melhoria da qualidade. O aumento da concorrência na produção nacional, além da maior exigência quanto à qualidade da bebida pelo mercado interno, também são fatores a serem

considerados como importantes impulsionadores na produção de bebidas com qualidade superior.

Um dos principais fatores que afetam a qualidade do café é a ocorrência de micro-organismos causadores de prejuízos à bebida por meio da promoção de processos fermentativos indesejáveis que podem ocorrer ainda na planta, iniciando-se a partir do processo de maturação dos frutos, além do possível comprometimento da segurança do produto final.

A associação do controle das doenças à preservação de agentes antagonistas de fungos deletérios à qualidade do café, além dos aspectos de segurança ambiental e do trabalhador é uma preocupação crescente na cadeia produtiva do café. Alternativas quanto ao manejo adequado dos frutos nas fases pré e pós-colheita, bem como a introdução de um agente biológico com características de um organismo GRAS (Generally Regarded as Safe) seriam soluções para garantir a sustentabilidade quanto à segurança, proteção ambiental e aprimoramento da qualidade do produto café.

Diante do exposto, o fungo do gênero *Cladosporium*, gênero esse considerado como GRAS (Generally Regarded as Safe) tem sido pesquisado e constatado como um agente biológico promissor em relação a outros micro-organismos no sentido de preservar a qualidade do café.

A formulação de um produto a base do agente biológico *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries e sua aplicação nas lavouras pode promover a manutenção ou a melhoria da qualidade de cafés com histórico de problemas de bebida, principalmente em regiões com alta umidade relativa do ar, o que favorece uma maior ocorrência de micro-organismos deletérios à qualidade. A aplicação promoveria o aumento do inóculo na área, favorecendo o seu

desenvolvimento e formando uma “cobertura” protetora nos frutos, preservando assim a qualidade da bebida.

Assim, conduziu-se este estudo, com o objetivo de aumentar o inóculo de *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries em uma lavoura de café implantada às margens de represa com histórico de comprometimento de qualidade da bebida, por meio da aplicação na pré-colheita de um produto à base do agente biológico (“Cladosporin”) em diferentes concentrações e épocas, além de avaliar o efeito dessa aplicação sobre a incidência de micro-organismos deletérios à qualidade e sobre a preservação ou melhoria da bebida.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Qualidade do café

A qualidade da bebida do café está intimamente relacionada ao sabor e aroma, promovendo grande satisfação aos consumidores que a degustam. É obtida comercialmente pelas características físicas dos grãos e organolépticas da bebida (PASIN; ALMEIDA; ABREU, 2009).

A definição da qualidade do café como bebida é bastante ampla, sendo dependente da composição química dos grãos, determinada por fatores genéticos, ambientais e culturais; métodos de colheita, processamento e armazenamento; torração e preparo da bebida. A torração e o preparo da bebida influenciam na modificação da constituição química dos grãos sendo essas alterações, dependentes da composição original dos mesmos (PEREIRA, 1997).

Visando à obtenção de café com qualidade superior, os cuidados com a colheita e o manejo pós-colheita tornaram-se fundamentais na comercialização e no aumento do lucro do cafeicultor (FAVARIN et al., 2004). Por isso, Cortez (2001) afirma que é indispensável que o café colhido seja preparado e submetido em seguida à secagem para evitar o desenvolvimento de processos fermentativos e prejuízos à qualidade da bebida.

A qualidade do café está diretamente relacionada aos diversos constituintes físicos, físico-químicos e químicos que são responsáveis pela aparência do grão torrado e sabor e aroma da bebida. Por isso, para a avaliação da qualidade da bebida têm sido sugerida a avaliação de parâmetros considerados eficientes marcadores de qualidade como sólidos solúveis (SANTOS; CHALFOUN; PIMENTA, 2009), teor de açúcares totais (MENDONÇA et al., 2007), condutividade elétrica e lixiviação de potássio

(MALTA; PEREIRA; CHAGAS, 2007), acidez titulável total (PIMENTA et al., 2008b) e atividade da polifenoloxidase (MAZZAFERA; GONÇALVES; SHIMIZU, 2002), além da classificação oficial pela bebida (prova de xícara), segundo a Resolução CNNPA nº12 de 1978, e a classificação por tipo, que obedece a Tabela Oficial para Classificação, de acordo com as impurezas e os defeitos encontrados em 300g de café (BRASIL, 2003).

2.1.3 Qualidade do café associada a micro-organismos

Sob o aspecto da qualidade, é fundamental o manejo adequado na pós-colheita, em particular, o tempo de exposição aos micro-organismos, os quais iniciam a infecção na planta e persistem após a colheita, até mesmo em parte do período de secagem (FAVARIN et al., 2004), desenvolvendo-se nos grãos de café, podendo comprometer tanto o seu aspecto visual quanto o gosto e o aroma.

Dentre os micro-organismos que incidem sobre os frutos de café, encontram-se os fungos filamentosos associados a processos fermentativos que ocorrem durante as fases de desenvolvimento dos frutos até a fase pós-colheita, muitas vezes prejudicando a composição final do grão. Os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* são os mais frequentemente associados com micotoxinas que ocorrem naturalmente em cereais, grãos e sementes em níveis que tornam os alimentos impróprios para consumo (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION - APHA, 2001).

No caso do café, em todas as etapas do processamento, bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, leveduras e fungos filamentosos estão presentes em altos níveis (SILVA et al., 2000). São encontrados com maior frequência

Cladosporium, *Fusarium*, *Penicillium* e *Aspergillus*, entre outros, dependendo do local de cultivo (SILVA; BATISTA; SCHWAN, 2008).

As condições climáticas e a microbiota predominantes são consideradas alguns dos fatores responsáveis pela melhor ou pior qualidade do café (CHALFOUN, 1996).

Pesquisas indicam que a qualidade do café encontra-se relacionada não somente à quantidade de fungos presentes, sendo dependentes, também, gênero e espécie de fungo, da interação entre eles e de condições favoráveis para o seu crescimento, sua disseminação e produção de metabólitos (PEREIRA; BORÉM; VILELA, 2001).

Os frutos expostos a altas umidades e temperaturas nas fases finais da maturação tendem a sofrer fermentação butírica e propiônica pelos micro-organismos sendo a principal causa da formação dos gostos estranhos no café, dando origem às bebidas do tipo rio e riada (CORTEZ, 1994), pois a alta umidade relativa do ar e a alta temperatura podem acelerar a senescência dos frutos, propiciando infecção e crescimento de micro-organismos, comprometendo a qualidade da bebida do café (PEREIRA; BORÉM; VILELA, 2001).

A literatura relata que a predominância de cafés de bebida inferior em determinadas regiões é parcialmente justificada pela ocorrência de condições ambientais favoráveis à incidência de deteriorações microbianas, nas fases pré e/ou pós-colheita (ALVES, 1996; CARVALHO; CHAGAS; SOUZA, 1997).

Condições climáticas em regiões de clima quente e/ou úmido, no período de colheita (como na proximidade das represas), a duração da maturação é menor, com os frutos passando rapidamente do estágio cereja para passa e as duas fases iniciais de fermentação dos frutos (fases acética e láctica) podem

evoluir para as duas fases seguintes (fases propiônica e butírica) que são prejudiciais à bebida com o surgimento do gosto “rio”. Nesse caso, o processamento não consegue reverter o prejuízo conferido à bebida (CORTEZ, 1993). Ainda segundo o autor, os plantios realizados próximos à represa de Furnas sofrem influência da umidade originária da grande massa de água, o que acelera a maturação e facilita um processo de desenvolvimento microbiano, resultando, quase sempre, em uma depreciação da qualidade de bebida, que é decorrente da presença e níveis de vários constituintes químicos voláteis e não-voláteis que podem ser alterados em decorrência das fermentações.

Apesar da incidência de micro-organismos durante todas as etapas do processamento do café ser muitas vezes prejudicial à bebida, a influência benéfica de micro-organismos na qualidade do café é estudada por meio de pesquisas com o fungo do gênero *Cladosporium*, considerado um importante agente biológico para a cultura e que está associado a bebidas de boa qualidade (CARVALHO; CHALFOUN, 1985; CARVALHO; CHALFOUN; CHAGAS, 1989; CHALFOUN, 2010; CHALFOUN et al., 2007; MEIRELLES, 1990; PEREIRA; PFENNING; CASTRO, 2005).

2.2 Utilização de agentes de biocontrole

Para a prática de uma agricultura sustentável, há necessidade de se diminuir o uso de pesticidas sintéticos, e uma alternativa promissora é o uso de produtos de origem biológica (FARIA; CASSETARI NETO; ALBUQUERQUE, 2002), que, atualmente, encontram-se disponíveis no mercado, os quais surgiram no intuito de reduzir a utilização de pesticidas

sintéticos, os riscos aos operadores e os possíveis prejuízos ao meio ambiente (HENNING et al., 2009).

Estudos já apontam para os problemas que o uso excessivo e incorreto de fungicidas podem ocasionar tanto para a saúde humana quanto para o meio ambiente (BRAND et al., 2009), por isso, diversos estudos apontam para a aplicação de agentes biológicos sobre fitopatógenos como uma alternativa promissora para a agricultura.

A definição tradicional para controle biológico é considerá-lo como o controle de um micro-organismo por outro micro-organismo (BETTIOL, 1991).

Os antagonistas são agentes biológicos dotados de um potencial capaz de interferir nos processos vitais do patógeno, exterminando-o. Do ponto de vista agrícola, o controle biológico recebe dois tipos de enfoque: controle biológico natural, onde se envolvem ações combinadas (fatores bióticos e abióticos), atuando na preservação e no aumento da população antagonista e controle biológico clássico, que implica na introdução de uma biomassa de um antagonista, obtida em meio de cultura ou substrato adequado, na área de influência do hospedeiro (BUENO, 2006).

O controle biológico tem demonstrado ser uma opção promissora para a diminuição na utilização de agroquímicos e apresenta um potencial comprovado no controle de pragas e doenças. De acordo com Junqueira e Gasparotto (1991), o controle biológico de doenças de plantas é altamente desejável mesmo se associado a outros métodos de controle.

O sucesso do controle biológico depende das propriedades antagonísticas e dos mecanismos de ação do hiperparasita (BETTIOL, 1991). Ainda segundo o autor, os mecanismos das interações antagonistas entre micro-

organismos patogênicos e antagonistas com a planta podem ser divididos em antibiose, competição, parasitismo, predação e indução de defesa do hospedeiro.

Um micro-organismo pode interagir com outros, criando condições desfavoráveis ao desenvolvimento destes, sendo essa forma de interação denominada de antagonismo (BETTIOL, 1991).

Na antibiose ocorre a interação entre organismos, onde um metabólito produzido por um deles tem um efeito prejudicial sobre o outro. Grande parte dos micro-organismos envolvidos em controle biológico atua por meio de antibiose (BETTIOL; GHINI, 1995).

Já, o parasitismo é uma relação antagônica onde um organismo (parasita) vive sobre ou dentro de outro organismo vivo (hospedeiro), obtendo seu alimento deste último, sendo que esta é uma relação muito comum entre os fungos. Podem atuar através de um mecanismo ou por meio da associação de mecanismos como parasitismo, antibiose e competição (BETTIOL; GHINI, 1995).

A maioria dos relatos sobre o uso de antagonistas para o controle de doenças induzidas por fungos fitopatogênicos apresenta *Trichoderma* spp. como um dos mais promissores entre os agentes de biocontrole (SILVA; ROSA; MELO, 1999).

Lima et al. (2007) constataram que a imersão de bulbilhos de alho em suspensão de esporos de *Trichoderma asperellum* pode ser usada isolada ou associada a fungicidas, melhorando o stand de plantas.

Bettiol (1988), em trabalho de seleção de micro-organismo antagônico a *Pyricularia oryzae*, verificou que *B.subtilis* foi o mais eficiente em inibir o crescimento micelial do patógeno e, constatando também, que o antagonista apresenta boas características para uso como agente de controle biológico, pois,

além de rápido desenvolvimento, tanto em meio de cultura como na natureza, produzem endósporo e antibióticos, crescem em larga faixa de temperatura e adaptam-se a várias condições ambientais.

Bettiol (1988) ainda demonstrou a atividade antagônica de *B. subtilis* a *P. oryza* de arroz por meio de sua aplicação em sementes e parte aérea, considerando bastante promissor o seu emprego e/ou de seus metabólitos para o controle da brusone do arroz.

No Rio Grande do Norte, as doenças do coqueiro, denominadas lixa-grande e lixa-pequena, causadas, respectivamente, pelos fungos *Sphaerodothis acrocomiae* (Montagne) Von Arx & Muller e *Phyllachora torrendiella* (Batista) Subileau são importantes por provocarem a seca prematura das folhas inferiores e, como consequência, os cachos ficam sem apoio, quebrando-se, e os frutos caem antes do ponto de colheita. Para essas doenças, não existe recomendação de controle químico; no entanto, o controle biológico pelo emprego dos fungos *Septofusidium elegantulum* e *Acremonium* spp. tem sido realizado com sucesso (MADEIRA et al., 1998).

Luz (2003), utilizando doses reduzidas de fungicidas associados a agentes bioprotetores, observou que mesmo quando as doses do bioprotetor e do fungicida associados foram reduzidas à metade, o nível de controle dos patógenos de trigo foi superior ao nível de controle do bioprotetor e do fungicida isoladamente, com as doses normais. O autor afirma que uma vantagem da interação de um fungicida com um antagonista parece ser o controle inicial de patógenos pelo fungicida e a habilidade do antagonista de desenvolver e persistir nas raízes, reduzindo a infecção dos patógenos, mais tarde, no desenvolvimento de plantas e atrasar o desenvolvimento de resistência dos patógenos ao fungicida.

2.3 *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries como agente bioprotetor da qualidade do café

Estudos com o gênero *Cladosporium* concluem ser esse micro-organismo bastante promissor com relação a sua utilização como agente biológico em diversas culturas como ferrugem do pinus na Europa (MORICCA et al., 2001) e ferrugem do feijão (NASINI et al., 2004).

Foi identificado por meio de pesquisas um metabólito produzido por ele, denominado de Cladosporol e atribuído a esse metabólito atividade inibitória na germinação de esporos de *Uromyces appendiculatus*, fungo causador da ferrugem em feijão e também inibição na germinação de esporos de *Cronartium flaccidum* e *Peridermium pini*, principais espécies causadoras de ferrugem em pinus (NASINI et al., 2004).

O gênero *Cladosporium sp.* possui 735 espécies válidas na literatura, apresentando 73 variedades e 40 formaes especiais (INDEX FUNGORUM, 2010). No Brasil, são conhecidas 26 espécies (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA, 2010).

Uma espécie marinha de *Cladosporium sp.* é capaz de produzir um antibiótico para a inibição de *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* e *Candida albicans* (GALLO; SELDS; CABRERA, 2004). Insetos vêm desenvolvendo resistência a inseticidas químicos, assim, estudos com *Cladosporium herbarum* têm demonstrado que é uma espécie efetiva no controle de moscas brancas que atacam diversas lavouras (ABDEL-BAKY; ABDEL-SALAM, 2001).

No caso do café, vários relatos comprovam que *Cladosporium sp.* está associado à bebida de boa qualidade (PEREIRA; GALVÃO; KOBAYASHI,

2005). Possivelmente, o cladosporol seja o metabólito responsável por seu efeito bioprotetor contra os fungos produtores de fermentações indesejáveis nos frutos.

Chalfoun et al. (2007) identificaram a espécie *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries como o agente bioprotetor da qualidade do café. Como principais características para a identificação, eles observaram que os isolados apresentavam conidióforos sem nódulos, conídios asseptados ou com apenas um septo, possuindo formato elipsoidal ou formato semelhante a limão.

O primeiro relato de *Cladosporium sp.* em frutos de café foi realizado por Bitancourt (1957, citado por PEREIRA, 2002), que observou o referido fungo, em condições de campo, em frutos secos nas plantas.

Alves (1996), estudando a dinâmica da população de fungos associados aos grãos de café, observou a presença de *Cladosporium sp.* nas fases verde-cana, cereja, passa, seco na planta, grãos no chão e no café beneficiado, apresentando aumento na incidência da fase de cereja para passa e seco na planta, verificando associação de *Cladosporium sp.* a cafés de boa qualidade.

Martins, Silveira e Silva (2001) relatam que a alta ocorrência de *Cladosporium* em amostras sem desinfecção prévia demonstra como característica desse fungo ser colonizador das partes externas de frutos e grãos de café. Segundo os autores, o crescimento externo desse fungo funciona como uma barreira à entrada de outros fungos prejudiciais à qualidade, sendo, portanto, referência à associação de *C. cladosporioides* a cafés de boa qualidade de bebida, justificando sua maior ocorrência em frutos secos. Silva, Batista e Schwan., 2008, também observaram maior ocorrência de frutos colonizados por *Cladosporium cladosporioides* a partir do estágio de maturação cereja.

O conhecimento da dinâmica da população do fungo em relação ao estágio de maturação do fruto pode resultar na proposição de práticas de manejo

que favoreçam a melhoria da qualidade e a segurança do produto (PEREIRA, 2002).

A dinâmica da colonização do *Cladosporium cladosporioides* é típica de fungo saprófita, ocorrendo externamente no fruto durante todas as fases do seu desenvolvimento. Inicialmente, entre outubro e março, com os frutos de verde a verde-cana, essa colonização é menos intensa, não excedendo 25% dos frutos. De abril em diante, os fungos prejudiciais a qualidade são facilmente encontrados na comunidade externa dos grãos. O aumento gradual da população fúngica coincide com a conversão de compostos fenólicos em açúcares. Por isso, a aplicação do fungo como agente bioprotetor contra os fungos prejudiciais a qualidade do café deve se iniciar a partir da maturação dos frutos (CHALFOUN, 2010). Ainda segundo a autora, a atividade bioprotetora do *Cladosporium cladosporioides* ocorre no substrato, não afetando o grão após a secagem. O fungo desaparece sem que ocorra qualquer problema relacionado a segurança do produto final.

Por ser um fungo benéfico à qualidade do café e ainda em razão da sua ocorrência se proceder juntamente com a época de aplicação dos fungicidas Chalfoun et al. (2007) destacam a importância da utilização de fungicidas seletivos, visando à preservação desse micro-organismo.

2.4 Parâmetros físicos, químicos, físico-químicos e classificação por tipo e pela bebida (prova de xícara) associados à qualidade do café

2.4.1. Massa de 50 grãos

O rendimento é uma característica importante que compõe a economicidade do cafeeiro, influenciando o custo final de produção, uma vez que afeta os gastos com colheita, secagem, manuseio, estocagem, infraestrutura de armazenamento, beneficiamento e outras operações. Tanto fatores ambientais (teor de umidade, estádios de maturação, posição dos ramos em relação aos pontos cardeais, altura dos ramos na planta, posição dos frutos nos ramos, localização no lote experimental, lotes, altitudes, diversas regiões edafoclimáticas) como genéticos (cultivares, seleções, variedades botânicas, mutantes de *C. arabica*, introduções e seleções de *C. canephora* e espécies de *Coffea*) teoricamente, poderiam influenciar essa característica (PEZZOPANE, 2003). Por isso, segundo Pimenta (2001), a massa de grãos é importante por ser um dos indicativos de rendimento e, até mesmo, de qualidade do produto final. O mesmo autor encontrou maiores valores em cafés nos estádios de maturação cereja em relação aos demais.

2.4.2 Condutividade elétrica e lixiviação de potássio

Os testes de condutividade elétrica e lixiviação de potássio vêm sendo constantemente utilizados como eficientes indicadores da integridade das membranas celulares (PIMENTA, 2001; REINATO et al., 2003) por apresentarem maior sensibilidade na detecção de degradações ocorridas nas

membranas dos grãos de café, em decorrência de manejos inadequados nas fases de pré e pós-colheita.

O principal íon lixiviado, que influencia na medida da condutividade elétrica, tem sido reportado como o íon potássio, presente na membrana do grão de café (CHAGAS; MALTA; PEREIRA, 2005). Por isso, quanto maior for a injúria sofrida pelo grão, maior será a quantidade de íons potássio translocados para o meio líquido (CARVALHO JÚNIOR, 2002).

Goulart et al. (2007), estudando a relação entre os aspectos histoquímicos e morfológicos de grãos secos de café classificados como bebida mole, dura e rio, encontraram maior teor de lixiviação de potássio e aumento da condutividade elétrica nos cafés de menores qualidades, indicando, provavelmente, que as membranas e paredes celulares sejam as responsáveis direta e indiretamente pelas transformações no grão, quando este se deteriora. Segundo os autores, esses resultados comprovam que cafés de menor qualidade apresentam células desestruturadas, onde os diferentes graus de degradação celular descaracterizam o tecido endospermico pela desorganização dos corpos lipídicos dentro das células, ocasionando reações que culminam num processo de deterioração da qualidade da bebida.

O princípio básico da técnica de condutividade elétrica é a medição da quantidade de eletrólitos liberados pela semente na água de embebição. Essa quantidade é diretamente proporcional ao grau de desorganização da membrana plasmática e de sua permeabilidade (VIEIRA, 1994), sendo destaque como um dos testes mais rápidos e promissores na avaliação da qualidade de sementes de diversas espécies (COSTA; CARVALHO, 2006).

A condutividade elétrica e a lixiviação de K são testes rápidos e de técnicas relativamente fáceis, podendo segundo Favarin et al. (2004), auxiliar o

cafeicultor na separação de lotes, enquanto não se dispõe dos resultados da análise sensorial (padrão), de natureza subjetiva, expressa pelo aroma e sabor, efetuada por profissional do ramo, porém Malta, Pereira e Chagas (2007), atentam para a presença de grãos defeituosos, influenciando de maneira significativa as determinações de condutividade elétrica e lixiviação de potássio de exsudatos de grãos, levando a interpretações inadequadas quanto à qualidade do café analisado. Esses mesmos autores, ao estudarem a influência do tamanho dos grãos e dos tipos de defeitos na determinação da condutividade elétrica e da lixiviação de K, observaram que, com relação ao tamanho dos grãos de café sem a retirada de defeitos, verificou-se que as menores peneiras apresentaram maiores valores de condutividade elétrica e lixiviação de potássio, o que não foi observado quando se retiraram os defeitos dessas amostras.

2.4.3 Sólidos Solúveis

Na indústria de alimentos, a escala Brix é muito utilizada, para determinar a quantidade de sólidos solúveis presentes em uma solução de sacarose. A análise é realizada em poucos segundos e demanda uma quantidade muito pequena de amostra (ZEFERINO et al., 2010).

No caso do café, uma maior quantidade de sólidos solúveis é desejada, tanto pelo ponto de vista do rendimento industrial, quanto pela sua contribuição para assegurar o corpo da bebida, sendo interessante a utilização de cultivares que apresentem maior conteúdo dessa fração, propiciando a obtenção de bebida de boa qualidade (LOPES, 2000). O teor é constituído por compostos solúveis em água, tais como açúcares, ácidos, vitamina C e algumas pectinas (OLIVEIRA et al., 1999). Pode apresentar variações em função do tipo de

processamento (BORÉM et al., 2008; SANTOS; CHALFOUN; PIMENTA, 2009; VILELA, 2002), de diferentes cultivares submetidas ao mesmo processamento (MENDONÇA; PEREIRA; MENDES, 2005) e decorrentes de diferentes estádios de maturação (PIMENTA et al., 2008b).

2.4.4 Açúcares totais

Os açúcares estão relacionados com a qualidade da bebida do café e suas quantidades dependem principalmente da espécie e do local de cultivo do cafeeiro, além do estágio de maturação dos frutos (CAMPA et al., 2004). Estão associados aos aminoácidos, proteínas e são precursores de vários compostos voláteis e não voláteis.

Entre os açúcares presentes nos grãos de café, a sacarose destaca-se como sendo encontrada em maior quantidade e sua quantificação pode variar entre espécies, origem e tipo de processamento (MENDONÇA et al., 2007). Valores mais elevados de açúcares podem indicar a presença de maior doçura na bebida (SILVA et al., 2004). Durante o processo de torração, a sacarose, que é o açúcar presente em maior quantidade, quase que em sua totalidade é degradada, sendo utilizada na reação de Maillard e degradação de Strecker, originando vários compostos voláteis e não-voláteis, dentre eles, ácidos e aldeídos, responsáveis pelo aroma, resultando como produtos, os açúcares caramelizados, substâncias importantes responsáveis pela cor, viscosidade e o atributo corpo (BARRIOS, 2001; SILVA et al., 2004).

2.4.5 Acidez titulável total

A acidez é uma característica típica e até certo ponto desejável para o café, porém, se elevada, pode ser considerada um defeito. Pouco se conhece sobre os ácidos encontrados na bebida e sua influência sobre o pH e acidez percebida (VIGNOLI; BASSOLI, 2007).

A acidez percebida no café é um atributo importante para análise sensorial do produto e sua intensidade é influenciada por diversos fatores como condições climáticas durante colheita e secagem, local de origem, tipo de processamento e estágio de maturação (SIQUEIRA; ABREU, 2006). Pode também servir como suporte para auxiliar na avaliação da qualidade de bebida do café (PIMENTA, 2001).

Os ácidos orgânicos estão presentes em grande quantidade na fração volátil do café torrado (CLARKE, 1990).

2.4.6 Polifenoloxidase (PFO)

A polifenoloxidase é uma enzima cúprica de elevada importância na determinação dos atributos de qualidade de vários frutos e vegetais e a única conhecida que cataliza a oxidação aeróbica de compostos fenólicos, sendo esses compostos um dos que mais influenciam na qualidade, principalmente sabor e aroma do café, e de muitos produtos vegetais (AMORIM; SILVA, 1968). O ataque de insetos, infecções microbianas, alterações fisiológicas e danos mecânicos pré e pós-colheita, provocam o rompimento da membrana celular, propiciando maior contato entre as enzimas e os compostos químicos que atuam

dentro e fora das células do grão, modificando a composição original do café verde (AMORIM, 1978).

Diversos autores sugerem que em cafés de bebida inferior há o comprometimento da estrutura celular, pela alteração nas membranas, de forma que a enzima, exclusiva de plastídeos, entre em contato com compostos fenólicos, armazenados preferencialmente no vacúolo, ocorrendo a oxidação de fenóis, que convertidos a quinonas reagem com proteínas, inclusive a PFO, explicando sua menor atividade em café de menor qualidade (MAZZAFERA; GONÇALVES; SHIMIZU, 2002).

É possível distinguir a qualidade da bebida com base na atividade de PFO, estabelecendo inclusive, uma tabela delimitando faixas para cada classificação, sendo que os maiores valores estariam associados aos melhores padrões e os menores valores relacionados aos piores padrões (CARVALHO et al., 1994; CORRÊA; SILVA; MIRANDA, 1997).

2.4.7 Compostos bioativos em café

A dieta habitual fornece, além dos macro e micronutrientes essenciais, alguns compostos químicos, presentes na maioria em frutas e hortaliças, que exercem uma potente atividade biológica comprovada por vários estudos. Esses compostos são chamados de compostos bioativos ou, algumas vezes, de fitoquímicos e podem desempenhar diversos papéis em benefício da saúde humana (CARRATU; SANZINI, 2005).

São constituintes extranutricionais e ocorrem tipicamente em pequenas quantidades nos alimentos. Estudos epidemiológicos que abordam principalmente uma dieta rica em alimentos de origem vegetal, apresentam

resultados interessantes, sugerindo que esses alimentos são capazes de exercer influência na redução do risco do desenvolvimento de doenças crônicas não-transmissíveis, como cardiovasculares, cânceres, distúrbios metabólicos, doenças neurodegenerativas e enfermidades inflamatórias (CARRATU; SANZINI, 2005).

Uma ampla gama de compostos bioativos é estudada como sendo a responsável pelos efeitos benéficos de uma dieta rica em frutas e hortaliças. Entretanto, apresentam algumas características em comum: pertencem a alimentos do reino vegetal, são substâncias orgânicas e, geralmente, de baixa massa molecular, não são indispensáveis nem sintetizados pelo organismo humano e apresentam ação protetora na saúde humana, quando presentes na dieta em quantidades significativas (CARRATU; SANZINI, 2005).

Nos últimos anos, inúmeras evidências têm indicado que os radicais livres e outros oxidantes são os grandes responsáveis pelo envelhecimento e pelas doenças degenerativas associadas ao avanço da idade, tais como: câncer, doenças cardiovasculares, catarata, declínio do sistema imune e disfunções cerebrais (ATOUI et al., 2005).

O café, em razão principalmente, de possuir substâncias bioativas, apresenta atividade antioxidante (YEN et al., 2005). A relação de diferentes constituintes tem sido sugerida como sendo eles potencialmente quimioprotetores em diferentes sistemas químicos e biológicos e a explicação estaria nos numerosos antioxidantes presentes na bebida, como os ácidos clorogênicos, melanoidinas, que são produtos formados na reação de Maillard, e a cafeína (LIMA et al., 2009).

O café apresenta muitos compostos bioativos como a cafeína, vitamina B-3, ácidos clorogênicos, quinídeos (formados na torra a partir dos ácidos

clorogênicos) além de muitos outros, a maioria volátil, que precisam ser melhores estudados (TOCI; FARAH; TRUGO, 2006). Esses compostos são reconhecidos por suas propriedades benéficas à saúde humana. Inúmeros estudos têm sugerido que dietas ricas em vegetais e frutas podem reduzir os riscos de incidência de muitas doenças crônicas como câncer, diabetes e doenças cardiovasculares (SVILAAS et al., 2004).

Várias pesquisas mostram que o consumo de café pode ajudar a amenizar diversas doenças neurológicas crônicas como o mal de Parkinson e Alzheimer, doenças de origem metabólica como doenças no fígado (cirrose e carcinoma hepatocelular), diabetes tipo 2 e doenças cardiovasculares (PEREIRA; PARKER; FOLSOM, 2006).

A utilização de compostos antioxidantes encontrados nos alimentos é um dos mecanismos de defesa contra os radicais livres que podem ser empregados nas indústrias de alimentos, cosméticos, bebidas e também na medicina, sendo que, muitas vezes, os próprios medicamentos aumentam a geração intracelular desses radicais (WEIJL; CLETON; OSANTO, 1997). Por isso, Monteiro e Trugo (2005) alertam que a divulgação de teores de compostos bioativos no rótulo do café torna-se altamente recomendável, pois permitiria que o consumidor avaliasse melhor o produto para decidir em sua escolha.

2.4.7.1 Compostos fenólicos totais

Entre os antioxidantes presentes nos vegetais, os mais ativos e frequentemente encontrados são os compostos fenólicos. As propriedades benéficas desses compostos podem ser atribuídas à sua capacidade de sequestrar os radicais livres (DECKER, 1997). Esses compostos, de considerável

importância na dieta podem inibir o processo de peroxidação lipídica (HALLIWELL et al., 1997).

Estudos mais recentes sugerem diversas funções de defesa para as plantas, não somente contra agentes do meio ambiente (luz, temperatura e umidade), mas também para fatores internos, incluindo diferenças genéticas, nutrientes, hormônios, contribuindo para a sua síntese (BURNS et al., 2001).

Os compostos fenólicos são relatados como contribuintes do sabor e aroma característicos das bebidas de café e são conhecidos em razão das propriedades fisiológicas e farmacológicas que conferem à saúde humana, como a atividade antioxidante (SOUZA et al., 2007).

Muitos desses compostos apresentam efeitos biológicos, como ações antioxidantes, antimicrobianas, anti-inflamatórias e vasodilatadoras, com destaque para trigonelina, os ácidos clorogênicos e a cafeína, sendo facilmente solubilizados em água quente e, portanto, estando presentes na bebida do café, em teores dependentes de suas estabilidades aos processos degradativos que ocorrem durante a torrefação (NOGUEIRA; TRUGO, 2003).

Estudos tentam correlacionar a qualidade da bebida com a composição química do café, sugerindo que cafés de qualidade inferior apresentam maiores teores de compostos fenólicos, porém ainda não há uma relação definida (ABRAHÃO et al., 2010; PINTO et al., 2001).

2.4.7.2 Ácidos Clorogênicos

A combinação dos ácidos fenólicos com o ácido cafeico, o qual, associado a um álcool-ácido cíclico, denominado ácido quínico, origina o ácido clorogênico (SOARES, 2002). De acordo com Nebesny e Budryn (2003), estão

entre os principais constituintes bioativos responsáveis pela ação antioxidativa dos cafés.

Os ácidos clorogênicos estão entre os principais componentes da fração fenólica do café, dispostos na forma de diversos isômeros. Sua atividade antioxidante é decorrente, principalmente, das suas propriedades redutoras e estrutura química desempenhando um papel importante na neutralização de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os intermediários formados pela ação de antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, em razão da ressonância do anel aromático presente na estrutura dessas substâncias (CHUN et al., 2005).

Sendo o café uma das principais fontes de ácido clorogênico na dieta humana, sua concentração está em torno de 5,5% (ARAÚJO, 2007). Uma xícara de 200 mL pode conter cerca de 20-675 mg, dependendo da espécie de café e das condições de processamento (CLIFFORD, 1999).

Durante a torração dos grãos de café, ocorrem perdas significativas dos ácidos clorogênicos que são incorporados na composição de outras substâncias formadas durante esse processo e que estão relacionadas à cor e ao sabor do café (FARAH et al., 2006).

Apesar da concentração de ácido clorogênico após a torração do café ser baixa, Stadler et al. (1994), afirmam que essa permanência mesmo que residual após o processamento do café é benéfica, tendo em vista a atividade antioxidante dessa classe de compostos.

2.4.7.3 Cafeína

A cafeína é um alcalóide farmacologicamente ativo, pertencente ao grupo das xantinas e suas principais fontes alimentares são café, mate e guaraná (ARNAUD, 1999). Possui efeitos fisiológicos, sendo estimulante e bastante estável com a torração (ILLY; VIANI, 1996).

É inodora e possui sabor amargo bastante característico, contribuindo com uma nota de amargor importante para o sabor e aroma da bebida do café (BICCHI et al., 1995).

Cerca de 80% da população geral utiliza a cafeína diariamente, seja pelo consumo de café, chá, chocolates, refrigerantes ou medicamentos à base dessa substância (FELIPE et al., 2005). Uma xícara de café brasileiro (60 ml) contém, em média, 50,4mg de cafeína, sendo o café, considerado a fonte mais rica dessa substância (CAMARGO; TOLEDO, 1999).

É o componente mais conhecido dentre as substâncias do café e, embora não participe de nenhuma reação durante a torração do café, a cafeína possui conhecidas propriedades farmacológicas e fisiológicas quando ingerida, principalmente o seu efeito na redução do sono, bem como as suas propriedades estimulantes (FARAH et al., 2006).

2.4.7.4 Trigonelina

A importância de compostos não-voláteis do café como a trigonelina e os ácidos clorogênicos está relacionada com a função destes como precursores de outros compostos voláteis que contribuem para o sabor e aroma do café torrado (MALTA; CHAGAS, 2009).

A trigonelina é uma N-metil betaína, importante para o sabor e aroma do café. Contribui para o aroma por meio da formação de produtos de degradação durante a torra e, entre esses produtos, estão as piridinas e o N-metilpirrol (NOGUEIRA; TRUGO, 2003).

Apresenta geralmente maiores teores em grãos crus de *Coffea arabica* diferindo em função das diferentes espécies de café (MARIA; AMOREIRA; TRUGO, 1999), com o limite citado na literatura em torno de 0,6 a 1,2% (ILLY; VIANI, 1995).

Durante a torração, a trigonelina e os ácidos clorogênicos sofrem intensa degradação térmica, gerando uma série de compostos voláteis importantes para o sabor e aroma da bebida (ALVES et al., 2006). Durante esse processo tão drástico são produzidos diversos produtos. A trigonelina se degrada rapidamente e sofre desmetilação, formando diversos compostos voláteis como as piridinas, o N-metilpirrol e uma vitamina importante para o metabolismo humano, a niacina. Os níveis de niacina podem chegar próximo a 20mg 100g⁻¹ de café torrado (TRUGO; MACRAE, 1984).

O ácido nicotínico ou niacina é uma vitamina solúvel com ação ainda não conhecida totalmente, apresentando atuação sobre receptores específicos, diminuindo a liberação de ácidos graxos do tecido adiposo (KARPE; FRAYN, 2004). Tem a função de reduzir os níveis de triglicérides (20-50%) e de LDL colesterol (5-25%), sendo uma das drogas hipolipemiantes que mais aumenta o HDL colesterol (15-35%) (SANTOS; GIANNINI; FONSECA, 2001).

2.5 Classificação do café

Os processos fermentativos podem ser prejudiciais e trazer um comprometimento na qualidade de bebida e classificação por tipo, pois, a qualidade do café é determinada por fermentações favoráveis ou desfavoráveis e as reações enzimáticas podem ser responsáveis pela obtenção de boa ou má qualidade da bebida (PIMENTA et al., 2008a). Ainda segundo os autores, o café brasileiro é classificado em tipo, referindo-se aos defeitos como grãos deteriorados, pretos, ardidos, verdes, quebrados, conchas, chochos, cocos marinhoiros, cascas, torrões, pedras, etc. e classificação pela bebida classificando-a em estritamente mole, mole, apenas mole, dura, riada e rio, em ordem decrescente de valor, sendo essa classificação atualmente determinada pela COB - Classificação Oficial Brasileira - Dec. LEI nº 27.173 de 14/9/1949 (BRASIL, 2003).

Profissionais qualificados, cuja habilidade deve ser adquirida por meio de anos de experiência, são os responsáveis, segundo Leite et al., 1998, pela avaliação subjetiva do café. A classificação da qualidade baseada no aspecto, tipo e na classificação da bebida pela prova de xícara, poderia ser complementada com a adoção de métodos físicos, químicos e físico-químicos que facilitarão a avaliação tornando-a menos subjetiva (LEITE et al., 1998), proporcionando, assim, uma avaliação mais segura da qualidade desse produto (CARVALHO et al., 1994).

Por isso, há anos vários estudos visam a correlacionar a composição química dos grãos de café com a qualidade da bebida (CARVALHO et al., 1994; CHAGAS; MALTA; PEREIRA, 2005; MALTA; SANTOS; SILVA, 2002;

PIMENTA, 2001; PIMENTA et al., 2008a; PRETE, 1992), inclusive no presente estudo.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-BAKY, N. F.; ABDEL-SALAM, A. H. Natural incidence of *Cladosporium* spp. as a bio-control agent against whiteflies and aphids in Egypt. **Journal of Applied entomology**, Hamburg, v. 127, n. 11, p. 228-235, Nov. 2001.
- ABRAHÃO, S. A. et al. Compostos bioativos e atividade antioxidante do café (*Coffea arabica* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 2, p. 414-420, mar./abr. 2010.
- ALVES, E. **População fúngica associadas ao café (*Coffea arabica* L.) beneficiado e às fases pré e pós colheita: relação com a bebida e local de cultivo**. 1996. 48 f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1996.
- ALVES, S. T. et al. Metodologia para análise simultânea de ácido nicotínico, trigonelina, ácido clorogênico e cafeína em café torrado por cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 6, p. 1164-1168, nov./dez. 2006.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4th ed. Washington, 2001. 189 p.
- AMORIM, H. V. **Aspectos bioquímicos e histoquímicos do grão de café verde com a qualidade da bebida**. 1978. 85 f. Tese (Livre Docência em Bioquímica) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 1978.
- AMORIM, H. V.; SILVA, D. M. Relationship between the polyphenol oxidase activity of coffee beans and the quality of beverage. **Nature**, London, v. 219, n. 27, p. 381-382, July 1968.
- ARAÚJO, F. A. **Café (*Coffea arabica* L.) submetido a diferentes condições de torrefação: caracterização química e avaliação da atividade antioxidante e sensorial**. 2007. 130 p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo, 2007.

ARNAUD, M. J. **Encyclopedia of human nutrition**. London: Academic, 1999. v. 1, 206 p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DO CAFÉ. **Estatísticas**. Disponível em: <<http://www.abic.com.br>>. Acesso em: 10 set. 2011.

ATOUI, A. K. et al. Tea and herbal infusions: their antioxidant: activity and phenolic profile. **Food Chemistry**, London, v. 89, n. 1, p. 27-39, Mar. 2005.

BARRIOS, B. E. B. **Caracterização física, química, microbiológica e sensorial de cafés (*Coffea arabica* L.) da região Alto Rio Grande, Sul de Minas Gerais**. 2001. 72 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2001.

BETTIOL, W. Componentes do controle biológico de doenças de plantas. In: _____. **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA, 1991. p. 1-5.

_____. **Seleção de microrganismos antagônicos a *P.oryzae* para o controle da Brusone do arroz (*Oryza sativa* L.)**. 1988. 140 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 1988.

BETTIOL, W.; GHINI, R. Controle biológico. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Agronomica Ceres, 1995. p. 717-728.

BICCHI, C. P. et al. Characterization of green and roasted coffes through the chlorogenic acid fraction by HPLCUV and principal component analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 43, n. 3, p. 1549-1555, Jan. 1995.

BORÉM, F. M. et al. Qualidade do café natural e despolpado após secagem em terreiro e com altas temperaturas. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 5, p. 1609-1615, set./out. 2008.

BRAND, S. C. et al. Qualidade sanitária e fisiológica de sementes de soja submetidas a tratamento com bioprotetor e fungicida. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 31, n. 4, p. 515-521, 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa n. 8**, de 11 de junho de 2003. Aprova o regulamento técnico da identidade e de qualidade para a classificação de café beneficiado grão cru. Brasília, 2003. Disponível em: <<http://www.ministerio.gov.br>>. Acesso em: 10 nov. 2011.

BUENO, V. H. P. Controle biológico aumentativo com agêntes entomófagos. In: VENZON, M.; PAULA JÚNIOR, T. J.; PALLINI, A. (Coord.). **Controle alternativo de pragas e doenças**. Viçosa, MG: EPAMIG/CTZ; UFV, 2006. p. 23-42.

BURNS, J. et al. Extraction of phenolics and changes in antioxidant activity of red wines during vinification. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Easton, v. 49, n. 10, p. 5797-5808, Sept. 2001.

CAMARGO, M. C. R.; TOLEDO, M. C. F. Teor de cafeína em cafés brasileiros. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 18, n. 4, p. 421-424, out. 1999.

CAMPA, C. et al. Trigonelline and sucrose diversity in wild Coffea species. **Food Chemistry**, Washington, v. 88, n. 1, p. 39-43, Jan. 2004.

CARRATU, E.; SANZINI, E. Sostanze biologicamente attive presenti negli alimenti di origine vegetale. **Annali dell Istituto Superiore di Sanità**, Rome, v. 41, n. 1, p. 7-16, 2005.

CARVALHO, V. D. de; CHAGAS, S. J. R.; SOUZA, S. M. C. Fatores que afetam a qualidade do café. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 18, n. 187, p. 5-20, 1997.

CARVALHO, V. D. de; CHALFOUN, S. M. Aspectos qualitativos do café. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 11, n. 126, p. 79-92, 1985.

CARVALHO, V. D. de; CHALFOUN, S. M.; CHAGAS, S. J. de R. Relação entre classificação do café pela bebida e composição físico química, química e microflora do grão beneficiado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 15., 1989, Maringá. **Resumos...** Rio de Janeiro: MIC/IBC, 1989. p. 25-26.

CARVALHO, V. D. de et al. Relação entre a composição físico-química e química do grão beneficiado e a qualidade de bebida do café. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 3, p. 449-454, mar. 1994.

CARVALHO JÚNIOR, C. de. **Efeito de sistemas de colheita na qualidade do café (*Coffea arabica* L.)**. 2002. 140 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2002.

CHAGAS, S. J. de R.; MALTA, M. R.; PEREIRA, R. G. F. A. Potencial da região sul de Minas Gerais para a produção de cafés especiais: I., atividade da polifenoloxidase, condutividade elétrica e lixiviação de potássio. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 3, p. 590-597, maio/jun. 2005.

CHALFOUN, S. M. Biological control and bioactive microbial metabolites: a coffee quality perspective. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 5, p. 1071-1085, set./out. 2010.

_____. **O café (*Coffea arabica* L.) na região Sul de Minas Gerais: relação da qualidade com fatores ambientais, estruturais e tecnológicos**. 1996. 171 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1996.

CHALFOUN, S. M. et al. Seletividade de fungicidas cúpricos e sistêmicos sobre o fungo *Cladosporium cladosporioides* em cafeeiro. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, n. 1, p. 93-95, 2007.

CHUN, S. S. et al. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. **Process Biochemistry**, London, v. 40, n. 2, p. 809-815, Dec. 2005.

CLARKE, R. J. The volatile compounds of roasted coffee. **Italian Journal of Food Science**, Pinerolo, v. 8, n. 1, p. 79-88, 1990.

CLIFFORD, M. N. Chlorogenic acids and other cinnamates: nature occurrence and dietary burden. **Journal of Science Food Agriculture**, London, v. 79, n. 3, p. 362-372, Sept. 1999.

CORRÊA, P. C.; SILVA, C. G.; MIANDA, L. C. G. Qualidade da bebida do café (*Coffea arabica* L.) avaliada por espectrofotometria. **Revista Brasileira de Armazenamento**, Viçosa, MG, v. 22, n. 1, p. 9-12, 1997.

CORTEZ, J. G. Aptidão climática para qualidade da bebida nas principais regiões cafeeiras de Minas Gerais. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 18, n. 187, p. 27-31, 1994.

_____. Controle das fermentações do café e a qualidade da bebida. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 19., 1993, Três Pontas. **Resumos...** Rio de Janeiro: MARA, 1993. p. 86-87.

_____. **Efeito de espécies e cultivares e do processamento agrícola e industrial nas características da bebida do café**. 2001. 71 p. Tese (Doutorado em Fitologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2001.

COSTA, P. de S. C.; CARVALHO, M. L. M. de. Teste de condutividade elétrica individual na avaliação da qualidade fisiológica de sementes de café (*Coffea arabica* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 1, p. 92-96, jan./fev. 2006.

DECKER, E. A. Phenolics: prooxidants or antioxidants? **Nutrition Reviews**, New York, v. 55, n. 11, p. 396-407, Nov. 1997.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Recursos Genéticos e Biotecnologia. *Cladosporium*. Disponível em: <<http://www.cenargen.embrpa.com.br>>. Acesso em: 10 out. 2011.

FARAH, A. et al. Correlation between cup quality and chemical attributes of Brazilian coffee. **Food Chemistry**, London, v. 98, n. 2, p. 373-380, mar./abr. 2006.

FARIA, A. Y. K.; CASSETARI NETO, D.; ALBUQUERQUE, M. C. F. Atividade antagônica *in vitro* de *Trichoderma harzianum* a patógenos de sementes de algodão. **Revista Tropical**, Cuiabá, v. 6, n. 1, p. 61-71, 2002.

FAVARIN, J. L. et al. Qualidade da bebida de café de frutos cereja submetidos a diferentes manejos pós-colheita. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 2, p. 187-192, fev. 2004.

FELIPE, L. et al. Avaliação do efeito da cafeína no teste vestibular. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, Rio de Janeiro, v. 71, n. 6, p. 758-762, dez. 2005.

GALLO, M. L.; SELDS, A. M.; CABRERA, G. M. Antibiotic long-chain and δ,β -unsaturated aldehydes from culture of the marine fungus *Cladosporium sp.* **Biochemical Systematics and Ecology**, Palo Alto, v. 32, n. 8, p. 545-551, 2004.

GOULART, P. F. P. et al. Aspectos histoquímicos e morfológicos de grãos de café de diferentes qualidades. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 3, p. 662-666, maio/jun. 2007.

HALLIWELL, B. et al. The characterization on antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 33, n. 7, p. 240-244, 1997.

HENNING, F. A. et al. Qualidade fisiológica, sanitária e análise de isoenzimas de sementes de aveia-preta tratadas com diferentes fungicidas. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 31, n. 3, p. 63-69, jun. 2009.

ILLY, A.; VIANI, R. **Espresso coffee: the chemistry of quality**. San Diego: Academic, 1995. 253 p.

INDEX FUNGORUM. **Fungos**. Disponível em: <<http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp>>. Acesso em: 12 out. 2010.

JUNQUEIRA, N. T. V.; GASPAROTTO, L. Controle biológico de fungos estomáticos causadores de doenças foliares em seringueira. In: BETTIOL, W. (Org.). **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: CNPDA/EMBRAPA, 1991. p. 307-331.

KARPE, F.; FRAYN, K. N. The nicotinic acid receptor: a new mechanism for an old drug. **Lancet**, London, v. 363, n. 9424, p. 1892-1894, Apr. 2004.

LEITE, R. A. et al. Qualidade tecnológica do café (*Coffea arabica* L.) pré-processado por “via seca” e “via úmida” avaliada por método químico. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 2, n. 3, p. 308-311, 1998.

LIMA, A. R. et al. Compostos bioativos do café: atividade antioxidante *in vitro* do café verde e torrado antes e após a descafeinação. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 20-24, jan. 2009.

LIMA, E. A. et al. Efeito de *Trichoderma asperellum* no cultivo do alho, associado ou não com tratamento químico. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 2, p. 319-321, mar./abr. 2007.

LOPES, L. M. V. **Avaliação da qualidade de grãos crus e torrados de cultivares de cafeeiro (*Coffea arabica* L.)**. 2000. 87 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000.

LUZ, W. C. Avaliação dos tratamentos biológico e químico na redução de patógenos em semente de trigo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 1, p. 93-95, jan. 2003.

MADEIRA, M. C. B. de et al. **Coqueiro anão**: da produção de mudas à colheita. Natal: EMPARN, 1998. 72 p. (Documento, 26).

MALTA, M. R.; CHAGAS, S. J. R. Avaliação de compostos não-voláteis em diferentes cultivares de cafeeiro produzidas na região sul de Minas Gerais. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 31, n. 1, p. 57-61, 2009.

MALTA, M. R.; PEREIRA, R. G. F. A.; CHAGAS, S. J. R. Condutividade elétrica e lixiviação de potássio do exsudato de grãos de café: alguns fatores que podem influenciar essas avaliações. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 5., 2007, Águas de Lindóia. **Resumos...** Águas de Lindóia: CBP&D/CAFÉ/EMBRAPA/CAFÉ, 2007. 1 CD-ROM.

MALTA, M. R.; SANTOS, M. L. dos; SILVA, F. A. de M. Qualidade de grãos de diferentes cultivares de cafeeiro (*Coffea arabica* L.). **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 24, n. 5, p. 1385-1390, 2002.

MARIA, C. A. B. de; MOREIRA, R. F. A.; TRUGO, L. C. Compostos voláteis do café torrado: parte I, compostos heterocíclicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 22, n. 2, p. 209-217, mar./abr. 1999.

MARTINS, A. N.; SILVEIRA, A. P. de; SILVA, R. J. N. Avaliação da microbiota presente em café armazenado e recém beneficiado. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 2., 2001, Vitória. **Resumos...** Brasília: CBP&D-CAFÉ/EMBRAPA-CAFÉ, 2001. p. 59.

MAZZAFERA, P.; GONÇALVES, K. V.; SHIMIZU, M. M. Extração e dosagem da atividade da polifenoloxidase do café. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 59, n. 4, p. 695-700, out./dez. 2002.

MEIRELLES, A. M. A. **Ocorrência e controle da microflora associada aos frutos de café (*Coffea arabica* L.) provenientes de diferentes localidades do estado de Minas Gerais**. 1990. 71 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, 1990.

MENDONÇA, L. M. V. L. et al. Composição química de grãos crus de cultivares de *Coffea arabica* L. suscetíveis e resistentes à *Hemileia vastatrix* Berg et Br. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 2, p. 413-419, mar./abr. 2007.

MENDONÇA, L. M. V. L.; PEREIRA, R. G. F. A.; MENDES, A. N. G. Parâmetros bromatológicos de grãos crus e torrados de cultivares de café (*Coffea arabica* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 2, p. 239-243, abr./jun. 2005.

MONTEIRO, M. C.; TRUGO, L. C. Determinação de compostos bioativos em amostras comerciais de café torrado. **Química Nova**, São Paulo, v. 8, n. 4, p. 637-641, jul./ago. 2005.

MORICCA, S. et al. Antagonism of the two-needle pine stem rust fungi *Cronartium flaccidum* and *Peridermium pini* by *Cladosporium tenuissimum* *in vitro* and *in planta*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 91, p. 457-468, 2001.

NASINI, G. et al. Secondary mould metabolites of *Cladosporium tenuissimum*, a hyperparasite of rust fungi. **Phytochemistry**, Saint Paul, v. 65, p. 2107-2111, 2004.

NEBESNY, E.; BUDRYN, G. Antioxidative activity of green and roasted coffee beans as influenced by convection and microwave roasting methods and content of certain compounds. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 217, n. 2, p. 157-163, Feb. 2003.

NOGUEIRA, M.; TRUGO, L. C. Distribuição de isômeros de ácido clorogênico e teores de cafeína e trigonelina em cafés solúveis brasileiros. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. 2, p. 296-299, maio/ago. 2003.

OLIVEIRA, M. E. B. de et al. Avaliação de parâmetros de qualidade físico-químicos de polpas congeladas de acerola, cajá e caju. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 19, n. 3, p. 326-332, set./dez. 1999.

PASIN, L. A. A. P.; ALMEIDA, J. R.; ABREU, M. S. Fungos associados a grãos de cinco cultivares de café (*Coffea arabica* L.). **Acta Botanica Brasilica**, Porto Alegre, v. 4, n. 23, p. 1129-1132, 2009.

PEREIRA, L. F. P.; GALVÃO, R. M.; KOBAYASHI, A. K. Produção de etileno e expressão do gene de ACC-oxidase durante a maturação de frutos de *Coffea arabica* L. **Brazilian Journal Plant Physiology**, Campos dos Goytacases, v. 17, n. 3, p. 283-289, July/Sept. 2005.

PEREIRA, M. A.; PARKER, E. D.; FOLSOM, A. R. Coffee consumption and risk of type 2 diabetes mellitus: an 11-year prospective study of 28 812 postmenopausal women. **Archives of International Medicine**, Chicago, v. 166, n. 12, p. 1311-1316, Dec. 2006.

PEREIRA, R. G.; BORÉM, F. M.; VILELA, T. Caracterização microbiológica e qualidade da bebida de cafés (*Coffea arabica* L.) da região Alto Rio Grande, Sul de Minas Gerais. In: SIMPÓSIO DE PESQUISAS DO CAFÉ DO BRASIL, 2., 2001, Vitória. **Resumos...** Brasília: EMBRAPA Café, 2001. p. 187-189.

PEREIRA, R. G. F. A. **Efeito da inclusão de grãos defeituosos na composição química e qualidade do café (*Coffea arabica* L.) “estritamente mole”**. 1997. 96 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1997.

PEREIRA, R. T. G. **Influência de *Cladosporium cladosporioides* na qualidade da bebida do café**. 2002. 42 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2002.

PEREIRA, R. T. G.; PFENNING, L. H.; CASTRO, H. A. Caracterização e dinâmica de colonização de *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries em frutos do cafeeiro (*Coffea arabica* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 6, p. 1112-1116, nov./dez. 2005.

PEZZOPANE, C. G. **Influências ambientais e da variabilidade genética no rendimento intrínseco do café**. 2003. 64 p. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) - Instituto Agronômico, Campinas, 2003.

PIMENTA, C. J. **Época de colheita e tempo de permanência dos frutos à espera da secagem, na qualidade do café**. 2001. 145 p. Tese (Doutorado em Química, Físico-Química e Bioquímica de Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2001.

PIMENTA, C. J. et al. Avaliação físico-química e de qualidade do café (*Coffea arabica* L.) submetido a diferentes tempos de espera para secagem. **Revista Brasileira de Armazenamento - Especial Café**, Viçosa, MG, n. 10, p. 36-41, 2008b.

_____. Composição química e avaliação da qualidade do café (*Coffea arabica* L.) colhido em diferentes épocas. **Revista Brasileira de Armazenamento - Especial Café**, Viçosa, MG, n. 10, p. 29-35, 2008a.

PINTO, N. A. V. D. et al. Avaliação dos polifenóis e açúcares em padrões de bebida do café torrado tipo expresso. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 7, n. 3, p. 193-195, set./dez. 2001.

PRETE, C. E. C. **Condutividade elétrica do exudado de grãos de café (*Coffea arabica* L.) e sua relação com a qualidade da bebida**. 1992. 125 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 1992.

REINATO, C. H. R. et al. Avaliação técnica, econômica e qualitativa do uso de lenha e GLP na secagem de café. **Revista Brasileira de Armazenamento - Especial Café**, Viçosa, MG, n. 7, p. 3-13, 2003.

SANTOS, M. A.; CHALFOUN, S. M.; PIMENTA, C. J. Influência do processamento por via úmida e tipos de secagem sobre a composição, físico química e química do café (*Coffea arabica* L). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 1, p. 213-218, jan./fev. 2009.

SANTOS, R. D.; GIANNINI, S. D.; FONSECA, F. A. H. Diretrizes brasileiras sobre dislipidemias e diretriz de prevenção da aterosclerose do departamento de aterosclerose da sociedade brasileira de cardiologia. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo, v. 77, n. 1, p. 48-52, jan. 2001.

SILVA, A. C. F.; ROSA, C. R. E.; MELO, I. S. Sensibilidade de isolados de *Trichoderma* spp. a benomil e iprodione. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 29, n. 2, p. 395-399, mar./abr. 1999.

SILVA, C. F.; BATISTA, L. R.; SCHWAN, R. F. Incidence and distribution of filamentous fungi during fermentation, drying and storage of coffee (*Coffea arabica* L.) beans. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 39, n. 1, p. 521-526, Apr. 2008.

SILVA, C. F. et al. Microbial diversity during maturation and natural processing of coffee cherries of *Coffea arabica* in Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 60, n. 2, p. 251-260, Apr. 2000.

_____. Qualidade do café-cereja descascado produzido na região sul de Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 6, p. 1367-1375, nov./dez. 2004.

SIQUEIRA, H. H.; ABREU, C. M. P. Composição físico-química e qualidade do café submetido a dois tipos de torração e com diferentes formas de processamento. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 1, p. 112-117, jan./fev. 2006.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidants. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.

SOUZA, C. M. M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 351-355, jul. 2007.

STADLER, R. H. et al. The inhibitory effects of coffee on radical-mediated oxidation and mutagenicity. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 308, n. 2, p. 177-190, 1994.

SVILAAS, A. et al. Intakes of antioxidants in coffee, wine, and vegetables are correlated with plasma carotenoids in humans. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 134, n. 3, p. 562-567, June 2004.

TOCI, A.; FARAH, A.; TRUGO, L. C. Effect of decaffeination using dichloromethane on the chemical composition of arabica and robusta raw and roasted coffees. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 5, p. 965-971, set./out. 2006.

TRUGO, L. C.; MACRAE, R. Chlorogenic acid composition of instant coffee. **The Analyst**, London, v. 109, p. 263-270, Oct. 1984.

VIEIRA, R. D. Teste de condutividade elétrica. In: VIEIRA, R. D.; CARVALHO, N. M. (Ed.). **Testes de vigor em sementes**. Jaboticabal: FUNEP, 1994. p. 103-132.

VIGNOLI, J. A.; BASSOLI, D. G. Determinação de ácidos carboxílicos e fenólicos em café solúvel utilizando HPLC/DAD. **Revista Analytica**, Rio de Janeiro, n. 27, p. 76-79, fev./mar. 2007.

VILELA, T. C. **Qualidade do café despulpado, desmucilado, descascado e naural durante o processo de secagem**. 2002. 60 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2002.

WEIJL, N. I.; CLETON, F. J.; OSANTO, S. Free radicals and antioxidants in chemotherapy-induced toxicity. **Cancer Treatment Reviews**, London, v. 23, n. 4, p. 209-218, 1997.

YEN, W. J. et al. Antioxidant properties of roasted coffee residues. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, n. 7, p. 2658-2663, July 2005.

ZEFERINO, L. B. et al. Efeito da concentração de sólidos solúveis do extrato de café conilon no índice de refração, na densidade e na viscosidade do extrato. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 6, n. 11, p. 1, 2010.

CAPÍTULO 2

**COMPETIÇÃO *IN VITRO* ENTRE *Cladosporium cladosporioides* (Fresen)
de Vries E FUNGOS POTENCIALMENTE TOXIGÊNICOS**

RESUMO

Na cultura do café, as condições favoráveis ao desenvolvimento de fungos podem proporcionar a depreciação da bebida em razão das fermentações que conferem sabor e odor indesejáveis, além de comprometer a segurança pela produção de micotoxinas. Associado à qualidade e segurança do café, o fungo *Cladosporium* merece destaque por ser considerado como um agente antagonista de fungos deletérios à qualidade da bebida, por isso, no presente estudo objetivou-se avaliar a competição *in vitro* entre *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries com as espécies fúngicas potencialmente toxigênicas associadas à depreciação e segurança da bebida: *Aspergillus ochraceus* G. Wilh, *Aspergillus niger* Tiegh e *Fusarium verticillioides* (Saccardo) Nirenberg. Após a obtenção e identificação, foram realizados os testes de germinação dos esporos de cada espécie isoladamente e os testes de competição. Os resultados da identificação dos isolados comprovaram ser as espécies com potencial de produção de toxinas. O teste *in vitro* para a competição entre *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries e os isolados com potencial toxigênico demonstrou que o fungo foi capaz de se desenvolver normalmente, retardando o início da germinação dos conídios de *Aspergillus ochraceus* G. Wilh por até 20 dias. Também inibiu a germinação dos conídios de *Aspergillus niger* Tiegh e *Fusarium verticillioides* (Saccardo) Nirenberg por período superior a 20 dias. Além da antibiose, a hifa de *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries foi capaz de hiperparasitar o conídio de *Aspergillus ochraceus* G. Wilh, alterando sua estrutura e textura. Conclui-se que *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries pode ser considerado como um micro-organismo capaz de promover controle biológico de fungos associados a frutos de café com ação deletéria sobre a qualidade do café.

Palavras-chave: antibiose, hiperparasitismo, controle biológico, fungos.

ABSTRACT

In the culture of coffee, the cultivate conditions to fungi growth can provide the depreciation of the drink by the bad taste produced by fermentation and compromise the security for the production of mycotoxins. Associated with quality and safety of coffee, the fungus *Cladosporium* has been as an antagonistic agent of fungi deleterious to the quality of drink, so, this study aimed to evaluate the *in vitro* competition between *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries with the potentially toxigenic fungal species associated with depreciation and safety of the drink: *Aspergillus ochraceus* G. Wilh, *Aspergillus niger* Tiegh and *Fusarium moniliforme* (Saccardo) Nirenberg. After obtained and isolated it was testing germination of spores of each species in isolation and testing of the competition. The results showed that the identification of the isolates proved to be the species with the potential to produce toxins. The *in vitro* test for competition between *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries and potentially toxigenic isolates showed that the fungus was able to develop normally delaying germination of conidia of *Aspergillus ochraceus* G. Wilh for up to 20 days through the process of antibiosis. Promoted too inhibition of spore germination of *Aspergillus niger* Tiegh and *Fusarium verticillioides* (Saccardo) Nirenberg for more than 20 days of observation. In addition to antibiosis, the hyphae of *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries was able to hiperparasitism the conidia of *Aspergillus ochraceus* G. Wilh, changing its structure and texture. The results concluded that *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries can be considered as organism capable of promoting biological control in associated fungi fruits coffee with harmful in coffee quality.

Key words: antibiosis, hiperparasitism, biological control, fungi.

1 INTRODUÇÃO

As interações entre plantas e micro-organismos são conhecidas há muito tempo, porém, com exceção das associações micorrízicas, sempre foi dado um enfoque fitopatológico para essas interações. Atualmente, sabe-se que praticamente toda planta é colonizada por micro-organismos (SOUZA, 2010).

Se um micro-organismo interage com outros, proporcionando condições desfavoráveis ao desenvolvimento destes, está formada uma interação antagonista (BETTIOL, 1991).

Os mecanismos das interações antagonistas entre micro-organismos com a planta podem ser divididos em antibiose, competição, parasitismo, predação e indução de defesa do hospedeiro (MELO; AZEVEDO, 1998). É considerada como uma característica de antagonista, apresentar mais de um mecanismo, pois assim, são aumentadas as suas chances de sucesso (REMUSKA; PRIA, 2007).

Na cultura do café, as condições favoráveis ao desenvolvimento de fungos podem proporcionar a depreciação da bebida, em razão do gosto produzido pelas fermentações, além de comprometer a segurança pela produção de micotoxinas, sendo os principais gêneros fúngicos micotoxigênicos *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, contaminantes naturais do café (BATISTA et al., 2003) que já foram encontrados em amostras de diversas partes do Brasil (ALMEIDA et al., 2007; BOZZA et al., 2009; PASIN; ALMEIDA; ABREU, 2009; SILVA; BATISTA; SCHWAN, 2008).

Baseado nas interações antagonistas e diante de vários estudos sobre qualidade do café, o fungo *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries pode ser considerado como uma agente antagonista de fungos deletérios à qualidade da bebida (CARVALHO; CHALFOUN; CHAGAS, 1989;

CHALFOUN, 2010; CHALFOUN et al., 2007; PEREIRA; PFENNING; CASTRO, 2005). Estudos demonstram que o micro-organismo atua por meio dos mecanismos de competição antibiose e parasitismo, em razão da grande capacidade de adaptação natural, além da rápida capacidade para colonizar o substrato (PEREIRA; PFENNING; CASTRO, 2005).

No processo de antibiose, a produção do cladosporol pelo fungo *Cladosporium sp.* é responsável pela inibição do desenvolvimento de insetos e outras espécies fúngicas (NASINI et al., 2004).

A sua atuação como parasita foi constatada por promover hiperparasitismo em algumas espécies fúngicas (ASSANTE et al., 2004).

Dois tipos de interações micoparasitas têm sido reconhecidas e estudadas: micoparasitismo biotrófico e necrotrófico. No micoparasitismo necrotrófico, o parasita destrói a célula hospedeira e utiliza os nutrientes do hospedeiro.

Diante do exposto, no presente estudo, objetivou-se avaliar a competição *in vitro* entre o fungo considerado agente bioprotetor da qualidade do café *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries com as espécies fúngicas potencialmente toxigênicas associadas à depreciação e segurança da bebida: *Aspergillus ochraceus* G. Wilh, *Aspergillus niger* Tiegh e *Fusarium verticillioides* (Saccardo) Nirenberg.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Plaqueamento dos frutos

O experimento foi realizado no ano agrícola 2009/2010. Foram utilizados frutos de café da cultivar Catuaí Amarelo IAC 62 com 3 anos de idade coletados da lavoura localizada na Fazenda Santa Helena, no município de Alfenas – MG, às margens da represa de Furnas, lavoura esta, susceptível a ocorrência de micro-organismos causadores de processos fermentativos por ocasião da alta umidade relativa do ar. Esa fazenda foi escolhida porque em algumas áreas apresentava histórico de qualidade inferior de bebida.

As análises microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Fitopatologia e Microbiologia da EPAMIG/URESM.

Os isolados fúngicos dos gêneros *Cladosporium*, *Aspergillus* e *Fusarium* do presente estudo foram obtidos pela técnica de plaqueamento direto pelo método Blotter Test (TEMPE, 1963) sem desinfestação, pois como observado em pesquisas anteriores, o agente biológico *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries não possui capacidade de penetração no interior dos frutos ao contrário dos fungos potencialmente toxigênicos.

Para a análise, foram utilizadas 4 placas de Petri de 13 cm de diâmetro, contendo meio de cultura BDA (Batata, Dextrose e Ágar). Em cada placa, foram colocados 25 frutos em diferentes estádios de maturação, totalizando 100 frutos.

Após esse procedimento, as placas de Petri contendo as amostras, foram incubadas em estufa do tipo Biochemistry Oxygen Demand (BOD) à temperatura de 25°C, com fotoperíodo de 12 horas por 10 dias. Passado o período de incubação, foi observada visualmente, a ocorrência das colônias

fúngicas de interesse para o presente estudo e providenciada a repicagem aleatória de uma colônia de cada gênero. Posteriormente, os gêneros foram purificados em meio de cultura BDA a 25°C, para posterior identificação e os testes de competição.

2.2 Identificação dos gêneros *Cladosporium*, *Aspergillus* e *Fusarium*

Para a identificação das espécies fúngicas, foi utilizada 1 colônia de *Cladosporium sp.*, 1 colônia de *Aspergillus* da *Seção Circumdati*, 1 colônia de *Aspergillus* da *Seção Nigri* e 1 colônia de *Fusarium sp.* previamente obtidas por plaqueamento direto.

2.2.1 Identificação do isolado do gênero *Cladosporium*

O isolado foi mantido em meio de cultura MEA (Malte, Extrato de Levedura e Ágar), incubado a 18-20°C por 10 dias, sendo observadas as características macroscópicas e microscópicas para se proceder a identificação conforme Samson et al. (2000).

2.2.2 Identificação dos isolados do gênero *Aspergillus*

A identificação quanto à espécie dos isolados procedeu-se conforme Batista (2000), Chalfoun e Batista (2003) e Klich (2002), sendo os fungos isolados em meio de cultura CYA (Czapek, Yeast Extract, Ágar) e incubados a 25°C e 37°C por um período de 7 dias.

2.2.3 Identificação do isolado do gênero *Fusarium*

A identificação do isolado foi de acordo com Leslie e Summerell (2006), sendo o fungo repicado em meio de cultura SNA (Synthetic Nutrient-Poor, Ágar) e BDA e incubado a 20°C com fotoperíodo de 12 horas.

2.3 Competição entre os fungos

Após a identificação das espécies fúngicas, as mesmas foram repicadas em meio de cultura BDA e incubadas por cerca de 20 dias em BOD com fotoperíodo de 12 horas à 25°C, quando ocorreu o desenvolvimento em toda a placa. Posteriormente, deu-se início aos testes de germinação dos esporos e competição entre as espécies.

2.3.1 Teste *in vitro* para determinação do início da germinação dos esporos fúngicos

Após o desenvolvimento das colônias fúngicas, foi realizado um ensaio *in vitro* com o intuito de determinar o tempo de germinação dos esporos de cada espécie isoladamente para posterior análise do teste de competição.

Para isso, em cada placa contendo uma colônia pura de cada espécie, foram adicionados 40mL de água destilada e esterilizada. Em seguida, o micélio foi raspado para a obtenção de uma suspensão que, posteriormente, foi filtrada com o auxílio de uma gaze para obtenção somente dos esporos. Após a filtragem, foi transferida por meio de uma pipeta automática, uma alíquota de 50µL da solução de esporos de cada espécie fúngica para Placas de Petri de 6cm

de diâmetro, contendo meio de cultura BDA, sendo a solução espalhada por alça de Drigalsky.

Após a inoculação, as placas foram mantidas em BOD à 25°C com fotoperíodo de 12 horas, sendo observadas de 2 em 2 horas no microscópio ótico, para avaliar o comportamento dos esporos quanto ao início do processo de germinação, ou seja, observar o início do desenvolvimento do tubo germinativo.

2.3.2 Competição *in vitro* entre o gênero *Cladosporium* e os outros fungos

O teste de competição *in vitro* foi realizado com a finalidade de se avaliar o comportamento das diferentes espécies de fungos potencialmente toxigênicos, juntamente com o gênero *Cladosporium* em um mesmo substrato.

Em cada placa contendo uma colônia isoladamente, foram adicionados 40mL de água destilada e esterilizada. Em seguida, o micélio foi raspado para a obtenção de uma suspensão que, posteriormente, foi filtrada com o auxílio de uma gaze para obtenção somente dos esporos. Após a filtração, foi transferida por meio de uma pipeta automática, uma alíquota de 30μL da solução de esporos para Placas de Petri, plásticas de 6cm de diâmetro contendo meio de cultura BDA, sendo a solução espalhada por alça de Drigalsky.

Os tratamentos foram os seguintes:

- A) 30μL da solução de *Aspergillus ochraceus* G. Wilh + 30μL da solução de *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries;
- B) 30μL da solução de *Aspergillus niger* Tiegh + 30μL da solução de *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries;

C) 30µL da solução de *Fusarium verticillioides* (Saccardo) Nirenberg + 30µL da solução de *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries.

Após a inoculação, as placas foram mantidas em BOD à 25°C com fotoperíodo de 12 horas, sendo observado o comportamento dos esporos por meio de um microscópio estereoscópico trinocular Olympus SZX7TR-ILA acoplado a uma câmera filmadora depois de 17, 24 e 36 horas e aos 3, 10 e 20 dias.

2.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Diante da observação no microscópio ótico da deformação de alguns esporos de *Aspergillus ochraceus* G. Wilh quando inoculado juntamente com *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries, foi utilizada a microscopia eletrônica de varredura visando à captação de maiores detalhes.

As amostras foram preparadas e fotografadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural (LME/UFLA), segundo a metodologia proposta por Alves (2004).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Identificação das espécies fúngicas isoladas

3.1.1 Gênero *Cladosporium*

O isolado do gênero *Cladosporium* foi identificado como sendo o fungo *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries, espécie comumente encontrada na microbiota natural do café, sendo associada à bebida de melhor qualidade (CHALFOUN, 2010; PEREIRA; PFENNING; CASTRO, 2005).

As principais características distintivas que permitiram a sua identificação foram a cicatriz proeminente dos conídios, conidióforos sem nódulos, conídios sem septos ou com somente um septo e com formato elipsoidal ou limoniforme (SAMSOM et al., 2000).

3.1.2 Gênero *Aspergillus* da Seção *Circumdati*

O isolado da Seção *Circumdati* foi identificado como sendo *Aspergillus ochraceus* G. Wilh, espécie esta comumente encontrada em frutos de café e associada a produção de ocratoxina A (BATISTA; CHALFOUN, 2007; VISOTTO et al., 2008). De acordo com Batista (2000) e Chalfoun e Batista (2003), as primeiras características observadas para se diferenciar espécies de *Aspergillus* da Seção *Circumdati* são a produção e a cor dos escleródios e o crescimento a 37°C. Segundo os autores, escleródios de coloração púrpura a rosa, produzidos pelas espécies de *Aspergillus ochraceus* G. Wilh e conídios

pequenos e próximos de lisos são as principais características para distinguir essa espécie das demais.

3.1.3 Gênero *Aspergillus* da Seção *Nigri*

O isolado da *Seção Nigri* foi identificado como *Aspergillus niger* Tiegh, de acordo com Klich (2002), apresentando coloração dos esporos marrom bastante escuro a preto e muito rugosos. Essa espécie é descrita em vários relatos associados ao café (PASIN; ALMEIDA; ABREU, 2009) e apresenta um menor número de isolados OTA positivos (BATISTA et al., 2003; VENÂNCIO; PATERSON, 2007).

3.1.4 Gênero *Fusarium*

O isolado do gênero *Fusarium* foi identificado como sendo *Fusarium verticillioides* (Saccardo) Nirenberg, apresentando colônia de crescimento rápido e micélio aéreo branco com microconídios formados no micélio aéreo em cadeias e macroconídios em esporodóquios formados por monofiálides, além da ausência de escleródios (LESLIE; SUMMERELL, 2006).

Apesar de ocorrer mais comumente em milho (FIGUEIRA; COELHO; HIROOKA, 2003), essa espécie também é encontrada em café (FERNANDES, 2009; PFENNING; MARTINS, 2000).

3.2 Teste *in vitro* para determinação do tempo de início da germinação dos esporos fúngicos de cada espécie isoladamente

Este ensaio foi realizado com o intuito de determinar o tempo de início da germinação dos esporos de cada espécie fúngica isoladamente para depois se avaliar a ocorrência de competição entre cada espécie juntamente com *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries.

3.2.1 *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries

De acordo com o teste de germinação *in vitro*, após a inoculação dos esporos em meio de cultura BDA (Figura 1A), o fungo *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries (Figura 1), iniciou o processo de germinação à partir de 17 horas de incubação (Figura 1B), tendo seu desenvolvimento estabelecido com 3 dias de incubação (Figura 1C).

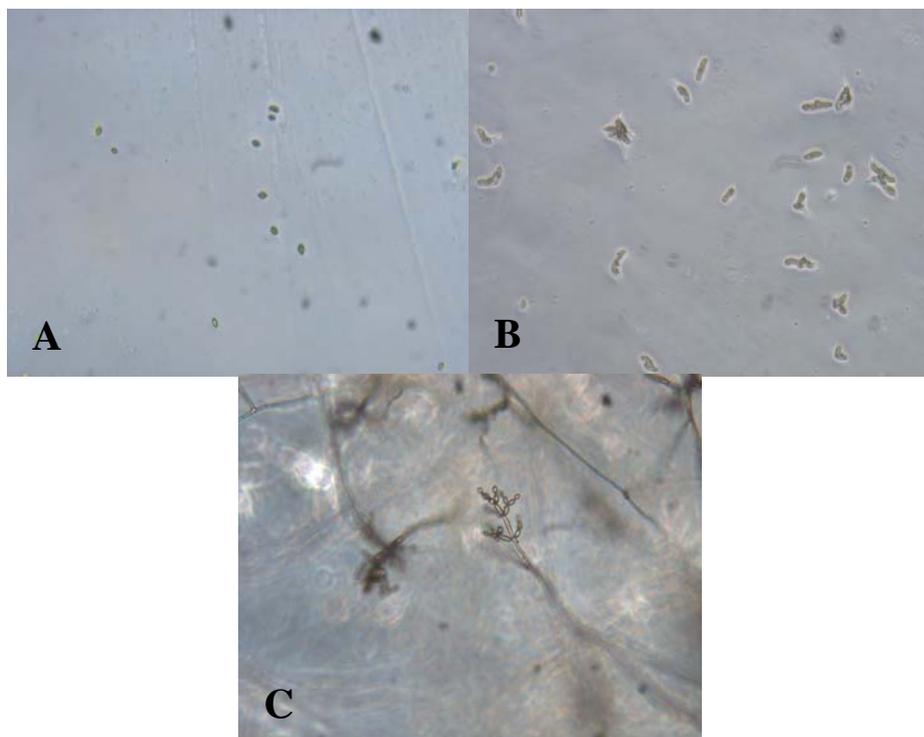


Figura 1 Teste de germinação *in vitro* de *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries. (A) Esporos após a inoculação. (B) Início da germinação dos esporos após 17 horas de incubação. (C) Estrutura formada com 3 dias de incubação.

Rocha (2006), utilizando meio completo (MC) (0.001g de FeSO₄, 0.5g de KCl, 1.5g de KH₂PO₄, 0.5g de MgSO₄·7H₂O, 6g de NaNO₃, 0.001g de ZnSO₄, 1.5g de caseína hidrolizada, 0.5g de extrato de levedura, 10g de glicose, 2g de peptona, 20g ágar e 1000 mL de H₂O destilada), determinou o início de germinação dos esporos de *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries com apenas 8 horas de incubação, e, assim, como também no presente estudo, em seu trabalho, a estrutura do fungo se completou com 3 dias de incubação. Como o meio de cultura utilizado pelo autor é rico em nutrientes pode ter contribuído para a germinação mais rápida do *Cladosporium* no MC, em relação ao BDA utilizado no presente estudo.

3.2.2 *Aspergillus ochraceus* G. Wilh

Na figura 2, exibe-se o teste de germinação *in vitro* do fungo *Aspergillus ochraceus* G. Wilh em meio de cultura BDA. Depois da inoculação dos conídios (Figura 2A), o fungo apresentou desenvolvimento do tubo germinativo após 23 horas de incubação (Figura 2B) com formação completa da estrutura aos 10 dias (Figura 2C).

Souza (2010) observou início da germinação de conídios de *Aspergillus ochraceus* G. Wilh, após 12 horas de incubação, em meio de cultura AA (Ágar Água), metade do tempo observado no presente estudo. Como esse meio de cultura é pobre em nutrientes, pode-se atribuir esse fato ao início mais rápido da germinação dos conídios do fungo em relação ao BDA. Frigo e Azevedo (1986) afirmam que substratos pobres induzem a esporulação de fungos com maior produção de conídios.

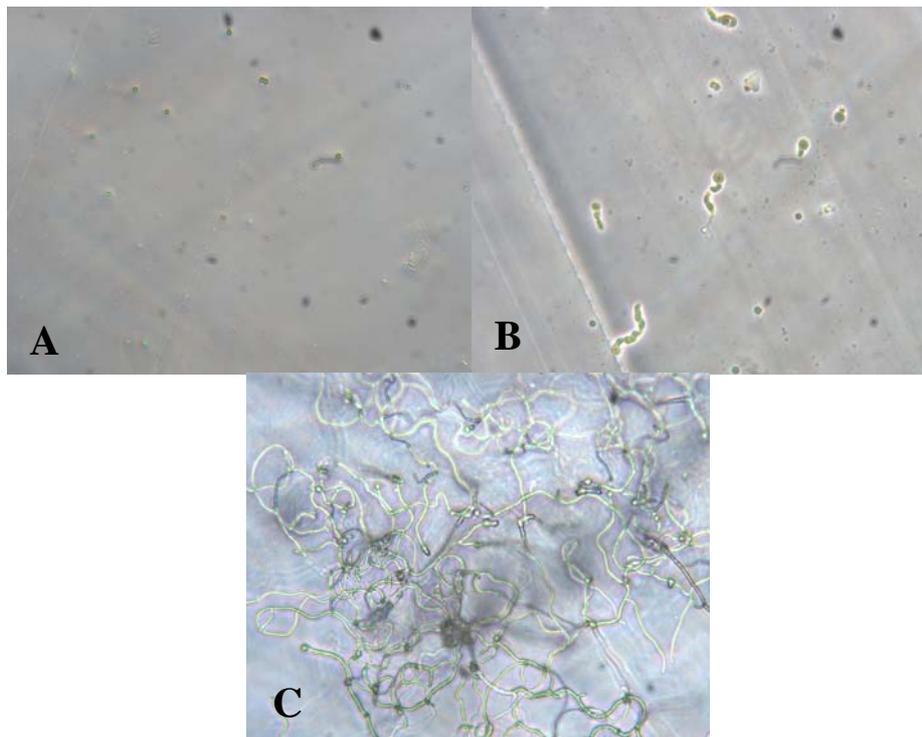


Figura 2 Teste de germinação *in vitro* de *Aspergillus ochraceus* G. Willh. (A) Conídios após a inoculação. (B) Início da germinação dos conídios após 23 horas de incubação. (C) Estrutura formada aos 10 dias de incubação.

3.2.3 *Aspergillus niger* Tiegh

No fungo *Aspergillus niger* Tiegh (Figura 3), depois da inoculação dos conídios no meio de cultura BDA (Figura 3A), iniciou-se o processo de germinação somente após 30 horas de incubação, porém apresentando um desenvolvimento muito mais rápido que os outros fungos testados. Com 36 horas já havia desenvolvido bastante (Figura 3B), tendo sua estrutura formada também em apenas 3 dias (Figura 3C).

Souza (2010), a exemplo de *Aspergillus ochraceus* G. Wilh, também observou para *Aspergillus niger* Tiegh o início mais rápido da germinação dos conídios (após 18 horas de incubação) em relação ao presente estudo. Como também foi utilizado o meio de cultura AA em seu estudo, mais uma vez se justifica ser a composição do meio, a responsável pelo menor tempo para o início da germinação dos conídios também para essa espécie fúngica.

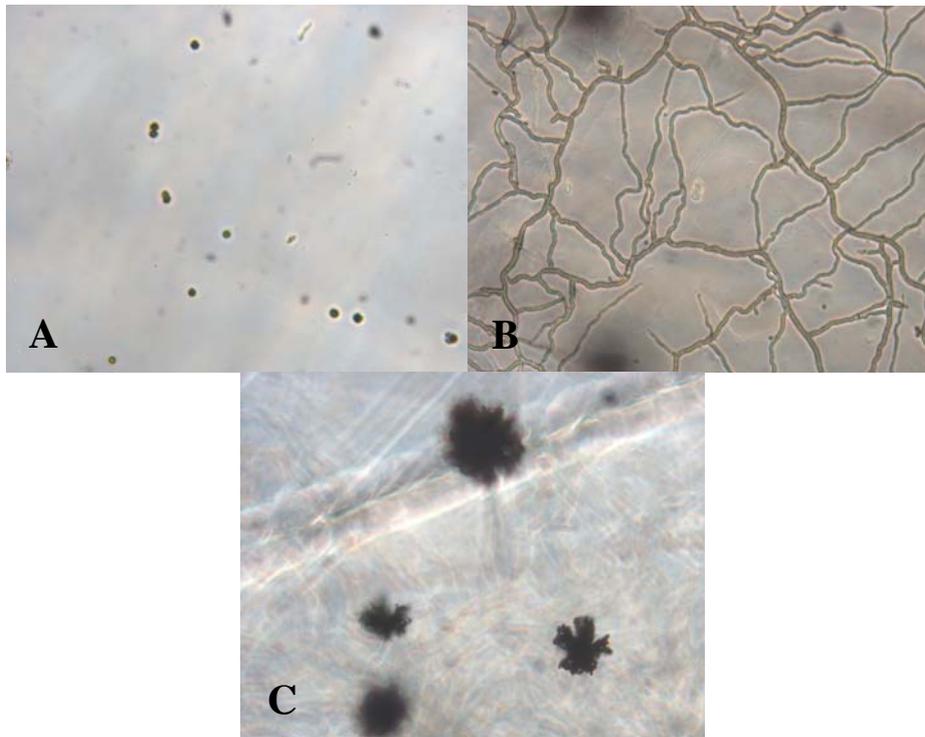


Figura 3 Teste de germinação *in vitro* de *Aspergillus niger* Tiegh. (A) Conídios após a inoculação. (B) Germinação dos conídios, após 36 horas de incubação. (C) Estrutura formada após 3 dias de incubação.

3.2.4 *Fusarium verticillioides* (Saccardo) Nirenberg

O fungo *Fusarium verticillioides* (Saccardo) Nirenberg (Figura 4), depois da inoculação em BDA (Figura 4A), apresentou início de germinação de conídios, após 24 horas de incubação (Figura 4B) e início do desenvolvimento da sua estrutura, aos 3 dias, apresentando somente microconídios (Figura 4C). Segundo Nelson, Toussoun e Marasas (1983), essa espécie apresenta abundância de microconídios, mas os macroconídios estão presentes, mesmo que algumas vezes sejam raros. Neste estudo, não foram detectados macroconídios talvez pelo pouco período de incubação. Souza (2010) também detectou o início da germinação de conídios de *Fusarium verticillioides* (Saccardo) Nirenberg, após 24 horas de incubação em meio de cultura AA (Ágar Água).

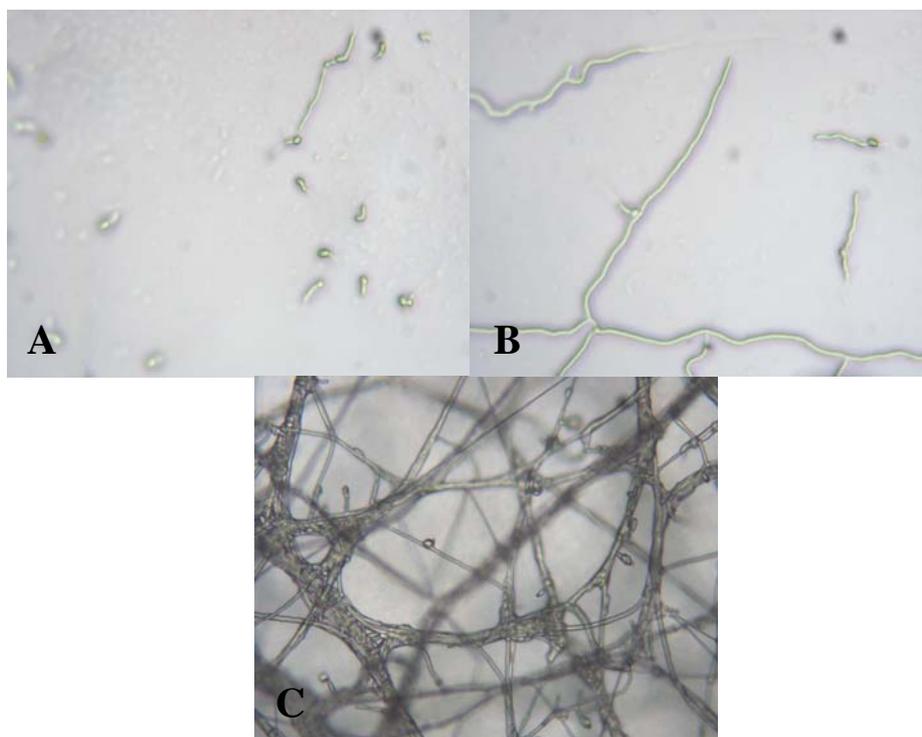


Figura 4 Teste de germinação *in vitro* de *Fusarium verticillioides* (Saccardo) Nirenberg. (A) Conídios após a inoculação. (B) Germinação dos conídios, após 24 horas de incubação. (C) Início do desenvolvimento da sua estrutura com 3 dias de incubação.

Alterações na concentração de esporos fúngicos foram observadas por Melo (2009), ao utilizar diferentes meios de cultura para o fungo *Corynespora cassiicola*, agente causal da mancha-alvo da soja. Assim, somente após a determinação do melhor substrato para a esporulação, o autor determinou o tempo de germinação dos esporos nesse mesmo substrato.

Por isso, a exemplo do trabalho desse autor, no presente estudo, as diferenças no tempo de germinação comparadas com a literatura se justificam em função da utilização de diferentes meios de cultura.

Durante a discussão dos resultados, houve grande dificuldade em encontrar trabalhos que determinassem o tempo de início da germinação de conídios das espécies fúngicas utilizadas no presente estudo, ou seja, os estudos avaliam somente a concentração de esporos por meio de períodos definidos para a leitura das análises.

3.3 Competição *in vitro* entre o gênero *Cladosporium* e os outros fungos

3.3.1 Competição *in vitro* entre *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries e *Aspergillus ochraceus* G. Wilh

Na figura 5, mostra-se a competição entre os fungos *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries e *Aspergillus ochraceus* G. Wilh.

Depois da inoculação dos conídios de ambos, no meio de cultura BDA (Figura 5A), observou-se que o fungo *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries não apresentou qualquer alteração de comportamento, pois, da mesma forma que no ensaio isoladamente, o fungo iniciou o processo de germinação dos conídios, após 17 horas (Figura 5B) e desenvolvimento completo da estrutura com 3 dias (Figura 5C).

Já, *Aspergillus ochraceus* G. Wilh não apresentou início da germinação dos conídios, à partir de 24 horas, como no ensaio isoladamente. O fungo germinou somente após 20 dias de competição (Figura 5D).

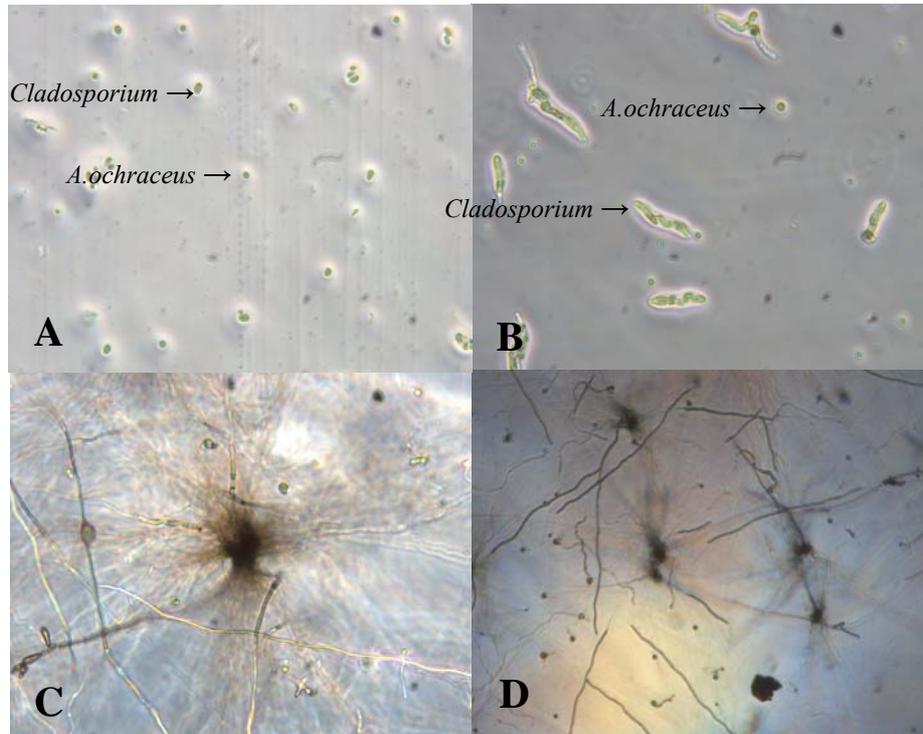


Figura 5 Competição *in vitro* entre *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries e *Aspergillus ochraceus* G. Wilh. (A) Conídios de ambos após a inoculação. (B) Germinação somente dos conídios de *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries, após 17 horas de incubação. (C) Estrutura de *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries já formada e ausência de crescimento de *Aspergillus ochraceus* G. Wilh após 3 dias de incubação. (D) Estrutura de *C. cladosporioides* (Fresen) de Vries já formada e início de crescimento de *Aspergillus ochraceus* G. Wilh após 20 dias de incubação.

3.3.2 Competição *in vitro* entre *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries e *Aspergillus niger* Tiegh

Na figura 6, está demonstrada a competição entre os fungos *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries e *Aspergillus niger* Tiegh.

Depois da inoculação dos conídios das duas espécies, juntamente no meio de cultura BDA (Figura 6A), percebeu-se que, após 48 horas, houve desenvolvimento somente de *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries, pois o fungo *Aspergillus niger* Tiegh não apresentou germinação dos conídios como isoladamente (Figura 6B). *Cladosporium* apresentou estrutura formada com 3 dias de incubação (Figura 6C). Aos 20 dias de teste, *Aspergillus niger* Tiegh, ainda não havia iniciado o processo de germinação de conídios (Figura 6D).

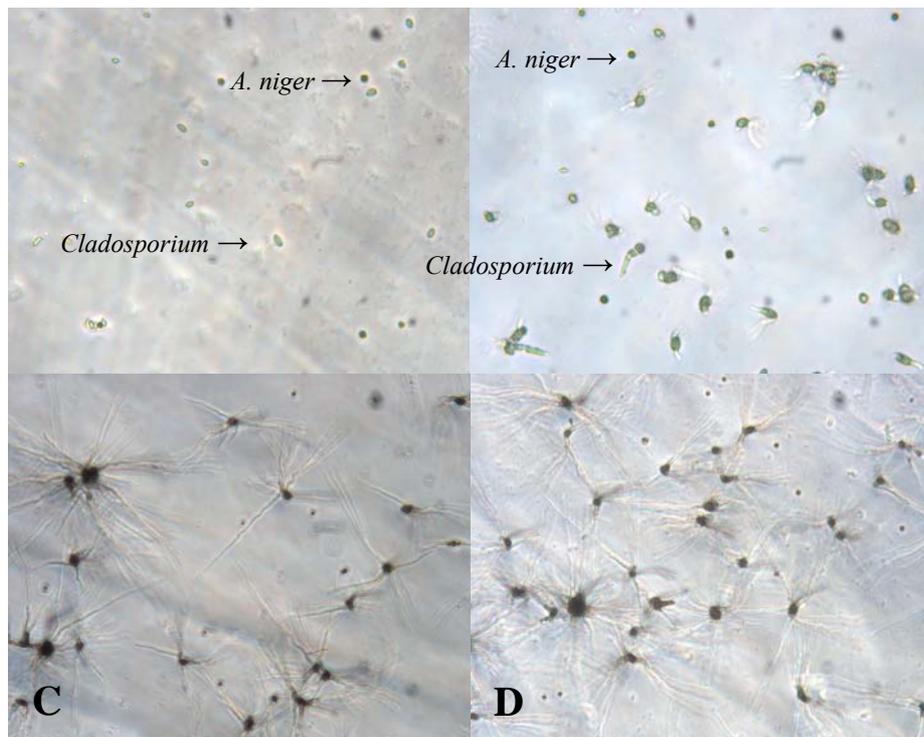


Figura 6 Competição *in vitro* entre *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries e *Aspergillus niger* Tiegh. (A) Conídios de ambos após a inoculação. (B) Germinação somente dos conídios de *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries, após 48 horas de incubação. (C) Estrutura de *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries já formada e ausência de crescimento de *Aspergillus niger* Tiegh, após 3 dias de incubação. (D) Estrutura de *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries já formada e ausência de crescimento de *Aspergillus niger* Tiegh após 20 dias de incubação.

3.3.3 Competição *in vitro* entre *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries e *Fusarium verticillioides* (Saccardo) Nirenberg

A competição *in vitro* entre *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries e *Fusarium verticillioides* (Saccardo) Nirenberg está exibida na figura 7.

Após a inoculação dos conídios de *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries e *Fusarium verticillioides* (Saccardo) Nirenberg (Figura 7A), pode-se observar que a exemplo do ocorrido para *Aspergillus ochraceus* G. Wilh e *Aspergillus niger* Tiegh, o desenvolvimento da estrutura do *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries também ocorreu com 3 dias de competição (Figura 7B) e o seu desenvolvimento inibiu totalmente a germinação do fungo *Fusarium verticillioides* (Saccardo) Nirenberg, até 20 dias de observação (Figura 7C).

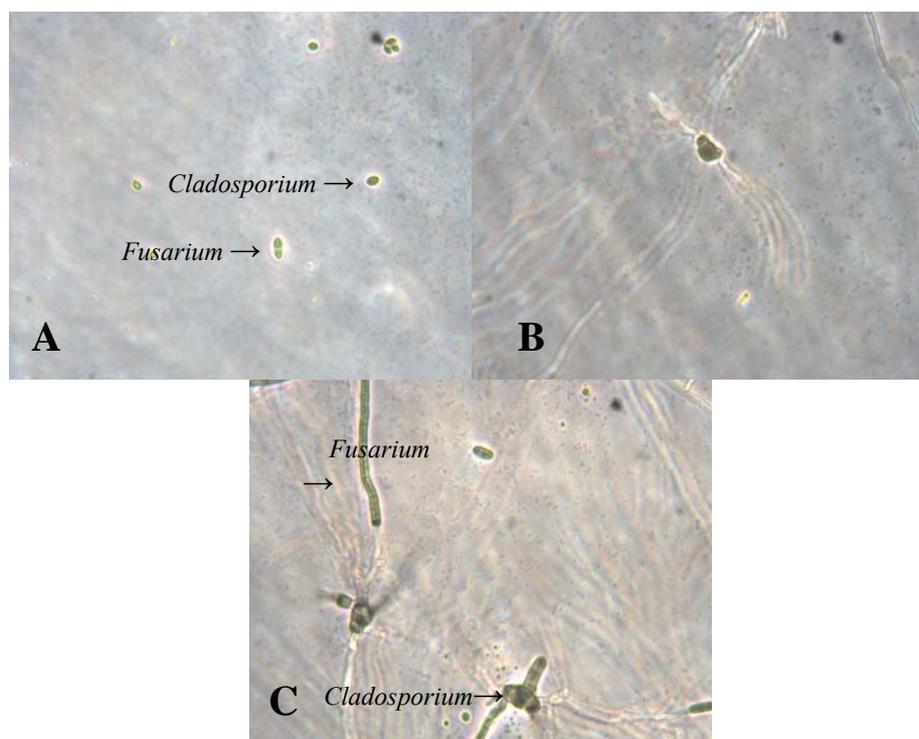


Figura 7 Competição *in vitro* entre *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries e *Fusarium verticillioides* (Saccardo) Nirenberg. (A) Conídios de ambos após a inoculação. (B) Germinação somente dos conídios de *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries, após 24 horas de incubação. (C) Estrutura de *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries já formada e ausência de germinação de *Fusarium verticillioides* (Saccardo) Nirenberg após 20 dias de incubação.

O maior tempo para o início da germinação dos esporos de *Aspergillus ochraceus* G. Wilh e o não desenvolvimento de *Aspergillus niger* Tiegh e *Fusarium verticillioides* (Saccardo) Nirenberg por até 20 dias de incubação é uma evidência da ação do fungo *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de

Vries como agente biológico para o controle de fungos maléficos para a cultura do café.

Moricca et al. (2001), utilizando teste de antagonismo in vitro, observou drástica redução na germinação de esporos de *Cronartium flaccidum* e *Peridermium pini* que são duas principais espécies de ferrugens que atacam pinus em toda a Europa por *Cladosporium tenuissimum*.

Sua ação de antibiose é decorrente da produção de um composto químico denominado cladosporol. Este composto foi primeiramente isolado por Sakagami et al. (1995), e é responsável pela inibição da síntese de β 1,3 glucano.

Estudos com cladosporol purificado demonstraram má formação de hifas de *Phytophthora capsici* (SAKAGAMI et al., 1995) e diminuição na germinação de esporos da ferrugem do feijão, *Uromyces appendiculatus* (NASINI et al., 2004).

Souza (2010), utilizando extratos de *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries obtidos por diferentes solventes, observou redução na germinação e esporulação dos fungos *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus niger*, *Fusarium sp.* e *Penicillium sp.*

Um grande problema enfrentado no controle de doenças na agricultura é a ocorrência de indivíduos resistentes aos produtos utilizados. Os patógenos que são controlados por fungicidas são considerados suscetíveis, enquanto aqueles que não são afetados ou pouco afetados pelo fungicida são considerados como naturalmente resistentes ou resistentes por herança (BRENT, 1995). Ainda de acordo com o autor, em algum momento, durante os anos de utilização comercial do fungicida, populações do patógeno-alvo que não são suficientemente suscetíveis para serem controladas adequadamente poderão se desenvolver. Essas populações geralmente aparecem como resposta à utilização

repetida do fungicida, ou ao uso repetido de outro fungicida que apresenta relação química e/ou relação com o mecanismo de ação antifúngica.

No caso do café, a utilização indiscriminada de defensivos químicos contribui para um maior desenvolvimento de fungos potencialmente toxigênicos e deletérios à qualidade da bebida do café, diminuindo consideravelmente a população natural de *Cladosporium* em algumas lavouras.

Nasini et al. (2004) afirmam que a persistência de agentes biológicos como habitantes de áreas endêmicas, onde doenças se desenvolvem destrutivamente, contribui de forma efetiva para a redução do fitopatógeno responsável, sendo, portanto, uma medida viável de controle, por isso, Chalfoun et al. (2007), alertam para a necessidade de utilização de fungicidas seletivos para o *Cladosporium*, pois o período de controle das principais doenças do cafeeiro coincide com a época de maior ocorrência do agente biológico em estudo.

3.4 Hiperparasitismo entre *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries e *Aspergillus ochraceus* G. Wilh

A figura 8 demonstra o hiperparasitismo exercido por *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries sobre *Aspergillus ochraceus* G. Wilh com 10 dias de competição *in vitro*.

Com 10 dias de competição *in vitro*, foi constatada a ação de hiperparasitismo de *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries sobre o fungo *Aspergillus ochraceus* G. Wilh.

Na figura 8A, pode-se observar que a estrutura do *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries está totalmente formada, enquanto os conídios de *Aspergillus ochraceus* G. Wilh não sofreram qualquer alteração, permanecendo com o formato circular e a textura lisa.

Na figura 8B, observa-se a diferença de tamanho e de textura entre o conídio do *Aspergillus ochraceus* G. Wilh, em contato com a hifa de *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries e o conídio sem contato com a hifa. No detalhe da figura 8C, é possível perceber melhor que a hifa do *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries promoveu murchamento do conídio do *Aspergillus ochraceus* G. Wilh.

A supressão de patógenos de diversas plantas no mundo todo é em razão da ocorrência de hiperparasitas de ocorrência natural (NASINI et al., 2004), sendo demonstrada formação de apressório e penetração no hospedeiro por meio de força mecânica (MORICCA et al., 2001) ou quebra enzimática (ASSANTE et al., 2004).

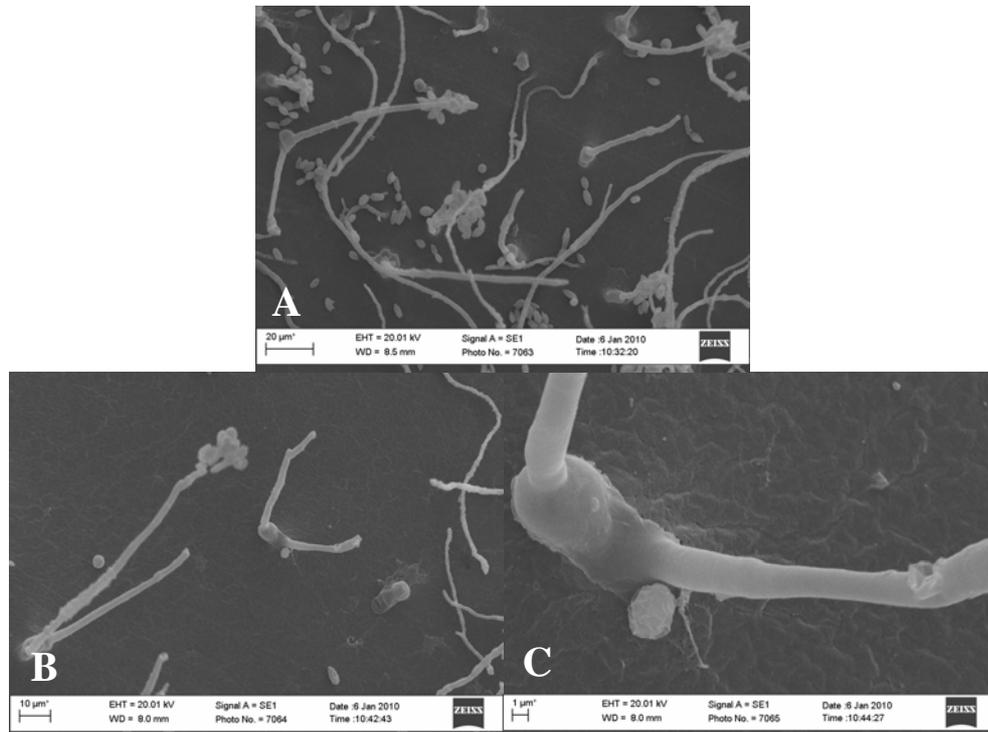


Figura 8 Hiperparasitismo *in vitro* entre *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries e *Aspergillus ochraceus* G. Wilh com 10 dias de competição. (A) Estrutura de *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries formada e conídios de *Aspergillus ochraceus* G. Wilh (B) Hiperparasitismo de *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries sobre conídio de *Aspergillus ochraceus* G. Wilh. (C) Detalhe do murchamento do conídio de *Aspergillus ochraceus* G. Wilh em razão do hiperparasitismo por *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries.

4 CONCLUSÕES

- *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries é capaz de se desenvolver normalmente, retardando o início da germinação dos conídios de *Aspergillus ochraceus* G. Wilh, por até 20 dias no teste de competição *in vitro*, pelo processo de antibiose. Da mesma forma, o fungo promove inibição na germinação dos conídios de *Aspergillus niger* Tiegh e *Fusarium verticillioides* (Saccardo) Nirenberg por período superior a 20 dias de observação.

- A hifa de *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries é capaz de hiperparasitar o conídio de *Aspergillus ochraceus* G. Wilh, alterando sua estrutura e textura.

- *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries pode ser considerado como um micro-organismo capaz de promover controle de fungos toxigênicos, naturalmente presentes na cultura do café, por meio dos parâmetros antibiose e hiperparasitismo (micoparasitismo necrotrófico).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora o presente trabalho tenha se desenvolvido à partir da observância da ação do fungo *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries sobre os fungos estudados em café, é importante ressaltar que os resultados obtidos são válidos para outras situações onde estiverem envolvidos o grupo de fungos deterioradores da qualidade e produtores de micotoxinas.

Esse fato amplia muito a possibilidade de sua produção em larga escala, uma vez que a limitação para a produção de biofungicidas é a sua especificidade em relação a determinados patossistemas.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, A. P. et al. Ochratoxin a in Brazilian instant coffee. **Brazilian Journal Microbiology**, São Paulo, v. 38, n. 2, p. 300-303, Sept. 2007.
- ALVES, E. **Introdução à microscopia eletrônica de varredura**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2004. 43 p.
- ASSANTE, G. et al. Hystological studies on the mycoparasitism of *Cladosporium tenuissimum* and urediniospores of *Uromyces appendiculatus*. **Mycology Research**, New York, v. 108, n. 2, p. 170-183, Apr. 2004.
- BATISTA, L. R. **Identificação, potencial toxigênico e produção de micotoxinas de fungos associados a grãos de café (*Coffea arabica* L.)**. 2000. 188 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000.
- BATISTA, L. R.; CHALFOUN, S. M. Incidência de ocratoxina A em diferentes frações do café (*Coffea arabica* L.): boia, mistura e varrição após secagem em terreiros de terra, asfalto e cimento. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 3, p. 804-813, maio/jun. 2007.
- BATISTA, L. R. et al. Toxigenic fungi associated with processed (green) coffee beans (*Coffea arabica* L.). **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 85, n. 3, p. 293-300, Aug. 2003.
- BETTIOL, W. **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA, 1991. 226 p.
- BOZZA, A. et al. Isolamento de fungos associados a grãos de café cv. Iapar 59 de origem de solo e árvore em diferentes tempos de colheita. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 3, p. 529-534, jul./set. 2009.
- BRENT, K. J. **Resistência a fungicidas em patógenos de plantas cultivadas: como manejá-la?** Bruxelas: Global Crop Protection Federation, 1995. 51 p.

CARVALHO, V. D. de; CHALFOUN, S. M.; CHAGAS, S. J. de R. Relação entre classificação do café pela bebida e composição físico-química, química e microflora do grão beneficiado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 15., 1989, Maringá. **Anais...** Rio de Janeiro: MEC/IBC, 1989. p. 25-26.

CHALFOUN, S. M. Biological control and bioactive microbial metabolites: a coffee quality perspective. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 5, p. 1071-1085, set./out. 2010.

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

CHALFOUN, S. M. et al. Seletividade de fungicidas cúpricos e sistêmicos sobre o fungo *Cladosporium cladosporioides* em cafeeiro. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, n. 1, p. 85-87, jan./mar. 2007.

FERNANDES, A. P. **Avaliação do potencial enzimático de fungos filamentosos isolados de diferentes fontes**. 2009. 58 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

FIGUEIRA, E. L. Z.; COELHO, E. Y. S. O.; HIROOKA, E. Y. Milho: riscos associados à contaminação por *Fusarium verticillioides* e fumonisinas: revisão. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 24, n. 2, p. 359-378, jul./dez. 2003.

FRIGO, S. M.; AZEVEDO, J. L. Meios de cultura e produção de conídios em *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin. **Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiróz"**, Piracicaba, v. 43, n. 1, p. 285-293, 1986.

KLICH, M. A. **Identification of common *Aspergillus* species**. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2002. 116 p.

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. **The *Fusarium* laboratory manual**. Manhattan: Blackwell, 2006. 388 p.

MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Controle biológico**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA, 1998. 262 p.

MELO, M. M. **Produção de esporos e inoculação de *Corynespora cassiicola* em soja**. 2009. 76 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2009.

MORICCA, S. et al. Antagonism of the two-needle pine stem rust fungi *Cronartium flaccidum* and *Peridermium pini* by *Cladosporium tenuissimum* *in vitro* and *in planta*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 91, p. 457-468, 2001.

NASINI, G. et al. Secondary mould metabolites of *Cladosporium tenuissimum*, a hyperparasite rust fungi. **Phytochemistry**, Saint Paul, v. 65, p. 2107-2111, 2004.

NELSON, P. E.; TOUSSOUN, T. A.; MARASSAS, W. F. O. ***Fusarium* species: an illustrated manual for identification**. University Park: Pennsylvania State University, 1983. 193 p.

PASIN, L. A. A. P.; ALMEIDA, J. R. de; ABREU, M. S. de. Fungos associados a grãos de cinco cultivares de café (*Coffea arabica* L.). **Acta Botanica Brasilica**, Porto Alegre, v. 23, n. 4, p. 1129-1132, jul./ago. 2009.

PEREIRA, R. T. G.; PFENNING, L. H.; CASTRO, H. A. Caracterização e dinâmica de colonização de *Cladosporium cladosporioides* (Fresen.) de Vries em frutos do cafeeiro (*Coffea arabica* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 6, p. 1112-1116, nov./dez. 2005.

PFENNING, L. H.; MARTINS, M. F. Espécies de *Fusarium* associadas ao cafeeiro na região sul de Minas Gerais. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 1., 2000, Poços de Caldas. **Resumos Expandidos...** Poços de Caldas: SBC, 2000. p. 283-286.

REMUSKA, A. C.; PRIA, M. D. Efeito de *Bacillus thuringiensis* e *Trichoderma* *sp.* no crescimento de fungos fitopatogênicos. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 13, n. 3, p. 31-36, 2007.

ROCHA, L. F. N. **Avaliação de fungicidas para isolamento *in vitro* de fungos patogênicos para invertebrados**. 2006. 46 p. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2006.

SAKAGAMI, Y. et al. Cladosporol, β -1,3-glucan biosynthesis inhibitor, isolated by the fungus *Cladosporium cladosporioides*. **Tetrahedron Letters**, London, v. 36, n. 31, p. 1469-1472, Jan. 1995.

SAMSON, R. A. et al. **Introduction to food-and airborne fungi**. 6th ed. Utrecht: Centraalbureau Voor Schimmelcultures, 2000. 387 p.

SILVA, C. F.; BATISTA, L. R.; SCHWAN, R. F. Incidence and distribution of filamentous during fermentation drying and storage of coffee (*Coffea arabica* L.) beans. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 39, n. 3, p. 238-240, July/Sept. 2008.

SOUZA, L. P. **Potencial antifúngico de extratos de *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries**. 2010. 110 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

TEMPE, J. The blotter method for seed health testing. **Copenhagen**, Copenhagen, v. 28, n. 1, p. 133-151, Jan. 1963.

VENÂNCIO, A.; PATERSON, R. The challenge of mycotoxins. In: MCELHATTON, A.; MARSHALL, R. J. (Ed.). **Food safety**. New York: Springer, 2007. p. 26-49.

VISOTTO, L. E. et al. Isolamento de fungos toxigênicos em grãos de café (*Coffea arabica* L.) e avaliação da produção *in vitro* de ocratoxina A. **Revista Brasileira de Armazenamento - Especial Café**, Viçosa, MG, n. 10, p. 49-57, 2008.

CAPÍTULO 3

**AGENTE BIOLÓGICO *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries
NO CONTROLE DE MICRO-ORGANISMOS ASSOCIADOS AO CAFÉ
(*Coffea arabica* L.)**

RESUMO

O fungo *Cladosporium cladosporioides* tem sido pesquisado como um agente biológico promissor em relação ao controle de micro-organismos deletérios à qualidade do café. A aplicação do produto a base desse agente biológico “Cladosporin” nos frutos pode promover a manutenção ou a melhoria da qualidade de cafés com histórico de problemas de bebida, principalmente em regiões com alta umidade relativa do ar. Nesse trabalho objetivou-se avaliar os principais micro-organismos fúngicos associados a frutos de café antes e após a aplicação do “Cladosporin” na pré-colheita em diferentes doses e épocas, além de observar a ocorrência e o desenvolvimento de *Cladosporium* e de micro-organismos deletérios à qualidade após sua aplicação. O produto “Cladosporin” foi aplicado em diferentes doses e épocas em frutos de café da cultivar Catuai Amarelo IAC 62 com 3 anos de idade, durante dois anos consecutivos em uma lavoura da Fazenda Santa Helena, no município de Alfenas – MG, localizada às margens da represa de Furnas. Os resultados demonstraram que a menor umidade relativa do ar e temperatura mais elevada favoreceram a maturação mais uniforme dos frutos e maior porcentagem de frutos colonizados por *Cladosporium* na época da colheita; a pulverização do “Cladosporin” no ano 1 promoveu aumento do inóculo na lavoura como constatado no ano 2; com relação aos estudos microbiológicos nos frutos de café após a pulverização, pode-se concluir que apenas uma aplicação, num intervalo de 60 dias antes da colheita na menor dose testada, é suficiente para que ocorra uma maior colonização de *Cladosporium* nos frutos e diminua consideravelmente a incidência de fungos potencialmente toxigênicos.

Palavras-chave: café, microbiota fúngica, bioproteção, sucessão de micro-organismos.

ABSTRACT

The fungus *Cladosporium cladosporioides* has been researched as a promising biological agent against organisms harmful to coffee quality. The application of a product based on this biological agent “Cladosporin” in coffee fruits can promote the maintenance or improvement the coffee quality with beverage problems, particularly in regions with high relative humidity. This study evaluated the fungi microorganisms associated at coffee fruits before and after applying the “Cladosporin” before harvest at different dosis and applications numbers, and observe the occurrence and development of *Cladosporium* and microorganisms harmful to quality after applying this product. The product “Cladosporin” was applied in different doses and times in coffee fruits Catuaí Yellow with 3 years for two consecutive years in a plantation of Santa Helena Farm in Alfenas - MG, located near of Furnas lake. The results showed that the lower humidity and higher temperature favored more uniform ripening of fruits and larger percentage of fruits colonized by *Cladosporium* at harvest time, the application of the product “Cladosporin” in the year 1 promoted an increase of inoculum of *Cladosporium* year 2; the microbiological studies in coffee fruits after “Cladosporin” product application, showed that only one application, within 60 days before fruit harvest, using the lowest dosis tested, is enough to better colonization of *Cladosporium* in coffee fruits and considerably decrease the incidence of potentially toxigenic fungi.

Key words: coffee, fungi microbiota, bioprotector, succession of microorganisms.

1 INTRODUÇÃO

O café é pago em função da sua qualidade, principalmente pelos países importadores bastante exigentes e, também, o aumento da concorrência na produção nacional, aliado a maior exigência quanto à qualidade da bebida pelo mercado interno são fatores a serem considerados como importantes impulsionadores na produção de bebidas com qualidade superior.

Um dos principais fatores que afetam a qualidade do café é a ocorrência de micro-organismos capazes de promoverem fermentações favoráveis ou desfavoráveis e as reações enzimáticas podem ser responsáveis pela obtenção de boa ou má qualidade da bebida (PIMENTA et al., 2008).

Os processos fermentativos indesejáveis podem ocorrer ainda na planta, iniciando-se a partir da maturação dos frutos, podendo comprometer a qualidade e a segurança do produto final.

O fungo do gênero *Cladosporium* tem sido pesquisado como um agente biológico promissor em relação ao controle dos micro-organismos deletérios à qualidade do café. Assim, a aplicação de um produto à base do agente biológico *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries nos frutos, pode promover a manutenção ou a melhoria da qualidade de cafés com histórico de problemas de bebida, principalmente em regiões com alta umidade relativa do ar (próximas a represas).

Cabe ressaltar que apesar do potencial positivo da utilização da modalidade de controle biológico, as doses e épocas de aplicação devem ser estabelecidas com precisão, uma vez que trata-se de uma estratégia na qual o agente de controle deve estar disponível em grande quantidade, sendo imprescindível a disponibilidade do produto microbiano nas épocas mais favoráveis à aplicação.

Por essa razão, neste trabalho objetivou-se avaliar os principais gêneros e seções fúngicas encontrados associados a frutos de café antes e após a aplicação do agente biológico *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries no produto “Cladosporin” na pré-colheita em diferentes doses e épocas; observar a ocorrência e o desenvolvimento do agente biológico *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries antes e após a aplicação do “Cladosporin” na pré-colheita e avaliar a incidência de micro-organismos deletérios à qualidade da bebida após a aplicação do produto “Cladosporin”.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Localização do ensaio e metodologia de coleta das amostras

O produto “Cladosporin” foi produzido no Centro de Análises Avançadas e Biotecnologia (CAAB/UFLA), localizado no CEPE-CAFÉ (Centro de Ensino, Pesquisa e Extensão do Agronegócio Café – UFLA), utilizando-se o agente biológico *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries, adquirido da micoteca do Laboratório de Microbiologia da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais – Centro Tecnológico do Sul de Minas - EPAMIG/URESM, localizado no campus da UFLA, onde também foram realizados os ensaios microbiológicos.

O presente estudo foi realizado em amostras de café da cultivar Catuaí Amarelo IAC 62, com 3 anos de idade, provenientes de duas colheitas consecutivas nos anos agrícolas 2009/2010 e 2010/2011.

A lavoura de café onde foram coletados os frutos está localizada na Fazenda Santa Helena, no município de Alfenas – MG, às margens da represa de Furnas, área mais susceptível a ocorrência e desenvolvimento de microorganismos causadores de processos fermentativos por ocasião da alta umidade relativa do ar. Essa fazenda foi escolhida porque em algumas áreas apresentava histórico de qualidade inferior de bebida.

As parcelas foram constituídas por 60 plantas sendo consideradas úteis às 50 plantas centrais e, no experimento, foram avaliadas diferentes doses e número de aplicações do “Cladosporin” na lavoura.

Os tratamentos foram os seguintes:

T1 – 1Kg do “Cladosporin”/ha numa única aplicação com cerca de 20% dos frutos no estágio cereja;

T2 – 1Kg do “Cladosporin”/ha com duas aplicações, sendo uma com cerca de 20% dos frutos no estágio cereja e a outra em torno de 50% de frutos cerejas nas plantas;

T3 – 1,5Kg do “Cladosporin”/ha numa única aplicação com cerca de 20% dos frutos no estágio cereja;

T4 – 1,5Kg do “Cladosporin”/ha com duas aplicações, sendo uma com cerca de 20% dos frutos no estágio cereja e a outra em torno de 50% de frutos cerejas nas plantas;

T5 – 2Kg do “Cladosporin”/ha numa única aplicação com cerca de 20% dos frutos no estágio cereja;

T6 – 2Kg do “Cladosporin”/ha com duas aplicações, sendo uma com cerca de 20% dos frutos no estágio cereja e a outra em torno de 50% de frutos cerejas nas plantas;

T7 – 2,5Kg do “Cladosporin”/ha numa única aplicação com cerca de 20% dos frutos no estágio cereja;

T8 – 2,5Kg do “Cladosporin”/ha com duas aplicações, sendo uma com cerca de 20% dos frutos no estágio cereja e a outra em torno de 50% de frutos cerejas nas plantas;

T9 – 3Kg do “Cladosporin”/ha numa única aplicação com cerca de 20% dos frutos no estágio cereja;

T10 – 3Kg do “Cladosporin”/ha com duas aplicações, sendo uma com cerca de 20% dos frutos no estágio cereja e a outra em torno de 50% dos frutos cerejas nas plantas;

T11 – Testemunha.

Cabe ressaltar que o “Cladosporin” é uma formulação em pó molhável contendo o fungo considerado agente bioprotetor da qualidade do café

Cladosporium cladosporioides (Fresen) de Vries sendo produto de patente entre a EPAMIG-FAPEMIG-UFLA.

2.2 Estádio de maturação dos frutos e porcentagem de colonização de *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries, após a aplicação do “Cladosporin” nos diferentes tratamentos

No momento da colheita no ano agrícola 2010/2011, foram retirados ao acaso 100 frutos em cada repetição de todos os tratamentos, para a determinação do número médio de frutos em cada estágio de maturação e também calcular a porcentagem de colonização por *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries nos mesmos.

2.3 Plaqueamento dos frutos

Durante a pesquisa foram realizadas coletas de amostras de frutos em cada tratamento para a determinação dos principais gêneros e seções fúngicas ocorridas.

No ano agrícola 2009/2010, foram realizadas 3 coletas assim divididas:

- 30 dias após a primeira aplicação;
- 60 dias após a primeira aplicação;
- 90 dias após a primeira aplicação e 30 dias após a segunda aplicação;

No ano agrícola 2010/2011, foram realizadas apenas duas coletas:

- 30 dias após a primeira aplicação;
- 60 dias após a primeira aplicação.

O plaqueamento dos frutos foi por meio do método de Blotter Test (TEMPE, 1963) sem desinfestação para a observação da microbiota total presente no exterior e interior dos frutos.

Foram utilizadas placas de Petri de 13 cm de diâmetro, contendo meio de cultura BDA (Batata, Dextrose e Ágar). Para cada tratamento, foram plaqueados 100 frutos divididos em 4 placas, sendo colocados 25 frutos por placa. Os resultados foram expressos em porcentagem de infestação.

Após esse procedimento, as placas de Petri contendo as amostras, foram incubadas em estufa do tipo Biochemistry Oxygen Demand (BOD) à temperatura de 25°C, com fotoperíodo de 12 horas por 10 dias. Passado o período de incubação, foi realizada a contagem dos principais gêneros fúngicos provenientes das amostras, com o auxílio de um microscópio estereoscópio Phoenix CP 608.

2.4 Índice de ocorrência (IO):

A ocorrência dos fungos foi estimada pelas notas (0, 1, 2 e 3), de acordo com a área ocupada no fruto por cada fungo e foi representada pela média ponderada das notas atribuídas a essa ocorrência. Para a determinação do IO, foi aplicada a equação desenvolvida por Mckinney (1923), sendo essa equação usualmente utilizada para o cálculo do índice de doenças em plantas.

$$IO = \frac{(f_0 \times n_0) + (f_1 \times n_1) + (f_2 \times n_2) + (f_3 \times n_3)}{F \times N} \times 100 \quad \text{em que:}$$

f_0, f_1, f_2 e f_3 = número respectivo de indivíduos em cada uma das notas.

$n_0 = 0$ (nota para ausência de fungos na região).

$n_1 = 1$ (nota para 1 a 30% da região ocupada por fungos).

$n_2 = 2$ (nota para 31 a 70% da região ocupada por fungos).

$N_3 = 3$ (nota para 71 a 100% da região ocupada por fungos).

$F = 100$ (número total de indivíduos).

$N = 3$ (nota máxima atribuível).

2.5 Análise Estatística

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados (DBC) com 11 tratamentos. Após a obtenção dos dados, os mesmos foram submetidos à análise de variância. Os dados foram transformados por raiz quadrada de $Y + 0.5 - \text{SQRT} (Y + 0.5)$ para atender ao requisito de distribuição normal.

Para a comparação das médias de cada fungo entre os diferentes tratamentos nos diferentes intervalos de plaqueamento dos frutos foi utilizado o teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

A análise estatística foi realizada, utilizando-se o programa SISVAR, segundo a metodologia proposta por (FERREIRA, 2000).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Estádio de maturação dos frutos e porcentagem de colonização de *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries, após a aplicação do “Cladosporin” nos diferentes tratamentos

A aplicação do “Cladosporin” em estádios iniciais de maturação não é indicada, pois de acordo com Pereira, Pfenning e Castro (2005), o fungo *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries é capaz de iniciar a colonização no fruto de café a partir do estágio cereja, fato também constatado na Tabela 1.

Tabela 1 Valores médios (%) dos diferentes estádios de maturação e colonização do *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries no momento da colheita do café antes e após a aplicação do “Cladosporin”. Ano Agrícola 2010/2011.

Trat.	(% de estágio de maturação e (% de colonização de <i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen) de Vries							
	Verde	Cladosp.	Cereja	Cladosp.	(%) col.	Seco	Cladosp.	(%) col.
T1	27,0	-	31,5	2,5	8,0	41,6	35,0	84,3
T2	30,0	-	33,5	8,5	25,4	36,5	32,5	89,0
T3	51,0	-	27,2	2,5	9,2	22,0	20,0	91,0
T4	26,0	-	33,2	6,0	18,1	40,7	32,7	80,4
T5	23,0	-	26,0	5,5	21,1	51,0	46,0	90,2
T6	33,5	-	35,5	4,7	13,2	31,0	26,7	86,3
T7	30,5	-	49,5	20,0	40,4	20,0	20,0	100
T8	32,0	-	45,7	11,2	24,5	22,2	20,0	90,0
T9	27,0	-	31,5	6,0	19,0	39,7	31,2	78,6
T10	28,0	-	35,0	7,5	21,4	37,0	28,5	77,0
T11	32,0	-	34,5	1,0	2,9	33,5	23,5	70,1

Apesar da primeira aplicação do “Cladosporin” nos diferentes tratamentos ter sido realizada com cerca de 20% dos frutos no estágio cereja (no mês de abril), conforme proposto, a segunda aplicação não pôde ser pulverizada depois de 30 dias, porque ainda havia em torno de 30% de frutos no estágio cereja, justificando a aplicação somente após 60 dias (mês de junho) em relação à primeira, quando havia cerca de 50% dos frutos nesse estágio, pois apesar do fungo colonizar rapidamente os frutos no estágio cereja, no mês de maio ainda havia significativa quantidade de frutos verdes na planta, assim, além do fungo não conseguir colonizar de forma eficiente, poderia ainda ser lavado do fruto por ocasião da ocorrência de chuvas frequentes nesse período (Figuras 1 e 2), pois a alta umidade relativa do ar e baixa temperatura retardam a maturação dos frutos.

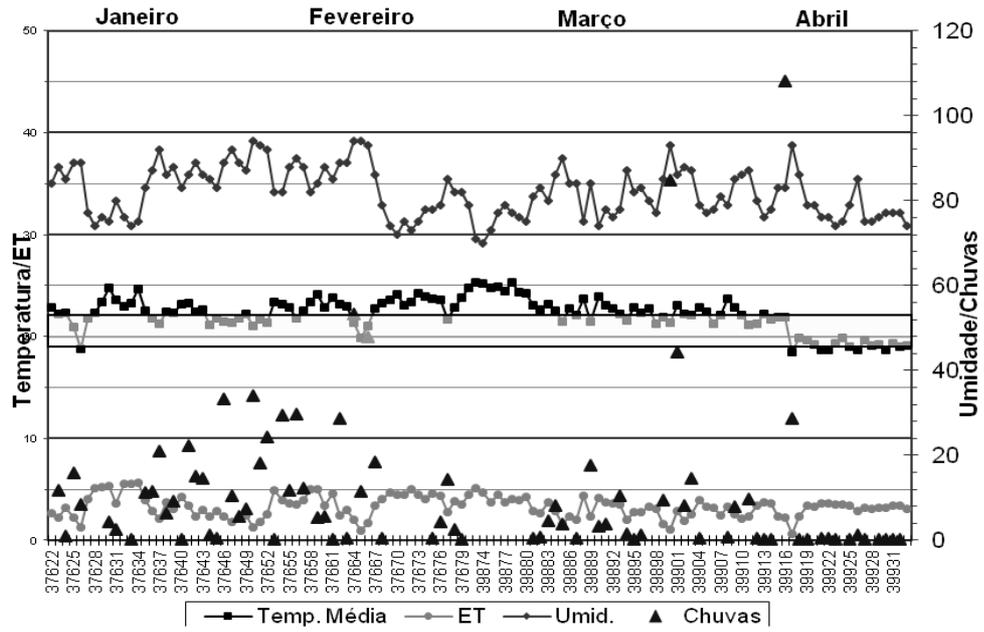


Figura 1 Dados climáticos da área experimental referentes aos meses de janeiro a abril do ano 1. Alfenas, 2011.

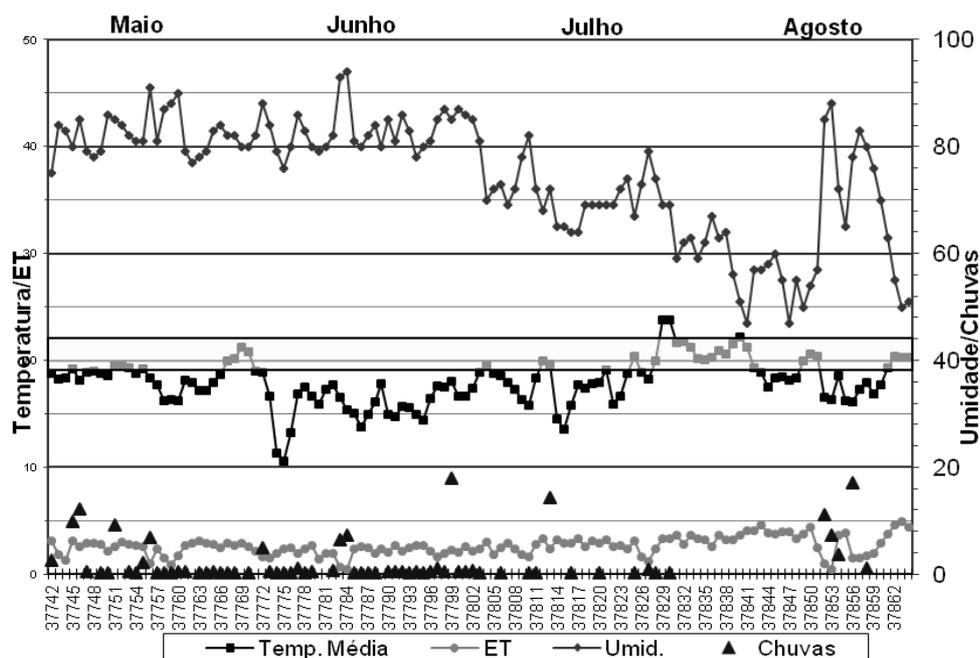


Figura 2 Dados climáticos da área experimental referentes aos meses de maio a agosto do ano 1. Alfenas, 2011.

Por isso no ano agrícola 2010/2011, a primeira aplicação do “Cladosporin” ocorreu mais tardiamente (mês de maio), em razão da preocupação em se aplicar o produto em um número maior de frutos no estágio cereja. Nessa época havia cerca de 35% de frutos nesse estágio e os tratamentos ocorreram normalmente, com a segunda aplicação após 30 dias (mês de junho) com cerca de 60% de frutos cereja. Aliado ao retardamento das pulverizações, o segundo ano foi mais seco, porém a alta umidade relativa do ar na região independe da ocorrência de chuvas em função da grande massa de água

representada pela represa de Furnas, sendo a temperatura na faixa ideal para o desenvolvimento de micro-organismos (Figuras 3 e 4). A menor ocorrência de chuvas no segundo ano contribuiu para o favorecimento das aplicações nas épocas previstas, pois favoreceu maior uniformidade na maturação dos frutos.

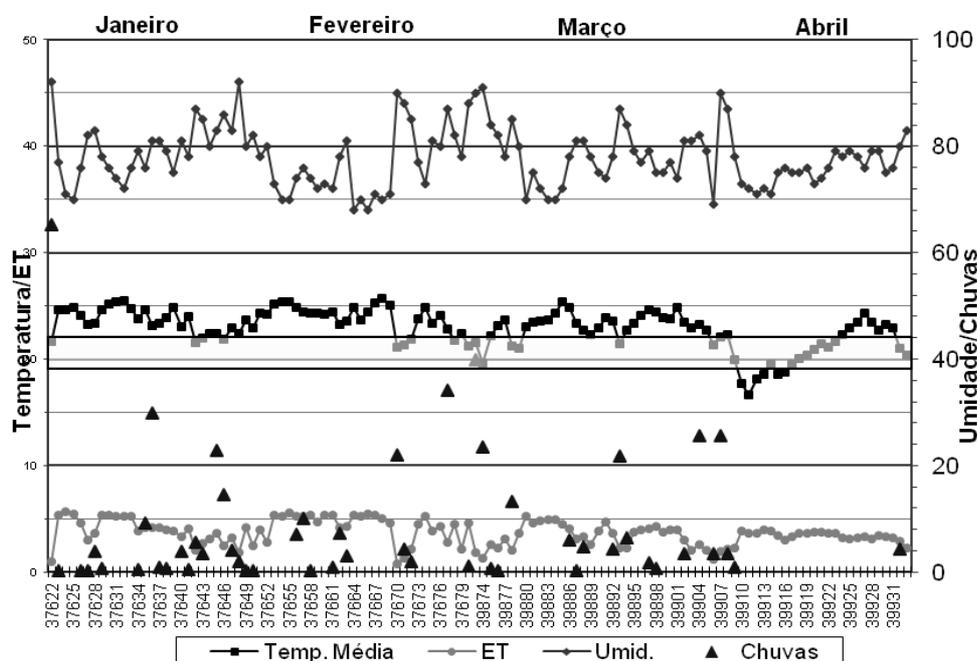


Figura 3 Dados climáticos da área experimental referentes aos meses de janeiro a abril do ano 2. Alfenas, 2011.

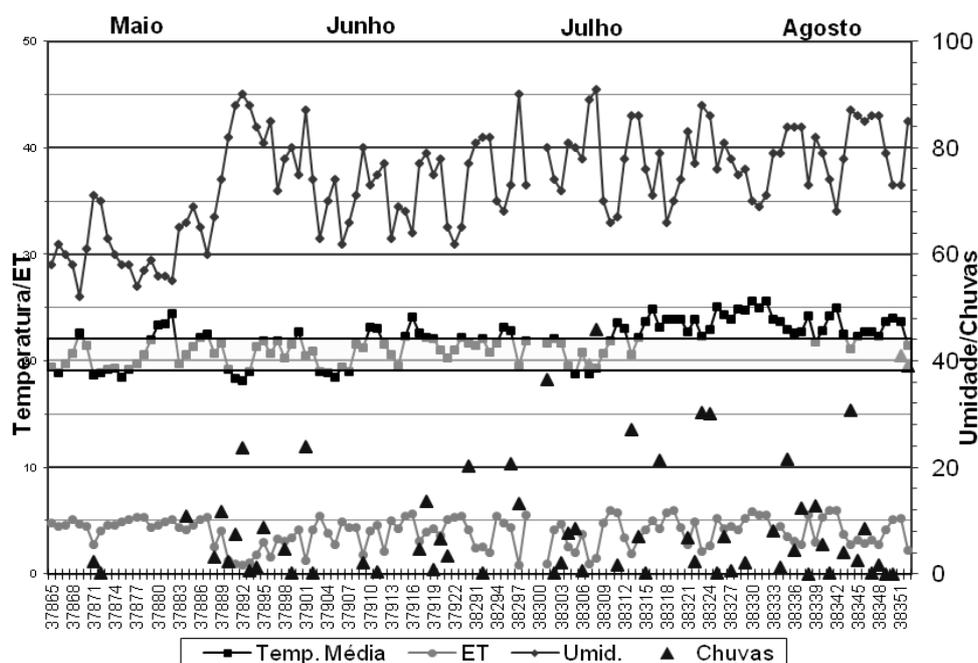


Figura 4 Dados climáticos da área experimental referentes aos meses de maio a agosto do ano 2. Alfenas, 2011.

Na época da colheita nos dois anos agrícolas estudados, em todos os tratamentos, foi constatado um número médio de frutos no estágio de maturação verde, bastante superior aos 5% recomendados, além da porcentagem baixa de frutos no estágio cereja e alta de frutos secos, porém, esses dados somente foram documentados no segundo ano (Tabela 1).

No tratamento T3, ocorreu um maior número de frutos no estágio de maturação verde. O estágio cereja ocorreu em número médio maior no tratamento T7 e o estágio seco, no T1. Diante dos resultados, pode-se inferir que o fungo *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries no produto

“Cladosporin”, não tem relação com a maturação dos frutos, pois a mesma diversidade determinada nos tratamentos também foi constatada na testemunha (T11).

Ainda com relação a diversidade nos valores nos estádios de maturação entre os diferentes tratamentos, foi observado que nessa região em decorrência da alta umidade, ocorrem inúmeras floradas, sendo inclusive visualizadas durante as aplicações do produto. Assim nessa lavoura, a maturação do café se torna bastante desuniforme e, ainda, ocorre o agravante dos frutos passarem rapidamente do estágio cereja para o estágio seco.

Também foi observado que em razão da localização da lavoura, uma parte fica exposta à radiação solar, enquanto a outra recebe pouca luminosidade durante o período de maturação o que pode interferir nas porcentagens.

Com relação à colonização dos frutos por *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries (Tabela 1), pode-se observar que no estágio verde, não ocorreu colonização alguma. Nos estádios cereja e seco, em todos os tratamentos houve presença do fungo em número superior a testemunha.

No estágio cereja, o maior número de frutos colonizados pelo fungo (T7) coincidiu com a maior porcentagem de colonização, o que não ocorreu no estágio seco. Nesse estágio, o maior número de frutos com *Cladosporium* foi no tratamento T1 e a maior porcentagem de colonização foi no tratamento T7 (100%). Porém, cabe ressaltar que todos os tratamentos foram eficazes na colonização do fungo, pois os valores considerados altos ficaram acima dos 77%. Até mesmo a testemunha apresentou um valor elevado para a colonização do *Cladosporium* nesse estágio (70%) indicando que, no segundo ano, o fungo já havia se espalhado em mais áreas da lavoura, pois a mesma foi obtida fora da área do experimento. Diante da observação da maior porcentagem de

colonização dos frutos no estágio seco, recomenda-se que os frutos de café nessa região sequem ou permaneçam o maior tempo possível na planta.

Ainda neste estágio foi observado que até o tratamento T7, houve aumento na porcentagem de colonização pelo *Cladosporium*, porém cabe observar que à medida que a dose do produto e o número de aplicações foram aumentados, houve diminuição na porcentagem de frutos infestados pelo fungo, provavelmente em razão da ocorrência de competição entre eles. De acordo com Horn (2005), normalmente os fatores ambientais e os aspectos fisiológicos das espécies ou isolados fúngicos influenciam a sua competição por espaço e nutrientes.

3.2 Plaqueamento dos frutos

No ano agrícola 2009/2010, foram realizadas três coletas de frutos para os estudos microbiológicos, porque na região, além das condições ambientais serem muito adversas, pela alta umidade relativa do ar, houve também ocorrência de chuvas contribuindo, dessa forma, para um retardamento na maturação dos frutos e, conseqüentemente, adiamento das aplicações do “Cladosporin”, ao contrário do ocorrido no ano agrícola 2010/2011, em que foram realizadas duas coletas dos frutos após as aplicações nas épocas previstas porque foi um ano mais seco (Tabela 1).

Os principais gêneros fúngicos associados a frutos de café produzido às margens de represa antes e após a aplicação do “Cladosporin” nos diferentes tratamentos nos dois anos consecutivos em que foi realizada a pesquisa, estão inseridos nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 2 Valores médios (%) do índice de ocorrência de fungos associados a frutos de café, antes e após a aplicação do “Cladosporin”. Ano Agrícola 2009/2010.

Tratamentos	Gênero/Seção					
	<i>Cladosp.</i>	<i>Fus.</i>	<i>Penic.</i>	<i>S. Nigri</i>	<i>S. Circ.</i>	Leved.
T0	2,7	62,5	1,5	0,3	-	20,7
30 dias após a 1ª aplicação*						
T1	2,30 b**	47,50 a	-	0,30 a	0,20 a	20,50 c
T2	2,10 b	26,80 b	-	0,20 a	-	41,00 b
T3	1,50 b	46,80 a	-	0,20 a	0,30 a	21,60 c
T4	2,60 b	41,30 a	-	-	-	41,70 b
T5	3,90 a	60,20 a	-	-	-	13,50 c
T6	1,20 b	48,20 a	-	-	-	53,60 a
T7	3,60 a	32,70 b	-	0,50 a	-	20,00 c
T8	1,60 b	41,00 a	-	-	-	28,50 b
T9	7,10 a	43,40 a	-	0,20 a	-	29,00 c
T10	4,30 a	30,00 b	-	-	-	64,10 a
T11	0,90 b	55,30 a	2,62 a	-	-	25,60c
CV (%)	33,21	17,00	8,44	23,73	11,96	12,73
60 dias após a 1ª aplicação*						
T1	6,30 a**	21,10 b	0,50 b	-	-	33,60 b
T2	6,30 a	17,60 b	-	-	-	31,30 b
T3	11,50 a	12,00 b	0,70 b	-	-	38,10 b
T4	4,20 a	9,50 c	0,80 b	-	-	38,00 b
T5	4,40 a	8,50 c	0,60 b	-	-	47,30 b
T6	7,40 a	11,80 b	1,20 b	-	-	68,50 a
T7	3,50 a	7,70 c	-	-	-	59,40 a
T8	4,50 a	7,20 c	-	-	-	54,00 a
T9	4,00 a	7,20 c	-	-	-	70,30 a
T10	4,00 a	9,80 c	0,30 b	-	-	79,30 a
T11	1,10 b	48,30 a	4,20 a	0,3 a	-	27,30 b
CV (%)	30,16	24,94	37,72	13,26	-	14,80

Tabela 2 Valores médios (%) do índice de ocorrência de fungos associados a frutos de café, antes e após a aplicação do “Cladosporin”. Ano Agrícola 2009/2010. (Continuação)

	90 dias após a 1ª aplicação e 30 dias após a 2ª aplicação*					
T1	16,00b**	24,80 b	10,30 b	-	-	4,60 b
T2	15,00 b	30,10 b	15,80 b	-	-	7,50 b
T3	23,20 a	25,70 b	11,50 b	-	-	8,30 b
T4	24,40 a	25,10 b	12,00 b	-	-	9,30 b
T5	24,50 a	22,50 b	12,60 b	-	-	21,20 a
T6	26,20 a	21,80 b	10,20 b	-	-	15,30 a
T7	25,60 a	28,20 b	13,50 b	-	-	6,70 b
T8	25,40 a	26,20 b	12,20 b	-	-	18,50 a
T9	33,00 a	28,60 b	19,80 b	-	-	14,30 a
T10	35,30 a	15,00 b	11,60 b	-	-	20,50 a
T11	12,00 b	50,80 a	27,10 a	-	-	6,50 b
CV (%)	19,29	16,83	18,99	-	-	26,85

* Médias com a mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

** Dados transformados em raiz quadrada ($X + 0,5$).

Tabela 3 Valores médios (%) do índice de ocorrência de fungos associados a frutos de café, antes e após a aplicação do “Cladosporin”. Ano Agrícola 2010/2011.

Tratamentos	Gênero/Seção					
	<i>Cladosp.</i>	<i>Fus.</i>	<i>Penic.</i>	<i>S. Nigri</i>	<i>S. Circ.</i>	Leved.
T0	10,2	24,8	-	1,32	-	37,2
30 dias após a 1ª aplicação*						
T1	14,60a**	12,00 b	1,00 b	-	0,30 a	32,60 b
T2	6,30 b	12,30 b	0,30 b	-	-	56,70 a
T3	1,80 b	3,30 b	-	-	-	11,30 c
T4	5,60 b	10,70 b	2,00 a	-	-	43,80 a
T5	13,20 a	10,40 b	-	-	-	32,00 b
T6	7,10 b	11,50 b	-	-	-	48,70 a
T7	7,00 b	14,00 b	0,70 b	-	-	40,00 a
T8	9,70 a	8,30 b	-	-	-	55,70 a
T9	10,90 a	7,30 b	-	-	-	61,20 a
T10	17,00 a	23,30 a	-	-	-	58,60 a
T11	2,60 b	22,00 a	-	1,00 a	-	61,30 a
CV (%)	33,03	23,78	26,15	43,96	43,96	15,12
60 dias após a 1ª aplicação e 30 dias após a 2ª aplicação*						
T1	36,70a**	9,70 b	-	-	-	27,70 a
T2	38,10 a	4,30 b	-	-	-	47,20 a
T3	21,70 a	7,30 b	-	-	-	39,60 a
T4	31,10 a	4,70 b	-	-	-	48,30 a
T5	49,70 a	5,00 b	-	-	-	54,60 a
T6	23,60 a	8,70 b	-	-	-	38,30 a
T7	33,30 a	9,30 b	-	-	-	44,70 a
T8	27,50 a	6,30 b	-	-	-	51,30 a
T9	35,20 a	8,10 b	-	-	-	45,70 a
T10	33,50 a	7,30 b	-	-	-	48,30 a
T11	14,10 b	30,0 a	-	-	-	35,30 a
CV (%)	24,45	31,65	-	-	-	13,21

*Médias com a mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

** Dados transformados em raiz quadrada ($X + 0,5$).

3.1.1 *Fusarium sp.*

No primeiro ano do experimento (Tabela 2), o número médio do índice de ocorrência (IO) de *Fusarium sp.* na área da lavoura era alto (62,5%).

Após 30 dias de aplicação do “Cladosporin” (Tabelas 2 e 2A), pode-se observar que houve queda no índice de ocorrência de *Fusarium sp.* nos frutos em todos os tratamentos, com relação ao tempo 0, indicando que o produto já estava agindo. Os tratamentos diferiram significativamente, sendo demonstrado que T2, T7 e T10 apresentaram menores valores médios de infestação, pois a quantidade de frutos infestados por *Fusarium* foi menor. Tal fato pode ser decorrente da localização das parcelas onde o solo poderia conter intensidades diferentes de infestação por *Fusarium*, além de haver, ainda nessa época, um maior número de frutos no estágio verde/verde cana, pois os tratamentos T1 e T2, T7 e T8 e ainda T9 e T10 receberam as mesmas doses do “Cladosporin”. Ainda pode-se observar que após esse período, a maioria dos valores médios nos diferentes tratamentos não diferiram da testemunha.

Depois de 60 dias de aplicação, os resultados médios apresentados foram bem mais satisfatórios (Tabelas 2 e 8A), pois nesse intervalo, o produto foi capaz de proporcionar uma maior redução nos valores médios de IO do *Fusarium* em todos os tratamentos que diferiram entre si, com maior valor médio de frutos infestados por *Fusarium* na testemunha. Pode-se observar ainda que essa redução ocorreu a partir do tratamento 4. Tais resultados indicam que o agente biológico inserido no produto colonizou de forma efetiva os frutos durante esse intervalo entre aplicações.

No plaqueamento dos frutos após 90 dias da primeira aplicação do produto e 30 dias após a segunda pulverização ocorreram valores médios

intermediários de IO de *Fusarium* em todos os tratamentos em relação aos resultados das aplicações anteriores (Tabelas 2 e 13A). Esse aumento pode ter sido promovido por algum tipo de competição entre os indivíduos, ou ainda, a ocorrência de chuvas nesse período (Figura 1) pode ter “lavado” grande parte do *Cladosporium* colonizado nos frutos pulverizados, já que, no produto, não é utilizado nenhum tipo de espalhante. Para essa época, a diferença significativa ocorreu entre a testemunha e os demais tratamentos, que não diferiram entre si.

No segundo ano de experimento (Tabela 3), o valor médio do IO de *Fusarium sp.* foi menor (24,8%) em relação ao primeiro ano no tempo 0. Essa diminuição indica que o inóculo de *Cladosporium* permaneceu na lavoura de um ano para o outro, provavelmente no solo, pois esse fungo está largamente disseminado no ar e na matéria orgânica (OLIVEIRA et al., 2004).

Passados 30 dias após a primeira aplicação (Tabelas 3 e 17A), pode-se observar que até o T9 não houve diferença significativa entre os tratamentos que diferiram somente entre T10 e T11.

Após 60 dias da primeira aplicação e após 30 dias da segunda aplicação, não houve diferença significativa entre os tratamentos com diferentes doses e épocas de aplicação (Tabelas 3 e 23A). A diferença ocorreu somente em relação à testemunha que apresentou maior valor do IO de *Fusarium*, indicando que no segundo ano de aplicação houve aumento do inóculo de *Cladosporium* na lavoura, pois os valores de frutos infestados foram uniformes e pode ser também em razão de esse segundo ano ter sido mais seco nas épocas de aplicação (Figura 2), o que favoreceu uma maior uniformização da maturação dos frutos e assim permitiu que o *Cladosporium* inserido no “Cladosporin” fosse capaz de colonizar um número maior de frutos.

Deve-se ressaltar que nos dois anos de estudo e na maioria dos tratamentos, o IO foi inferior às testemunhas localizadas fora da área experimental, mas que também apresentaram valores inferiores ao tempo zero (T0). Diante dessa observação, pode-se inferir que o fungo *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries presente no “Cladosporin”, é capaz de migrar para outras áreas da lavoura.

Além de afetar a qualidade, o gênero *Fusarium* também é considerado como potencial produtor de micotoxinas para o café (BATISTA et al., 2003).

No presente estudo, constatou-se a ocorrência desse gênero em todos os tratamentos nos dois anos de experimento, e foi observada uma grande redução na sua infestação por ocasião das pulverizações com “Cladosporin”, por isso, deve-se manejar o controle das principais doenças com os fungicidas sistêmicos, pois a aplicação maciça deles pode promover resistência de patógenos como o *Fusarium* e exterminar os agentes biológicos de ocorrência natural como o *Cladosporium*. Assim, sugere-se a integração da aplicação dos fungicidas sintéticos com o produto biológico “Cladosporin”.

Com os resultados, foi demonstrada a eficiência do “Cladosporin” na redução do desenvolvimento do *Fusarium* nos frutos já, à partir do primeiro ano, com resultados semelhantes no segundo. Os estudos apontam que a menor dose do produto, em apenas 1 aplicação, foi capaz de diminuir o inóculo desse fungo nos frutos.

3.1.2 Fungos toxigênicos do gênero *Penicillium* e Seções *Circumdati* e *Nigri*

No primeiro ano de aplicação do “Cladosporin” (Tabela 2), foi observada uma baixa ocorrência de *Penicillium sp.* (1,5%) e *Seção Nigri* (0,3%) e nenhuma ocorrência da *Seção Circumdati* no tempo 0.

Após 30 dias da primeira aplicação do produto (Tabelas 2 e 3A), foi detectada a presença de *Penicillium sp.*, somente na testemunha. A *Seção Nigri* ocorreu em poucos tratamentos não diferindo, porém, em número muito baixo de IO (Tabelas 2 e 5A). A presença da *Seção Circumdati* foi observada somente em T1 e T3 em valores muito baixos (Tabelas 2 e 4A).

Depois de 60 dias da primeira aplicação, *Penicillium sp.* ocorreu em alguns tratamentos que não diferiram entre si, mas diferiram da testemunha (Tabelas 2 e 9A). Esse resultado indica que como para o *Fusarium*, o “Cladosporin” não é capaz de inibir totalmente o desenvolvimento de *Penicillium sp.* Provavelmente, os frutos já haviam sido colonizados interiormente pelo fungo. A *Seção Nigri* ocorreu somente na testemunha (Tabelas 2 e 10A) e a *Seção Circumdati* não apresentou desenvolvimento (Tabela 2).

Após 90 dias da primeira aplicação e passados 30 dias após a segunda, foi observado um aumento no IO de *Penicillium sp.* na área, inclusive na testemunha (Tabelas 2 e 14A). À exemplo do ocorrido para *Fusarium*, esse aumento pode ter sido promovido pela competição entre os indivíduos e também pela ocorrência de chuvas nesse período (Figura 1) que pode ter “lavado” grande parte do *Cladosporium* colonizado nos frutos pulverizados, porque na aplicação do produto não é utilizado nenhum tipo de material espalhante. Apesar do desenvolvimento desse fungo em todos os tratamentos, pode-se observar que

houve eficiência na aplicação do “Cladosporin”, pois os valores do IO foram menores nos tratamentos com diferentes doses e aplicações em relação à testemunha. As Seções *Nigri* e *Circumdati* não ocorreram nesse período (Tabela 2).

No segundo ano do experimento (Tabela 3), no tempo 0, ocorreu somente Seção *Nigri* em porcentagem muito baixa (1,32%).

Após 30 dias da primeira aplicação do “Cladosporin”, o fungo *Penicillium sp.*, ocorreu em alguns tratamentos isolados diferindo entre eles (Tabelas 3 e 18A) e o T4 foi considerado como pior tratamento. A Seção *Circumdati* se desenvolveu somente na menor aplicação em um número médio muito baixo (Tabelas 3 e 19A) e a Seção *Nigri* ocorreu apenas na testemunha (Tabelas 2 e 20A).

Mesmo com o índice de ocorrência desses fungos muito baixo, a presença deles pode ser motivo de preocupação, pois de acordo com Chalfoun e Batista (2003), estão inseridos no gênero *Penicillium* e nas Seções *Nigri* e *Circumdati* algumas espécies produtoras de ocratoxina A (OTA), micotoxina esta mais importante para o café e, mesmo não parecendo ser um substrato ideal para a produção de OTA, a presença destes fungos é um fator de risco, pois condições favoráveis de temperatura e umidade podem favorecer a produção desta toxina (TANIWAKI; IAMANAKA; VICENTINI, 2000).

Depois de 60 dias da primeira aplicação e após 30 dias da segunda (Tabela 3), não houve desenvolvimento de nenhum desses fungos potencialmente toxigênicos, inclusive na testemunha.

Apesar do “Cladosporin” ter contribuído para a diminuição dos fungos potencialmente toxigênicos no ano 1 e desaparecimento no ano 2, deve-se ressaltar que a manutenção do agente biológico *Cladosporium* na lavoura deve

ser constante, uma vez que se deve prevenir o desenvolvimento dos fungos e produção de metabólitos prejudiciais à qualidade sensorial e segurança do produto final.

3.1.3 Leveduras

No primeiro ano (Tabela 2), no tempo 0, a ocorrência de leveduras já era evidente (20,7%).

Após 30 dias da primeira aplicação (Tabelas 2 e 6A), houve desenvolvimento de leveduras em todos os tratamentos que diferiram entre eles, porém não apresentando tendência definida de variação.

Após 60 dias da primeira aplicação (Tabelas 2 e 11A), também foi observada a presença em todos os tratamentos, mas com uma infestação maior de frutos em relação ao intervalo anterior. Essa maior ocorrência pode ser atribuída a um maior número de frutos no estágio cereja, pois as leveduras utilizam diversos açúcares em seu processo metabólico por meio de anaerobiose e por processos respiratório e oxidativo, resultando, principalmente, em etanol e gás carbônico como os principais produtos finais de sua atividade fermentativa (BEUX; SOCCOL, 2004). Houve diferenças entre os tratamentos e inclusive foi observado que ocorreu maior número de frutos infestados nas maiores doses.

Após 90 dias da primeira aplicação e após 30 dias da segunda (Tabelas 2 e 15A), o número de frutos infestados diminuiu bastante em função do avanço na maturação deles, passando do estágio cereja para o passa/seco ocorrendo diminuição da mucilagem. Nesse intervalo, os tratamentos diferiram estatisticamente entre si, sendo as maiores doses, as que proporcionaram o maior número de frutos com leveduras.

Pode-se observar ainda que em todos os intervalos de aplicação, o número de frutos infestados por leveduras nos tratamentos foi bastante superior às respectivas testemunhas. Esse fato pode ser atribuído ao “Cladosporin” que contém um tipo de açúcar na sua formulação e que pode ter favorecido o desenvolvimento dessa levedura.

No segundo ano (Tabelas 3 e 21A), nas duas aplicações, as leveduras ocorreram em todos os tratamentos e nas testemunhas geralmente em número mais uniforme de infestação nos frutos. Nota-se, também, que além da uniformidade, houve também maior número de frutos infestados, provavelmente decorrentes das aplicações terem ocorrido mais tardiamente com a presença de mais frutos cereja na área experimental.

No intervalo de 30 dias da primeira aplicação (Tabelas 3 e 21A), ocorreram diferenças entre os tratamentos, sendo que os maiores valores médios de IO de leveduras ocorreram nas maiores doses a partir de T6, que não diferiram da testemunha.

Após 60 dias da primeira aplicação e 30 dias da segunda (Tabelas 3 e 24A), todos os tratamentos se igualaram, não apresentando diferenças entre eles, nem mesmo com a testemunha.

Esse fato demonstra que o *Cladosporium* inserido no produto não é capaz de competir com a levedura, retardando ou inibindo seu desenvolvimento, e, assim, não afetando a sua população. Foi observado durante os estudos microbiológicos que parece haver uma associação entre o *Cladosporium* e a levedura, pois a partir do estágio de maturação cereja, quando o fruto inicia o processo de secagem, ocorre o desaparecimento das leveduras e tem início o desenvolvimento normalmente do *Cladosporium*, por isso, estudos relacionados a essa levedura são sugeridos.

A presença de leveduras no café tem sido atribuída a fatores benéficos, pois estudos apontam para o seu potencial de *Pichia sp.* e *Debaryomyces sp.* na inibição do desenvolvimento de fungos filamentosos (RAMOS et al., 2010).

3.1.4 *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries

No primeiro ano (Tabela 2), observa-se que o inóculo de *Cladosporium* na lavoura estava baixo (2,7%).

Depois de 30 dias da primeira pulverização do “Cladosporin” (Tabelas 2 e 1A), pode-se constatar que houve diferença significativa entre os tratamentos, porém todos apresentaram valores muito baixos de IO para esse fungo. Provavelmente, pode ser em razão de o estágio de maturação ainda não ser propício ao seu desenvolvimento, além dos frutos ainda poderem apresentar resíduos de fungicidas sintéticos aplicados anteriormente. Nesse intervalo, os melhores resultados foram apresentados nos tratamentos T5, T7, T9 e T10.

No intervalo de 60 dias após a primeira aplicação (Tabelas 2 e 7A), os valores médios para o IO de *Cladosporium* nos frutos no geral apresentaram um leve aumento. Além do avanço na maturação dos frutos, o efeito residual dos fungicidas pode ter contribuído para a obtenção desses valores. Chalfoun et al. (2007) destacam a importância da utilização de fungicidas seletivos, visando à preservação desse micro-organismo, considerado agente antagonista de fungos deletérios à qualidade do café, já que sua ocorrência em frutos de cafeeiro é freqüente e coincide com o período de controle de doenças na cultura. Nesse período, não houve diferença significativa entre os tratamentos que receberam diferentes doses em diferentes épocas de aplicação, porém, diferiram com relação à testemunha, que apresentou valor inferior para o IO.

Após 90 dias da primeira aplicação e 30 dias da segunda (Tabelas 2 e 12A), de acordo com a análise estatística pode-se observar que T1, T2 e T11 foram os piores tratamentos, enquanto os demais não diferiram. Houve aumento em todos os valores médios para o IO, podendo ser por causa do aumento no número de frutos secando na planta.

No segundo ano do experimento, após 30 dias da primeira aplicação do “Cladosporin” (Tabelas 3 e 16A) houve diferenças significativas entre os valores médios do IO do *Cladosporium* nos frutos entre os diferentes tratamentos, sendo considerados T1, T5, T8, T9 e T10 os mais eficientes. Observa-se que, para este ano, nesse intervalo, os valores médios foram superiores aos do mesmo período no primeiro ano, salientando que o objetivo de aumentar o inóculo de *Cladosporium* na lavoura foi alcançado.

Após 60 dias da primeira aplicação e 30 dias da segunda (Tabelas 3 e 22A), a diferença foi observada somente entre a testemunha (T11) e os demais tratamentos que não diferiram entre si. Esses resultados são semelhantes aos do mesmo período no ano 1, quando ocorreu somente uma aplicação do produto.

3.2 Sucessão de micro-organismos

Diante dos resultados apresentados no presente estudo, o número médio de IO da sucessão dos principais gêneros fúngicos ocorridos em cada período nos tratamentos com aplicação do “Cladosporin” foi a seguinte:

- Ano 1:

30 dias após a primeira aplicação: *Fusarium sp.*, Leveduras, *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries, *Seção Nigri* e *Seção Circumdati*.

60 dias após a primeira aplicação: Leveduras, *Fusarium sp.*, *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries e *Penicillium sp.*

90 dias após a primeira aplicação: *Fusarium sp.*, *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries, *Penicillium sp.* e Leveduras.

- Ano 2:

30 dias: Leveduras, *Fusarium sp.*, *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries e *Penicillium sp.*

60 dias após a primeira aplicação: *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries, Leveduras, *Fusarium sp.*, e *Penicillium sp.*

4 CONCLUSÕES

- Os principais fungos encontrados associados aos frutos de café antes e após a aplicação do “Cladosporin” são *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus Seção Nigri*, *Aspergillus Seção Circumdati* e Leveduras.
- A aplicação do produto “Cladosporin” favorece a ocorrência e o desenvolvimento do fungo bioprotetor da qualidade *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries.
- A aplicação do “Cladosporin” diminui a incidência de fungos deletérios à qualidade da bebida.
- Menor umidade relativa do ar e temperatura mais elevada favorecem a maturação mais uniforme dos frutos e maior porcentagem de frutos colonizados por *Cladosporium* na época da colheita.
- A pulverização do “Cladosporin”, no ano 1, promove aumento do inóculo do fungo *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries na lavoura como constatado no ano 2.
- Com relação aos estudos microbiológicos nos frutos de café, após a pulverização do produto “Cladosporin”, pode-se concluir que apenas uma aplicação, num intervalo de 60 dias antes da colheita dos frutos, utilizando-se a menor dose testada, é suficiente para que ocorra uma maior colonização de *Cladosporium* nos frutos e diminua consideravelmente a incidência de fungos

potencialmente toxigênicos dos gêneros *Fusarium* e *Penicillium* e das Seções *Circumdati* e *Nigri*.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos resultados, recomenda-se que o produto seja aplicado sempre após o monitoramento do fungo na área, visando a controlar o desenvolvimento dos fungos deletérios à qualidade e a segurança do café por meio da recomposição do agente antagonista estudado.

O produto biológico “Cladosporin”, obtido a partir do fungo *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries, pode auxiliar na recomposição do micro-organismo já que o sistema atual na cafeicultura é um sistema artificial com ação reducionista e constante do fungo em algumas áreas.

REFERÊNCIAS

BATISTA, L. R. et al. Toxigenic fungi associated with processed (green) coffee beans (*Coffea arabica* L.). **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 85, n. 3, p. 293-300, Aug. 2003.

BEUX, M. R.; SOCCOL, C. R. Microbiota isolada durante as fases de pré e pós colheita dos grãos de café associada a qualidade e sanidade da bebida. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 22, p. 155-172, 2004.

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

CHALFOUN, S. M. et al. Seletividade de fungicidas cúpricos e sistêmicos sobre o fungo *Cladosporium cladosporioides* em cafeeiro. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, n. 1, p. 85-87, jan./mar. 2007.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do SISVAR para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 2000. p. 255-258.

HORN, B. W. Colonization of wounded peanut seeds by soil fungi: selectivity for species from *Aspergillus* section Flavi. **Mycologia**, New York, v. 97, n. 5, p. 202-217, Mar. 2005.

MCKINNEY, H. H. Influence of soil, temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. **Journal of Agricultural Research**, Washington, v. 26, p. 195-217, 1923.

OLIVEIRA, J. S. et al. Distribuição do fungo *Cladosporium cladosporioides* em regiões produtoras de café na Bahia. **Bahia Agrícola**, Salvador, v. 6, n. 3, p. 72-75, nov. 2004.

PEREIRA, R. T. G.; PFENNING, L. H.; CASTRO, H. A. Caracterização e dinâmica de colonização de *Cladosporium cladosporioides* (Fresen.) de Vries em frutos do cafeeiro (*Coffea arabica* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 6, p. 1112-1116, nov./dez. 2005.

PIMENTA, C. J. et al. Avaliação físico-química e de qualidade do café (*Coffea arabica* L.) submetido a diferentes tempos de espera para secagem. **Revista Brasileira de Armazenamento - Especial Café**, Viçosa, MG, n. 10, p. 36-41, 2008.

RAMOS, D. M. B. et al. Inibição in vitro de fungos toxigênicos por *Pichia sp.* e *Debaryomyces sp.* isoladas de frutos de café (*Coffea arabica* L.). **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 32, n. 3, p. 74-79, 2010.

TANIWAKI, M. H.; IAMANAKA, B. T.; VICENTINI, M. C. Fungos produtores de ocratoxina e ocratoxina A em cafés brasileiros. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DE CAFÉS DO BRASIL, 1., 2000, Poços de Caldas. **Resumos Expandidos...** Brasília: EMBRAPA-Café; MINASPLAN, 2002. p. 720-722.

TEMPE, J. The blotter method for seed health testing. **Copenhagen**, Copenhagen, v. 28, n. 1, p. 133-151, Jan. 1963.

CAPÍTULO 4

VIABILIDADE DO AGENTE BIOLÓGICO BIOPROTETOR DA QUALIDADE DO CAFÉ *Cladosporium Cladosporioides* (Fresen) de Vries NO PRODUTO “Cladosporin” EM DIFERENTES TEMPERATURAS DE ARMAZENAMENTO

RESUMO

O produto à base do agente bioprotetor da qualidade do café *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries é uma alternativa promissora para a aplicação nos frutos de café ainda na lavoura por se tratar de um produto biológico, contendo um micro-organismo com características GRAS (General Regarded as Safe) e com reconhecida ação deletéria sobre fungos prejudiciais à qualidade do produto final. Conduziu-se este estudo com o objetivo de avaliar a viabilidade do micro-organismo no produto “Cladosporin” em diferentes temperaturas de armazenamento. O agente biológico utilizado foi o *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries, pertencente à micoteca da EPAMIG/URESM. Após o crescimento do fungo no meio de cultura BDA, foram inoculados discos contendo seu micélio em um substrato propício ao seu desenvolvimento. Depois de um período de aproximadamente 15 dias, ocorreu o desenvolvimento do agente biológico em todo o substrato. Posteriormente, a formulação foi seca em estufa com circulação de ar, triturada e armazenada em embalagem hermeticamente fechada. Após a fabricação do produto foram realizados testes “*in vitro*”, visando a obter o tempo de viabilidade do agente biológico em três diferentes temperaturas de armazenamento: ambiente (25°C), refrigeração (7°C) e congelamento (-6°C). Os testes utilizados foram crescimento micelial e esporulação. Os resultados apontam que o crescimento micelial e a esporulação do *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries no “Cladosporin” foram afetados pelas três temperaturas de armazenamento estudadas, sendo a viabilidade do fungo bastante reduzida aos 60 dias, quando o produto foi armazenado na temperatura ambiente. Refrigeração e congelamento foram as melhores temperaturas para a manutenção da viabilidade do fungo por um período maior de tempo.

Palavras-chave: café, formulação pó, produto biológico, micro-organismo GRAS.

ABSTRACT

A biological agent *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries product is a promising alternative for the application in coffee fruits because it is a product containing a biological organism with characteristics GRAS (General Regarded as Safe) and with recognized deleterious action about fungi that are deleterious to the final product quality. This study was conducted to evaluate the viability of microorganism in the product "Cladosporin" at different storage temperatures. The biological agent used was *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries, obtained of mycology collection EPAMIG / URESM. After growing of the fungus in PDA culture medium were inoculated disks containing mycelium in specific substrate to their development. After a period of approximately 15 days, there was the development of the biological agent in all substrate. After, the formulation was dried in an oven with circulating air, grounded and stored in closed package. After were realized "in vitro" tests to obtain the biological agent viability in three different storage temperatures: ambient (between 25°C), refrigerator (between 7°C) and freezer (between -6°C). The tests were growing mycelial and sporulation. The results showed that the growing mycelial and sporulation of *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries in "Cladosporin" formulation were affected by the three storage temperatures studied, and the viability of the fungus significantly reduced to 60 days when the product was stored at a temperature environment. Refrigerator and freezer temperatures were the best for maintaining the viability of the fungus for a longer period of time.

Key words: coffee, powder formulation, biological product, GRAS microorganism.

1 INTRODUÇÃO

Na agricultura sustentável, bastante discutida ultimamente, é muito importante que haja diminuição na utilização de agroquímicos. Uma das alternativas seria a aplicação de agentes bioprotetores nas lavouras visando a diminuir riscos aos trabalhadores e ao meio ambiente.

Na cultura do café, a ocorrência de micro-organismos prejudiciais capazes de promover processos fermentativos indesejáveis nos frutos ainda na planta, principalmente em regiões onde a cultura está margeada por água, afeta a qualidade por causar alterações e comprometer a segurança da bebida. Porém, a presença do fungo do gênero *Cladosporium* na lavoura é considerada benéfica, pois foi constatado que sua ocorrência coincidia com cafés classificados com padrões melhores de bebida. Estudos identificaram a espécie fúngica *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries como sendo o agente bioprotetor da qualidade do café.

Os micro-organismos prejudiciais à qualidade, muitas vezes se tornam resistentes aos principais agroquímicos utilizados, sendo necessária a integração entre os produtos sintéticos e biológicos e, por isso, destaca-se a importância da utilização de fungicidas seletivos, visando à preservação do *Cladosporium*, já que a sua ocorrência coincide com a época de controle das principais doenças.

Um produto a base do agente biológico *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries seria uma alternativa promissora para a aplicação nos frutos ainda na lavoura por se tratar de um produto biológico contendo um micro-organismo com características GRAS (General Regarded as Safe) e, ainda, considerado benéfico para a cultura do café.

Diante do exposto, neste estudo objetivou-se avaliar o efeito de diferentes temperaturas sobre a viabilidade do fungo *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries no produto “Cladosporin”.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O produto à base do agente biológico *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries, denominado “Cladosporin” foi fabricado no Centro de Análises Avançadas e Biotecnologia (CAAB/UFLA), localizado no CEPE-CAFÉ (Centro de Ensino, Pesquisa e Extensão do Agronegócio Café – UFLA) de acordo com a metodologia descrita a seguir:

2.1 Obtenção, multiplicação e utilização do agente biológico *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries

O agente biológico utilizado foi o *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries, pertencente à micoteca da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gérias (EPAMIG/URESM). O inóculo foi selecionado pela avaliação de diversos isolados da mesma espécie, por apresentar maior desenvolvimento micelial e maior concentração de esporos, por meio de testes de medição do micélio em meio de cultura BDA e contagem de esporos em Câmara de Neubauer realizados no Laboratório de Microbiologia da mesma instituição.

O agente biológico foi reproduzido em grande escala no (CAAB/UFLA) com repicagens, sendo mantido sob condições controladas em Placas de Petri de 15cm de diâmetro, contendo meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar) na temperatura de 22°C e fotoperíodo de 12 horas, por cerca de 10 dias, para a utilização no produto.

Após o crescimento do fungo no meio de cultura BDA, foram inoculados discos contendo seu micélio em um substrato propício ao seu desenvolvimento. Esse substrato foi previamente autoclavado na temperatura de 120°C por 30 minutos. Depois de um período de aproximadamente 15 dias,

ocorreu o desenvolvimento do agente biológico em todo o substrato (Figura 1). Posteriormente, a formulação foi seca em estufa com circulação de ar, triturada e armazenada em embalagem hermeticamente fechada para o início dos testes de viabilidade.

Cabe ressaltar que o “Cladosporin” é uma formulação em pó molhável, contendo o fungo considerado agente bioprotetor da qualidade do café *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries, sendo produto de patente entre a EPAMIG-FAPEMIG-UFLA.



Figura 1 Agente biológico *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries, após 15 dias de desenvolvimento no substrato.

2.2 Avaliação da viabilidade do agente biológico *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries no produto “Cladosporin”

Após a fabricação do produto foram realizados testes “*in vitro*”, visando a obter o tempo de viabilidade do agente biológico em três diferentes

temperaturas de armazenamento: ambiente (25°C), refrigeração (7°C) e congelamento (-6 °C). As análises foram realizadas no CAAB/UFLA e no Laboratório de Fitopatologia e Microbiologia do EcoCentro/EPAMIG-URESM.

No dia da produção do “Cladosporin” (tempo 0), foi repicado com o auxílio de palitos de madeira, frações do produto em placas de Petri de 9cm, contendo meio de cultura BDA. Da mesma forma, foi repetido esse procedimento, periodicamente, de 15 em 15 dias, até a observação da perda de viabilidade do micro-organismo na formulação.

A concentração de esporos inicial no produto foi de $2,2 \times 10^8$.

A viabilidade foi avaliada pela medição do diâmetro micelial (cm) e contagem de esporos em Câmara de Neubauer, 15 dias após cada plaqueamento sendo as placas armazenadas em BOD na temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 horas.

2.3 Análise Estatística

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC) em parcelas subdivididas no tempo, com 9 repetições para o crescimento micelial e 9 repetições para a avaliação da esporulação. Os tratamentos das parcelas foram as temperaturas de armazenamento (ambiente, geladeira e freezer) e as subparcelas foram os números de avaliações, ou seja, 12 observações.

Os dados foram avaliados com a utilização do pacote estatístico SISVAR (FERREIRA, 2000), onde a variável quantitativa (tempo) foi analisada pelo teste de regressão e a variável qualitativa (local de armazenamento) foi analisada por meio do teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Avaliação do crescimento micelial e esporulação do agente biológico *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries no produto “Cladosporin” em diferentes temperaturas de armazenamento.

Analisando a variável diâmetro das colônias dentro de cada temperatura, entre os tratamentos, houve diferença significativa demonstrada pelo teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade (Tabelas 1 e 26A).

Até 60 dias, não ocorreram diferenças nos valores do diâmetro micelial do fungo entre as três temperaturas avaliadas. A partir de 75 dias de armazenamento, a temperatura ambiente proporcionou valor de crescimento micelial inferior a refrigeração e ao congelamento, que não diferiram significativamente entre si até o final do período de estocagem avaliado. Aos 150 dias de armazenamento, cessou o crescimento fúngico na temperatura ambiente. O pico de crescimento micelial para as três temperaturas ocorreu aos 45 dias.

Ethur, Nicolini e Blume (2008), avaliando uma formulação em pó à base de *Trichoderma virens* também encontraram maior viabilidade do agente biológico estudado quando o produto foi armazenado na temperatura de refrigeração, em relação ao armazenamento em temperatura ambiente. Eles também detectaram o não crescimento das colônias de forma repentina, porém somente aos 14 meses de avaliação, um período bem superior ao do presente estudo.

Tabela 1 Crescimento micelial *in vitro* de *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries no produto “Cladosporin” em diferentes temperaturas de armazenamento. Lavras, MG, 2012.

Tempo de armazenamento (dias)	Temperaturas de Armazenamento		
	Ambiente	Refrigeração	Congelamento
0	4,53 a*	4,53 a	4,53 a
15	4,83 a	4,42 a	4,37 a
30	4,28 a	3,80 a	3,90 a
45	4,48 a	4,70 a	4,60 a
60	4,36 a	4,33 a	3,80 a
75	0,79 b	2,84 a	2,90 a
90	0,58 b	3,26 a	3,38 a
105	1,12 b	3,98 a	4,05 a
120	1,03 b	3,92 a	3,70 a
135	1,08 b	3,20 a	2,78 a
150	0,00 b	2,57 a	2,58 a
165	0,00 b	2,08 a	1,92 a
CV %			29,58
CV %			27,50

* Médias com a mesma letra na linha não diferem entre si de acordo com o teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

De acordo com o teste de regressão (Figura 2), foi possível observar que na temperatura ambiente, o crescimento micelial se manteve por um intervalo menor de tempo em relação aos outros tratamentos, sendo constatada uma diminuição nos valores aos 75 dias de armazenamento e ausência de crescimento a partir de 150 dias (Figura 3A). Para refrigeração (Figura 3B) e congelamento (Figura 3C), o crescimento das colônias apresentou comportamento semelhante entre os dois, ocorrendo redução gradativa nos valores dos diâmetros miceliais até a última medição realizada.

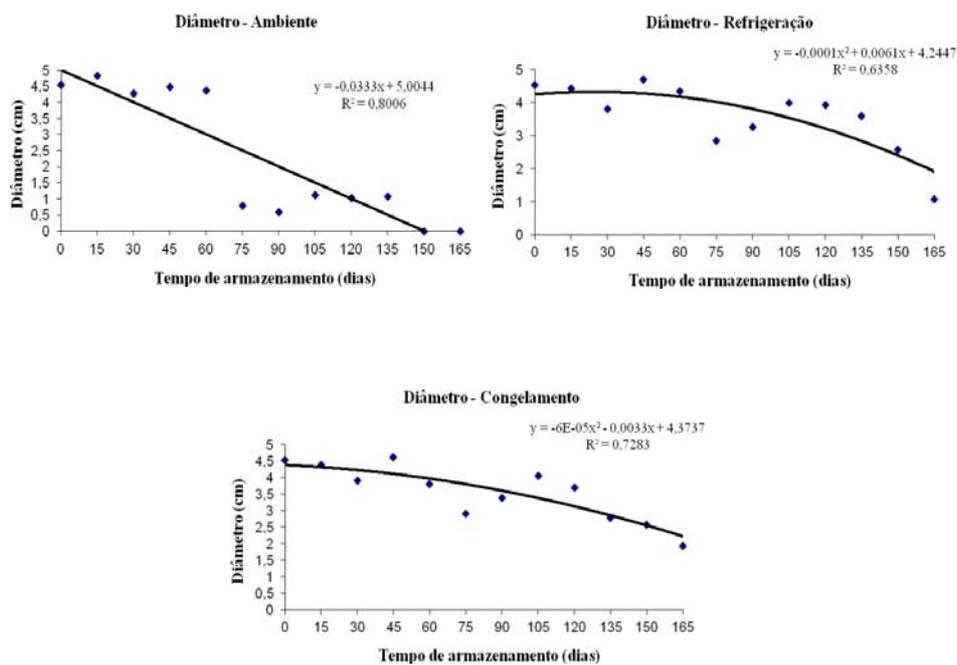


Figura 2 Crescimento micelial *in vitro* de *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries no produto “Cladosporin”, em diferentes temperaturas de armazenamento. Lavras, MG, 2012.



Figura 3 Desenvolvimento *in vitro* de *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries no produto “Cladosporin”. (A) Temperatura ambiente com 0, 75 e 150 dias; (B) temperatura de refrigeração com 0 e 150 dias e (C) temperatura de congelamento com 0 e 150 dias. Lavras, MG, 2012.

Entre os tratamentos, de acordo com o teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade (Tabelas 2 e 27A), até 45 dias de estocagem, não houve variação definida para esporulação entre as diferentes temperaturas. Com 60 dias, o valor da esporulação na temperatura ambiente e na temperatura de refrigeração foi inferior quando comparado ao congelamento. A partir de 75 dias, não houve mais esporulação na temperatura ambiente e nas temperaturas de refrigeração e congelamento não houve diferenças significativas até 120 dias. No último tempo analisado, todas as temperaturas não foram capazes de promover a viabilidade dos esporos do fungo no produto, pois não houve esporulação.

Por meio dos resultados, pode-se perceber que, com a continuação do crescimento micelial, mesmo que de forma reduzida, houve perda total da viabilidade dos esporos a partir de 75 dias na temperatura ambiente, 150 dias na temperatura de refrigeração e 165 dias na temperatura de congelamento. De acordo com Nozaki, Camargo e Barreto (2004), nem sempre as condições que favorecem o desenvolvimento fúngico são as mesmas condições para a esporulação, pois, alguns meios de cultura são mais favoráveis para a

esporulação de fungos que outros. Ainda, segundo Masangkay et al. (2000), a necessidade de luz para o crescimento e esporulação de fungos é muito variável, até mesmo entre isolados da mesma espécie E, por isso, a necessidade de estudos futuros visando a avaliar a influência de diferentes tipos de embalagens para o acondicionamento do produto sobre a viabilidade do fungo.

Tabela 2 Esporulação *in vitro* de *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries no produto “Cladosporin” em diferentes temperaturas de armazenamento. Lavras, MG, 2012.

Tempo de armazenamento (dias)	Temperaturas de Armazenamento		
	Ambiente	Refrigeração	Congelamento
0	8,1 x 10 ⁶ a*	8,1 x 10 ⁶ a	8,1 x 10 ⁶ a
15	1,15 x 10 ⁷ a	1,32 x 10 ⁷ a	1,3 x 10 ⁷ a
30	1,18 x 10 ⁷ a	1,32 x 10 ⁷ a	6,9 x 10 ⁶ b
45	1,18 x 10 ⁷ a	5,03 x 10 ⁶ b	5,4 x 10 ⁶ b
60	2,22 x 10 ⁶ b	3 x 10 ⁶ b	5,6 x 10 ⁶ a
75	0,00 b	1,1 x 10 ⁶ a	1,03 x 10 ⁶ a
90	0,00 b	2,3 x 10 ⁶ a	2,6 x 10 ⁶ a
105	0,00 b	3,4 x 10 ⁶ a	4,4 x 10 ⁶ a
120	0,00 b	2,15 x 10 ⁶ a	1,2 x 10 ⁶ a
135	0,00 b	2,14 x 10 ⁶ a	9,1 x 10 ⁵ b
150	0,00 a	0,00 a	3,35 x 10 ⁵ a
165	0,00 a	0,00 a	0,00 a
CV %			26,37
CV %			37,30

* Médias com a mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Os resultados do teste de regressão (Figura 4), demonstraram que assim como para o crescimento micelial, a temperatura ambiente não promoveu condições favoráveis para a esporulação do fungo, pois aos 75 dias de armazenamento não ocorreu mais esporos viáveis no produto. Assim como no

diâmetro micelial (Figura 1 e Tabela 1), o melhor período para o favorecimento da esporulação foi aos 45 dias com grande diminuição no valor aos 60 dias.

Refrigeração e congelamento foram as temperaturas mais eficientes na manutenção dos esporos, sendo os mesmos viáveis até 135 dias na temperatura de refrigeração e 150 dias na temperatura de congelamento, porém com diminuições nos valores com o aumento do período de armazenamento, sendo o pico constatado nas duas temperaturas somente com 15 dias de armazenamento.

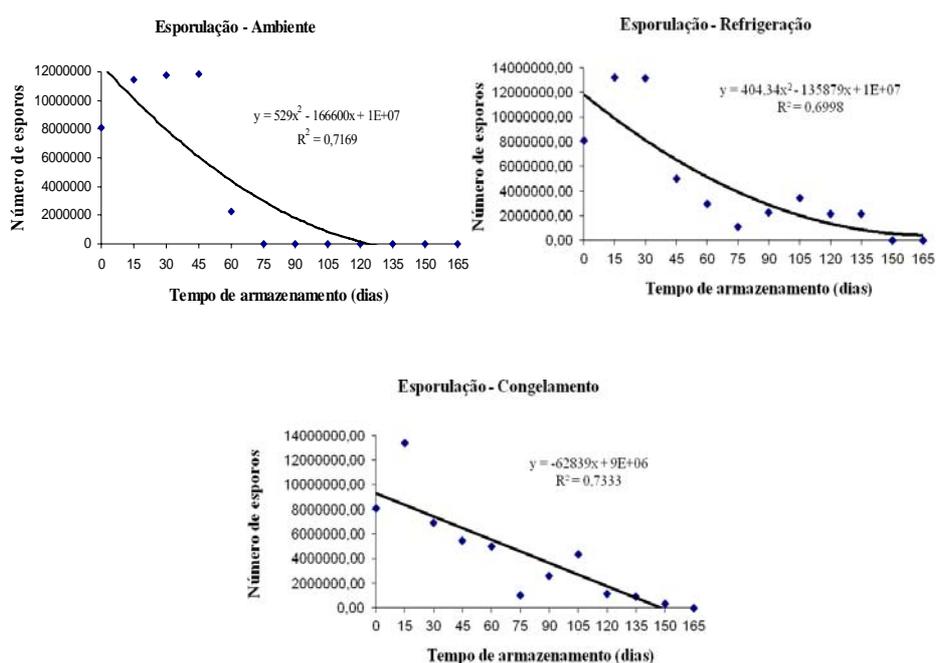


Figura 4 Esporulação *in vitro* de *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries no produto “Cladosporin” em diferentes temperaturas de armazenamento. Lavras, MG, 2012.

Assim, no presente estudo, fica constatado que para a formulação pó do “Cladosporin”, a temperatura ambiente foi a que menos favoreceu o crescimento micelial e a esporulação do fungo *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries no produto, apesar das condições ideais para o bom funcionamento metabólico, tais como: ótimo desenvolvimento micelial e capacidade de propagar descendentes serem na temperatura mínima de -4°C e a temperatura ótima de 22°C (SAUTOUR et al., 2002).

As temperaturas inferiores ao ponto ótimo para o crescimento diminuem o ritmo metabólico. Nas temperaturas baixas os micro-organismos apresentam uma capacidade típica de sobrevivência em face do frio. Quando mantidos em temperaturas de congelamento ou mesmo inferiores podem ser considerados dormentes, não efetuando atividade metabólica aparente (PELCZAR JUNIOR; CHAN; KRIEG, 1996). A redução na atividade de água, aliada à aplicação de baixas temperaturas torna o metabolismo lento e possibilita a viabilidade das células microbianas por longos períodos (GIROTTO et al., 2008), justificando os maiores valores das variáveis estudadas nas temperaturas de refrigeração e congelamento. Dessa forma, o acondicionamento nas temperaturas de refrigeração ou congelamento poderia tornar o processo mais oneroso em se tratando de uma possível produção em larga escala, pois precisaria de locais aclimatizados para o acondicionamento, além de maior gasto de energia.

Tavares (2011) utilizou dois métodos de secagem para o “Cladosporin” (liofilização e estufa) e testou diversas formulações visando a aumentar a vida de prateleira do produto, porém, também encontrou drástica redução na esporulação de *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries a partir de 60 dias de armazenamento. O autor atribuiu que o ganho de umidade ocorrido no

produto durante a estocagem em embalagens plásticas foi o responsável pelo baixo período de viabilidade do fungo.

Outra formulação foi testada por Elizei (2009) por meio da imobilização das células fúngicas. A autora, estudando a viabilidade de *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries em grânulos com alginato de sódio, também encontrou menor viabilidade na temperatura ambiente em relação a geladeira e freezer, mas a perda total da viabilidade ocorreu somente aos 225 dias de avaliação, sendo essa formulação capaz de manter por muito mais tempo as características do fungo em relação a formulação pó analisada.

4 CONCLUSÕES

- O crescimento micelial e a esporulação de *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries na formulação do “Cladosporin” são afetados pela temperatura de armazenamento.
- A viabilidade do fungo é reduzida aos 60 dias e cessada aos 75 dias, quando o produto é armazenado na temperatura ambiente.
- As temperaturas de refrigeração e congelamento são melhores para a manutenção do fungo no produto, porém com redução na viabilidade com o aumento do período de armazenamento.

REFERÊNCIAS

ELIZEI, V. G. **Avaliação da viabilidade de fungos encapsulados e armazenados em diferentes temperaturas**. 2009. 50 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade federal de Lavras, Lavras, 2009.

ETHUR, L. Z.; NICOLINI, C.; BLUME, E. Viabilidade de formulação em pó de *Trichoderma virens* em diferentes embalagens e temperaturas. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 14, n. 2, p. 391-394, abr./jun. 2008.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do SISVAR para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 2000. p. 255-258.

GIROTTO, M. J. et al. O uso de fungos nematófagos no controle biológico de nematóides parasitas: revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Curitiba, v. 10, n. 6, p. 1-7, 2008.

MASANGKAY, R. F. et al. Characterization of sporulation of *Alternaria alternata* f. sp. *sphenocleae*. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 10, n. 4, p. 385-397, 2000.

NOZAKI, M. de H.; CAMARGO, M.; BARRETO, M. Caracterização de *Diaporthe citri* em diferentes meios de cultura, condições de temperatura e luminosidade. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 4, p. 429-432, jul./ago. 2004.

PELCZAR JUNIOR, J. M.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2. ed. São Paulo: Makron Books, 1996. v. 2, 300 p.

SAUTOUR, M. et al. Comparison of the effects of temperature and water activity on growth rate of food spoilage moulds. **Journal of Industrial and Microbiology e Biotechnology**, Hampshire, v. 28, n. 10, p. 311-315, 2002.

TAVARES, L. S. **Cultivo, encapsulação e estabilidade de um agente bioprotetor da qualidade do café**. 2011. 76 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

CAPÍTULO 5

**AVALIAÇÃO FÍSICA, QUÍMICA, FÍSICO-QUÍMICA E SENSORIAL
DE CAFÉS ANTES E APÓS A APLICAÇÃO DO AGENTE BIOLÓGICO**

Cladosporium cladosporioides (Fresen) de Vries NO PRODUTO

“CLADOSPORIN”

RESUMO

A formulação de um produto à base do agente bioprotetor da qualidade do café *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries e sua aplicação nos frutos pode promover a manutenção ou a melhoria da qualidade de cafés localizados em regiões próximas a represas com histórico de problemas de bebida. Conduziu-se este estudo, com o objetivo de avaliar o efeito bioprotetor do fungo *Cladosporium* sobre a qualidade do café por meio da aplicação na pré-colheita do “Cladosporin” em diferentes concentrações e épocas visando a avaliar a composição física, química, físico-química e sensorial nos cafés. O estudo foi realizado em cafés da cultivar Catuaí Amarelo IAC 62, com 3 anos de idade, provenientes de duas colheitas consecutivas nos anos agrícolas 2009/2010 e 2010/2011 pertencentes à Fazenda Santa Helena em Alfenas, MG. Os resultados apontaram que os parâmetros condutividade elétrica, lixiviação de potássio, sólidos solúveis totais, açúcares totais e atividade da polifenoloxidase se apresentaram como importantes marcadores de qualidade. A classificação da bebida pela prova de xícara apresentou indícios de subjetividade entre os diferentes provadores. Pelos resultados obtidos conclui-se que a aplicação do “Cladosporin” promoveu melhoria da qualidade nos cafés com resultados mais significativos para a fração boa.

Palavras-chave: café, bioproteção, composição química, qualidade.

ABSTRACT

The formulation of a product based agent bioprotector coffee quality *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries, and its application in coffee fruits can promote the maintenance or improvement of the quality of coffee located in areas near lakes with a history of drinking problems. The objective this study was to evaluate the effect of the fungus *Cladosporium* in “Cladosporin” how coffee quality bioprotector after apply it in pre-harvest at differents concentrations and times to evaluate the physical, chemical, physico-chemical compositions and sensory analisis. The study was conducted in coffee fruits Yellow Catuaí with 3 years of age, from two consecutive harvests in 2009/2010 and 2010/2011 crop years in Santa Helena Farm localized in Alfenas, MG. The results showed that electrical conductivity, leaching of potassium, soluble solids, total sugars and polifenoloxidasis activity how importants quality markers. The classification of the drink by cup test showed evidence of subjectivity between different tasters. Through the obtained results it was concluded that the application of “Cladosporin” promoted improvement of coffee quality with more significant results for the fraction “boia” (overripe berries dried on tree).

Key words: coffee, bioprotection, chemical composition, quality.

1 INTRODUÇÃO

O aumento da concorrência na produção, além da maior percepção da importância da qualidade do café pelo mercado interno são fatores a serem considerados como importantes impulsionadores na produção de bebidas com qualidade superior, além da forte exigência pela qualidade por parte dos países importadores.

Um dos principais fatores que afetam a qualidade do café é a ocorrência de micro-organismos causadores de prejuízos à qualidade da bebida por serem responsáveis pelos processos fermentativos indesejáveis que podem ocorrer ainda na planta iniciando-se a partir do processo de maturação dos frutos, comprometendo também a segurança do produto final.

As condições climáticas em regiões de clima quente e/ou úmido, no período de colheita (como na proximidade das represas), a duração da maturação é menor, com os frutos passando rapidamente do estágio cereja para passa e as duas fases iniciais de fermentação dos frutos (fases acética e láctica) podem evoluir para as duas fases seguintes (fases propiônica e butírica) que são prejudiciais à bebida, com o surgimento do gosto “rio”. Nesse caso, o processamento não consegue reverter o prejuízo conferido à bebida (CORTEZ, 1993). Ainda segundo o autor, os plantios realizados junto à represa de Furnas sofrem influência da umidade originária da grande massa de água, o que acelera a maturação e facilita um processo de desenvolvimento microbiano, resultando quase sempre em uma depreciação da qualidade de bebida, em razão da presença e níveis de vários constituintes químicos voláteis e não-voláteis que podem ser alterados em decorrência das fermentações.

Um outro fator que pode estar associado ao desenvolvimento de micro-organismos indesejáveis à qualidade do café é a aplicação demasiada de fungicidas sintéticos visando à diminuição da sua população que, além de promover a resistência de fungos causadores de fermentações, contribuem de forma efetiva para a diminuição de micro-organismos benéficos à cultura, dentre os quais destaca-se o *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries, considerado um efetivo agente bioprotetor da qualidade do café (CHALFOUN, 2010; PEREIRA; PFENNING; CASTRO, 2005).

Por isso, a formulação de um produto à base desse agente biológico e sua aplicação nos frutos poderia promover a manutenção ou a melhoria da qualidade de cafés com histórico de problemas de bebida, localizados em regiões próximas a represas. Diante do exposto, conduziu-se este estudo, com o objetivo de inocular o *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries em uma lavoura de café instalada às margens de represa com histórico de comprometimento de qualidade da bebida, pela aplicação na pré-colheita de um produto à base desse fungo (“Cladosporin”) em diferentes concentrações e épocas na pré-colheita visando a avaliar o efeito dessa aplicação sobre a composição física, química, físico-química e prova de xícara nos cafés.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Localização do ensaio e descrição dos tratamentos

O produto “Cladosporin” foi produzido no Centro de Análises Avançadas e Biotecnologia (CAAB/UFLA), localizado no CEPE-CAFÉ (Centro de Ensino, Pesquisa e Extensão do Agronegócio Café – UFLA) utilizando-se o agente biológico *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries adquirido da micoteca do Laboratório de Microbiologia da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais – Unidade Regional EPAMIG Sul de Minas - EPAMIG/URESM, localizado no campus da UFLA.

O presente estudo foi realizado em cafês da cultivar Catuaí Amarelo IAC 62 com 3 anos de idade, provenientes de duas colheitas consecutivas nos anos agrícolas 2009/2010 e 2010/2011.

A lavoura de café onde o produto foi aplicado está localizada na Fazenda Santa Helena, no município de Alfenas – MG, às margens da represa de Furnas, área mais susceptível a ocorrência de micro-organismos causadores de processos fermentativos em função da alta umidade relativa do ar. Esta fazenda foi escolhida porque em algumas áreas apresentava histórico de qualidade inferior de bebida, constatada pela prova de xícara.

As parcelas foram constituídas por 60 plantas sendo consideradas úteis as 50 plantas centrais, e no experimento foram avaliadas diferentes doses e número de aplicações do “Cladosporin” na lavoura.

Os tratamentos foram os seguintes:

T1 – 1Kg do “Cladosporin”/ha numa única aplicação com cerca de 20% dos frutos no estágio cereja;

T2 – 1Kg do “Cladosporin”/ha com duas aplicações, sendo uma com cerca de 20% dos frutos no estádio cereja e a outra em torno de 50% de frutos cerejas nas plantas;

T3 – 1,5Kg do “Cladosporin”/ha numa única aplicação com cerca de 20% dos frutos no estádio cereja;

T4 – 1,5Kg do “Cladosporin”/ha com duas aplicações, sendo uma com cerca de 20% dos frutos no estádio cereja e a outra em torno de 50% de frutos cerejas nas plantas;

T5 – 2Kg do “Cladosporin”/ha numa única aplicação com cerca de 20% dos frutos no estádio cereja;

T6 – 2Kg do “Cladosporin”/ha com duas aplicações, sendo uma com cerca de 20% dos frutos no estádio cereja e a outra em torno de 50% de frutos cerejas nas plantas;

T7 – 2,5Kg do “Cladosporin”/ha numa única aplicação com cerca de 20% dos frutos no estádio cereja;

T8 – 2,5Kg do “Cladosporin”/ha com duas aplicações, sendo uma com cerca de 20% dos frutos no estádio cereja e a outra em torno de 50% de frutos cerejas nas plantas;

T9 – 3Kg do “Cladosporin”/ha numa única aplicação com cerca de 20% dos frutos no estádio cereja;

T10 – 3Kg do “Cladosporin”/ha com duas aplicações, sendo uma com cerca de 20% dos frutos no estádio cereja e a outra em torno de 50% dos frutos cerejas nas plantas;

T11 – Testemunha (sem aplicação do produto).

Cabe ressaltar que o “Cladosporin” é uma formulação em pó molhável, contendo o fungo considerado agente bioprotetor da qualidade do café

Cladosporium cladosporioides (Fresen) de Vries sendo produto de patente entre a EPAMIG-FAPEMIG-UFLA.

Após a colheita, os frutos foram lavados e separados no lavador em duas frações: cereja + verde e boia. Posteriormente, foram secados de forma convencional em terreiro de cimento com vários revolvimentos ao dia visando a secagem uniforme até os grãos atingirem em torno de 12% de umidade, quando foram beneficiados e encaminhados para a realização das análises de qualidade.

As análises físicas, químicas e físico-químicas foram realizadas no Laboratório de Qualidade do Café Dr. Alcides Carvalho, pertencente à EPAMIG-URESM, no Laboratório Central de Análises pertencente ao Departamento de Ciência dos Alimentos – UFLA e no Centro de Análises Avançadas e Biotecnologia (CAAB) - UFLA.

A classificação pela prova de xícara foi realizada por três provadores de diferentes localidades.

2.2 Metodologia utilizada nas análises físicas, químicas, físico-químicas e classificação pela bebida (prova de xícara)

2.2.1 Condutividade Elétrica: Determinada segundo Prete (1992). Os resultados foram expressos em $\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$.

2.2.2 Lixiviação de Potássio: Realizada em fotômetro de chama Digimed DM-61 após 5 horas de embebição dos grãos, segundo metodologia proposta por Prete (1992). Os resultados foram expressos em ppm/g de amostra.

2.2.3 Atividade da Polifenoloxidase: O extrato enzimático da polifenoloxidase foi obtido segundo o processo de extração descrito por Draetta e Lima (1976) e a atividade da enzima foi determinada pelo método descrito por Ponting e Joslyng (1948).

2.2.4 Compostos fenólicos totais: Foram extraídos pelo método de Goldstein e Swain (1963), utilizando como extrator o metanol 50% (U/V) e identificados de acordo com o método de Folin Denis, descrito pela Association of Official Agricultural Chemists - AOAC (1990).

2.2.5 Massa de 50 grãos: Determinada pelo método gravimétrico, utilizando-se balança analítica.

2.2.6 Sólidos solúveis totais: Foram determinados por meio de refratômetro portátil Atago – Palette modelo PR-100 (0-32%) de acordo com AOAC (1990).

2.2.7 Açúcares totais: A determinação foi de acordo com a metodologia descrita por Dische (1962).

2.2.8 Acidez titulável total: A partir do filtrado obtido pela agitação de 2 gramas de amostra em 50mL de água, a acidez foi determinada por titulação com NaOH 0,1N, de acordo com técnica descrita pela (AOAC, 1990).

2.2.9 Perfil de ácidos orgânicos: Para a determinação dos ácidos orgânicos foram utilizados procedimentos de extração com água e análise em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), de acordo com a metodologia

adaptada de Silva et al. (2002). Utilizou-se cromatógrafo da marca Shimadzu^R com 2 colunas Shim-pack SPR-H (250mm X 7.8mm) simultâneas com pré-coluna Shim-pack SPR-H (G) (50mm X 7.8mm). O sistema foi acoplado a um detector de condutividade Shimadzu^R (modelo CDD 10A) conectado por uma interface (CBM-20A) a um microcomputador para processamento de dados.

As condições de análise otimizadas foram:

- 1) Fluxo A e B: 0,8 mL/min
- 2) Fase móvel A: ácido p-toluenosulfônico 4mM
- 3) Fase móvel B: 16mM Bis-Tris contendo ácido p-toluenosulfônico 4mM e 100µM EDTA
- 4) Temperatura: 40°C
- 5) Detector: Polaridade + Pressão

Resposta: baixa

2.2.10 Compostos Bioativos: Cafeína, Trigonelina e Ácido Clorogênico (5 ACQ): Para a determinação de cafeína, trigonelina e ácido clorogênico foram utilizados procedimentos de extração com metanol de acordo com a metodologia adaptada de Aguiar et al. (2005) e Lima et al. (2007) e análise em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Utilizou-se cromatógrafo da marca Shimadzu^R com coluna em fase reversa C-18. O sistema foi acoplado a um detector espectrofotométrico UV/visível Shimadzu^R (modelo SPD-10A), conectado por uma interface (CBM-20A) a um microcomputador para processamento de dados.

As condições de análise otimizadas foram:

- 1) Fluxo: 1 mL/min
- 2) Fase móvel: metanol, água e ácido acético (25:74,5:0,5)

- 3) Temperatura: 30°C
- 4) Comprimento de onda: 272 nm
- 5) Pressão: 130 atm

2.2.11 Classificação pela bebida (Prova de xícara): Foi realizada por três provadores especializados, de diferentes localidades, de acordo com a classificação oficial brasileira (BRASIL, 2003).

2.2.12 Análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados (DBC) num fatorial de 6 x 2 (6 doses do “Cladosporin” x 2 épocas de aplicação) com 4 repetições. Após a obtenção dos dados, os mesmos foram submetidos à análise de variância. Para a comparação do número de aplicações, foi utilizado o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade e para comparar o efeito da aplicação nas diferentes doses do “Cladosporin”, foi utilizado o teste de Regressão. Os anos foram comparados por contraste. As frações boia e cereja + verde em cada ano foram comparadas por contraste. Todos os testes foram realizados utilizando-se o programa SISVAR, segundo a metodologia proposta por (FERREIRA, 2000).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Condutividade Elétrica

Vários estudos apontam a Condutividade Elétrica como um importante parâmetro de qualidade dos grãos de café, relacionando essa análise com a integridade das membranas celulares, em virtude do aumento ou diminuição de íons no soluto (GOULART et al., 2007; PIMENTA et al., 2008a). Inclusive essa análise se mostra eficiente na separação de lotes de sementes de café com diferentes níveis de qualidade fisiológica (CABRAL; CARVALHO, 2006). Assim, quanto maior a condutividade elétrica mais desestruturada se encontra a parede celular do grão e pior a sua qualidade.

Os resultados mostraram que para a fração boia, houve diferença significativa nos valores médios da variável condutividade elétrica entre os dois anos avaliados, sendo encontrado o menor valor no segundo ano de aplicação do “Cladosporin” (Tabelas 1 e 28A).

Tabela 1 Valores de Condutividade Elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$) da fração boia e cereja + verde de cafês, antes e após a aplicação do “Cladosporin”. Lavras, 2012.

Estádios	Condutividade Elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$)		
	Ano 1	Ano 2	CV (%)
Boia	214,40 b A	193,70 a A	9,52
Cereja + Verde	272,04 b B	217,63 a B	7,06
CV (%)	3,03	10,50	

* Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

No primeiro ano do ensaio, na fração boia, houve interação significativa entre os valores médios das doses aplicadas e número de aplicações (Tabelas 2 e 36A). Já no primeiro ano, o produto promoveu variação nos valores médios de condutividade elétrica nos grãos entre uma e duas aplicações, pois os valores da variável foram maiores com uma única aplicação do “Cladosporin” nas doses iniciais se igualando em duas aplicações com o aumento das doses do produto.

De acordo com os resultados da análise de regressão, os valores médios de condutividade elétrica diminuíram com o aumento das doses do “Cladosporin” em uma aplicação (Figura 1A). Com duas aplicações, os valores médios foram inferiores aos encontrados em uma aplicação e mais constantes, sofrendo aumento somente na maior dosagem aplicada (Figura 1B). Assim, no primeiro ano, duas aplicações foram mais eficientes para a preservação da integridade das membranas celulares na fração boia até a dose de 2,5Kg/ha.

Tabela 2 Valores de Condutividade Elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$) da fração boia de cafés, antes e após a aplicação do “Cladosporin”. Lavras, 2012.

Tratamentos	Condutividade Elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$)			
	Ano 1		Ano 2	
	Número de aplicações		Número de aplicações	
	1	2	1	2
0	204,47 a*	204,47 a	204,50 a*	204,50 a
1,0 Kg/ha	282,22 b	201,25 a	192,10 a	193,30 a
1,5 Kg/ha	270,25 b	180,77 a	190,93 a	197,40 b
2,0 Kg/ha	210,37 a	203,35 a	188,77 a	190,20 a
2,5 Kg/ha	201,25 a	197,77 a	199,30 b	189,65 a
3,0 Kg/ha	198,97 a	217,25 b	186,30 a	187,35 a
CV (%)	6,91		1,07	

* Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

No segundo ano, os valores médios de condutividade elétrica, foram inferiores aos valores médios do primeiro ano (Tabelas 2 e 28A), indicando eficiência do “Cladosporin” na bioproteção do café. Houve interação significativa entre número de aplicações e doses aplicadas (Tabelas 2 e 44A). Com relação às doses aplicadas, o teste de Tukey mostrou haver diferença significativa entre os valores médios com uma e duas aplicações do “Cladosporin” (Tabela 2). Com uma aplicação, a dose de 2,5Kg/ha foi o pior tratamento e com duas aplicações, 1,5Kg/ha foi a dose menos eficiente.

Os resultados do teste de regressão indicaram que os valores de condutividade elétrica foram decrescentes com uma e com duas aplicações, indicando maior integridade da parede celular dos grãos com o aumento da dose do produto (Figura 1C e Figura 1D). Cabe ressaltar que grãos com parede celular mais estruturada são mais intactos e, conseqüentemente, proporcionarão melhor bebida.

Dessa forma, no segundo ano de ensaio para a fração boia, a aplicação do “Cladosporin” na maior dose, tanto em uma quanto em duas aplicações, contribuiu para a obtenção dos menores valores de condutividade elétrica que é um teste auxiliar para a avaliação da qualidade do café.

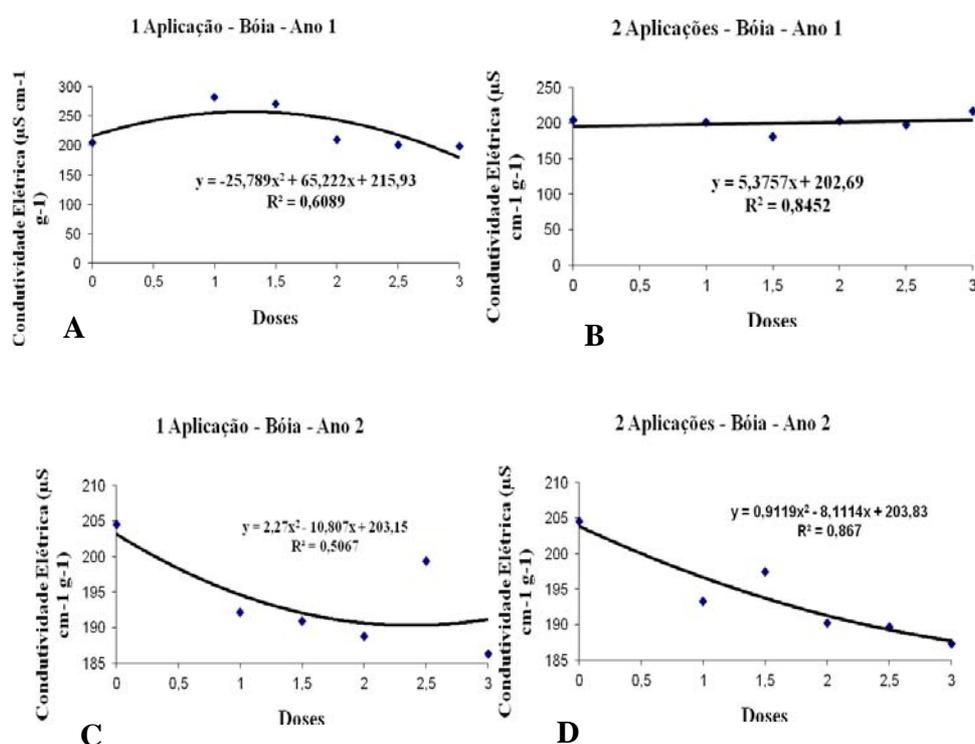


Figura 1 Valores de Condutividade Elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$) em cafés da fração boia, antes e após a aplicação do “Cladosporin”. Lavras, 2012.

Para a fração cereja + verde (Tabelas 1 e 52A), os resultados mostraram haver diferença significativa entre os anos avaliados, sendo que, no segundo ano, os valores de condutividade elétrica diminuíram em relação ao primeiro, indicando efeito positivo da aplicação do “Cladosporin” no primeiro ano com o aumento do inóculo de *Cladosporium cladosporioides* (Fesen) de Vries, na área do primeiro para o segundo ano, conforme já discutido no capítulo 3.

A interação entre as doses do “Cladosporin” ministradas e o número de aplicações não foi significativa, sendo evidenciada diferença somente para doses (Tabelas 3 e 60A).

Tabela 3 Valores de Condutividade Elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$) da fração cereja + verde de cafês, antes e após a aplicação do “Cladosporin”. Lavras, 2012.

Tratamentos	Condutividade Elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$)	
	Ano 1	Ano 2
0	236,92	226,46
1,0 Kg/ha	263,65	217,07
1,5 Kg/ha	281,56	215,50
2,0 Kg/ha	293,10	211,83
2,5 Kg/ha	279,55	215,96
3,0 Kg/ha	277,48	218,96
CV (%)	5,26	1,64

No teste de regressão (Figura 2A), observa-se que no primeiro ano para a fração cereja + verde, o “Cladosporin” não apresentou eficiência entre doses, sendo que os valores médios de condutividade elétrica foram aumentando com o aumento das doses. Como o “Cladosporin” é à base do agente biológico *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries, pode ser que no primeiro ano, nessa fração, o fungo não tenha conseguido se estabelecer, talvez em razão do estabelecimento de outros micro-organismos no interior do fruto que acarretaram num aumento na degradação das membranas.

Assim como no primeiro ano, no segundo ano também não houve interação significativa para doses e aplicações, sendo as diferenças constatadas somente entre as doses do “Cladosporin” aplicadas (Tabelas 3 e 68A).

Os valores médios de condutividade elétrica, além de terem sido inferiores aos valores médios do primeiro ano (Tabelas 1 e 52A), apresentaram

diminuição com o aumento na dose do “Cladosporin” aplicado até 2,0Kg/ha, ocorrendo a partir desse tratamento, um aumento nos valores médios (Figura 4B).

Os resultados mostram que para a fração cereja + verde, o aumento do inóculo do *Cladosporium* na área no primeiro ano foi essencial para a eficiência do produto no segundo ano de aplicação. Apesar do melhor tratamento ter sido a dose de 2,0Kg/ha em uma única aplicação para essa fração, os demais tratamentos promoveram valores médios de condutividade elétrica inferiores à testemunha.

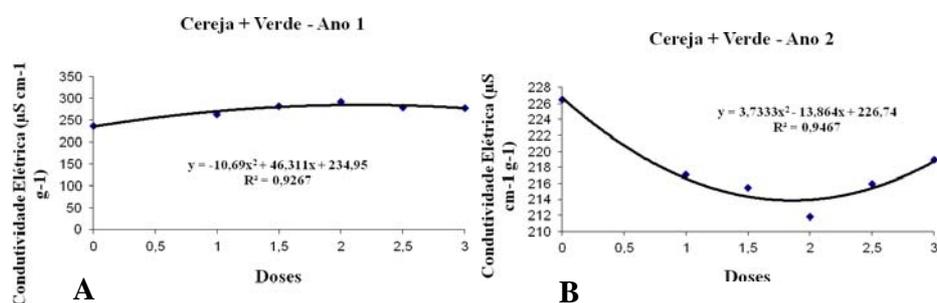


Figura 2 Valores de Condutividade Elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$) da fração cereja + verde em cafés, antes e após a aplicação do “Cladosporin”. Lavras, 2012.

Na avaliação dos valores médios entre as duas frações estudadas nos dois anos, os resultados demonstraram (Tabelas 1, 76A e 84A) que a fração cereja + verde apresentou maiores valores de condutividade elétrica em relação a fração boia nos dois anos avaliados. Esses resultados podem ser decorrentes do grande número de frutos verdes ainda na colheita, por isso, nessa região recomenda-se que os frutos permaneçam um maior período em contato com o

produto “Cladosporin”, retardando, ao máximo a colheita, porém sendo monitorados para que não caiam no chão. Valores de condutividade elétrica mais elevados com presença de frutos verdes são bastante comuns e já foram relatados em outros estudos (PIMENTA et al., 2008b).

Os resultados permitem a inferência que o “Cladosporin” em uma única aplicação na dose de 3,0 Kg/ha foi eficiente para a diminuição da condutividade elétrica nos grãos de café nas frações boia nos dois anos e cereja + verde no segundo ano. Cabe salientar que, apesar do “Cladosporin” ter proporcionado diminuição nos teores de condutividade elétrica com o aumento nas doses, os valores encontrados estão muito superiores aos encontrados por Malta e Chagas (2008) que é de 170,36 ($\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$) para a fração boia e de 151,68 ($\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$) para a fração cereja + verde e, por isso, recomenda-se que o produto seja aplicado anualmente.

3.2 Lixiviação de Potássio

Os resultados entre os anos avaliados na fração boia apontaram diferença significativa pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade, sendo os valores de Lixiviação de Potássio menores no segundo ano (Tabelas 4 e 29A), da mesma forma que na Condutividade Elétrica. De acordo com Borém et al. (2007), o potássio é o íon presente em maior quantidade no café, assim, quanto maior o nível de injúrias no grão, maiores serão as perdas de conteúdo celular para a solução, maiores serão os valores de potássio lixiviados presentes no exudato, e consequentemente, maiores os valores de condutividade elétrica.

Tabela 4 Valores de Lixiviação de Potássio (ppm/g) da fração boia em cafés, antes e após a aplicação do “Cladosporin”. Lavras, 2011.

Estádios	Lixiviação de Potássio (ppm/g)		CV (%)
	Ano 1	Ano 2	
Boia	50,21 b A	44,59 a A	13,19
Cereja + Verde	62,97 b B	51,63 a B	11,18
CV (%)	11,66	2,95	

* Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

No primeiro ano, a análise estatística apontou interação significativa entre as doses do “Cladosporin” pulverizadas e o número de aplicações na fração boia (Tabelas 5 e 37A).

Duas aplicações do “Cladosporin” na maioria das doses, promoveram valores médios de lixiviação de potássio mais satisfatórios que em apenas uma aplicação do produto, exceto na maior dose (3Kg/ha), onde uma e duas aplicações foram iguais.

Houve diminuição nos valores médios de lixiviação de potássio com o aumento da dose do produto pulverizada em uma ou duas aplicações (Figura 3A e Figura 3B).

Tabela 5 Valores de Lixiviação de Potássio (ppm/g) da fração boia em cafés, antes e após a aplicação do “Cladosporin”. Lavras, 2012.

Tratamentos	Lixiviação de Potássio (ppm/g)			
	Ano 1		Ano 2	
	Número de Aplicações		Número de Aplicações	
	1	2	1	2
0	52,70 a*	52,70 a	51,00 a	51,00 a
1,0 Kg/ha	50,48 b	49,40 a	56,47 b	49,60 a
1,5 Kg/ha	50,40 b	49,40 a	43,47 b	40,62 a
2,0 Kg/ha	50,20 b	49,54 a	40,10 a	41,90 a
2,5 Kg/ha	50,24 b	49,36 a	42,52 b	39,57 a
3,0 Kg/ha	49,00 a	49,06 a	39,67 a	39,32 a
CV (%)	0,42		2,94	

* Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

No segundo ano, a interação entre as doses do produto e número de aplicações para a fração boia foi significativa (Tabelas 5 e 45A). Os valores foram inferiores ao primeiro ano e, na maioria dos tratamentos, duas aplicações foram mais eficientes que apenas uma, exceto nos tratamentos de 2,0Kg/ha e 3,0Kg/ha que não diferiram os valores médios de lixiviação de potássio com uma ou duas aplicações.

O aumento das doses do “Cladosporin” pulverizadas promoveu diminuição nos valores da variável analisada (Figura 3C e Figura 3D).

Portanto, na fração boia, a aplicação do “Cladosporin” em uma única dose de 3,0Kg/ha promove maior integridade dos grãos de café.

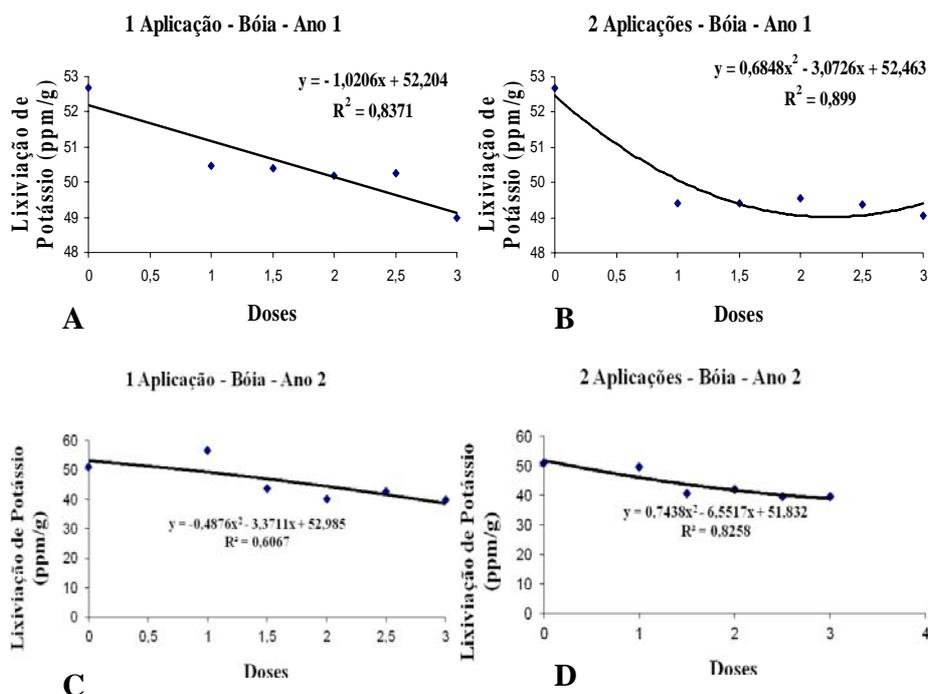


Figura 3 Valores de Lixiviação de Potássio (ppm/g) em cafés da fração boia antes e após a aplicação do “Cladosporin”. Lavras, 2012.

Na fração cereja + verde os resultados demonstrados pelo teste de Tukey (Tabelas 4 e 53A) apontaram diferenças significativas entre os dois anos e demonstraram ainda, menor valor de lixiviação de potássio no segundo ano. Esse fato é importante, pois mostra um efeito da aplicação do produto no primeiro ano com o aumento do inóculo na área e início da proteção dos frutos.

No primeiro ano, houve diferença significativa entre o número de aplicações nas diferentes doses (Tabelas 6 e 61A), demonstrando que duas aplicações foram mais eficientes nas menores doses e o tratamento de 3,0Kg/ha foi suficiente com apenas uma aplicação do produto.

Em uma aplicação houve aumento nos teores de lixiviação de potássio com o aumento das doses pulverizadas, exceto na menor e maior dose do “Cladosporin” (Figura 4A). Esse fato pode ser atribuído a menor quantidade de frutos cereja no momento da aplicação, pois em duas aplicações (Figura 4B), os valores de Lixiviação de Potássio sofreram menos variação, sendo que somente as maiores doses proporcionaram aumento de valores. Cabe ressaltar, ainda, que em duas aplicações os valores em todos os tratamentos foram inferiores à testemunha e a dose de 2,0Kg/ha foi o melhor tratamento.

Tabela 6 Valores de Lixiviação de Potássio (ppm/g) da fração cereja + verde de cafês, antes e após a aplicação do “Cladosporin”. Lavras, 2012.

Tratamentos	Lixiviação de Potássio (ppm/g)			
	Ano 1		Ano 2	
	Número de Aplicações		Número de Aplicações	
	1	2	1	2
0	63,37 a*	63,37 a	54,64 a*	54,64 a
1,0 Kg/ha	62,32 b	61,17 a	52,47 b	51,63 a
1,5 Kg/ha	66,62 b	61,65 a	51,86 a	52,14 b
2,0 Kg/ha	64,67 b	59,40 a	50,81 a	51,42 b
2,5 Kg/ha	63,67 b	62,12 a	51,12 b	49,36 a
3,0 Kg/ha	61,42 a	62,87 b	50,38 b	49,00 a
CV (%)	1,11		0,14	

* Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

No segundo ano, a fração cereja + verde apresentou valores de lixiviação de potássio inferiores ao primeiro ano em quase todos os tratamentos (Tabela 6). A interação doses do “Cladosporin” e número de aplicação foi significativa (Tabelas 6 e 69A).

Os resultados para essa fração no segundo ano não foram bem definidos, porque com uma aplicação, as menores doses do produto foram mais eficientes

na redução dos valores de Lixiviação de Potássio, enquanto que em duas aplicações, as maiores doses proporcionaram melhores valores médios, mas todos os tratamentos foram eficientes em relação à dose 0 (Tabela 6).

De acordo com o teste de regressão (Figura 4C e Figura 4D), em uma ou duas aplicações do “Cladosporin”, ocorreu redução nos valores médios de forma linear com o aumento da dose do produto aplicada nos frutos, porém, nessa fração, duas aplicações foram mais eficientes, pois apresentaram o menor valor de lixiviação de potássio (Tabela 6).

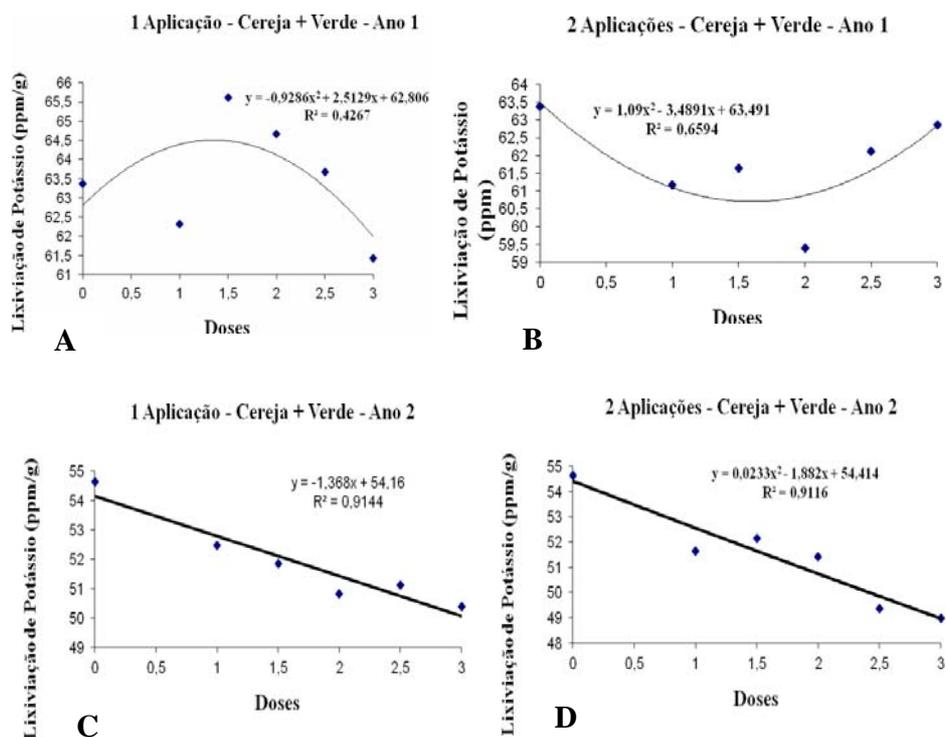


Figura 4 Valores de Lixiviação de Potássio (ppm/g) em cafés da fração cereja + verde, antes e após a aplicação do “Cladosporin”. Lavras, 2012.

O teste de Tukey entre as duas frações estudadas nos dois anos avaliados demonstrou que os valores de potássio lixiviados foram menores na fração boia (Tabelas 4, 77A e 85A), provavelmente em razão do maior tempo de permanência desta fração em contato com o produto e também em decorrência de os frutos verdes da fração cereja + verde não proporcionarem condições para que o *Cladosporium* se desenvolva sobre eles. Tal fato pode ser também decorrente da ocorrência de frutos verdes contribuírem grandemente para altos valores de lixiviação de potássio, pelo fato das membranas celulares não estarem totalmente estabilizadas e formadas.

Os resultados dos dois anos nas duas frações sugerem que a aplicação do “Cladosporin” na maior dose (3,0Kg/ha) em uma única aplicação é o tratamento mais indicado na redução dos valores de Lixiviação de Potássio nos grãos de café e que a permanência dos frutos por mais tempo em contato com o bioprotetor foi positiva e melhorou a integridade dos grãos, o que, conseqüentemente, proporcionará melhor qualidade de bebida. Ainda, a menor lixiviação de potássio no segundo ano é um forte indicativo de efeito positivo da utilização do produto por mais de uma safra consecutiva, aumentando o inóculo do bioprotetor na área, conforme já constatado no capítulo 3.

3.3 Atividade da Polifenoloxidase (PFO)

Os resultados de acordo com teste de Tukey entre os dois anos avaliados na fração boia, demonstraram haver diferença estatística significativa, sendo o valor médio da atividade da PFO maior no segundo ano (Tabelas 7 e 30A).

As enzimas polifenoloxidasas atuam nos polifenóis, diminuindo sua ação antioxidante sobre aldeídos e facilitando a sua oxidação, resultando na produção de quinonas que inibem a ação das polifenoloxidasas. Diante desse fato, pode-se estabelecer uma correlação entre baixa atividade da PFO e cafés de baixa qualidade (AMORIM; SILVA, 1968), por isso, diversos autores utilizam essa análise como indicador de qualidade do café (LEITE et al., 1998; MALTA; SANTOS; SILVA, 2002; PIMENTA et al., 2008a).

Tabela 7 Valores de Atividade de PFO (u/min/g) da fração boia e cereja + verde de cafés antes e após a aplicação do “Cladosporin”. Lavras, 2012.

Estádios	Atividade da PFO (u/min/g)		CV (%)
	Ano 1	Ano 2	
Boia	63,30 b A	64,20 a A	1,01
Cereja + Verde	61,68 b B	62,43 a B	1,55
CV (%)	0,98	1,55	

* Médias seguidas da mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

No primeiro ano de aplicação do “Cladosporin” na fração boia, ocorreram diferenças significativas entre o número de aplicações nos diferentes tratamentos (Tabela 8). A interação entre dose do “Cladosporin” e número de aplicações apresentou significância (Tabelas 8 e 38A).

De acordo com os valores da atividade da PFO, as maiores doses nas duas aplicações estudadas favoreceram uma maior atividade da enzima e não diferiram entre elas (Tabela 8).

Com uma aplicação, os valores médios da PFO aumentaram com o aumento nas doses do “Cladosporin” aplicadas (Figura 5A). Em duas aplicações, o maior valor foi na dose de 2,0Kg/ha (Figura 5B).

Portanto, somente uma aplicação do “Cladosporin” na dose de 2,5Kg/ha ou 3,0Kg/ha já favorece o aumento da atividade dessa enzima.

Tabela 8 Valores de Atividade de PFO (u/min/g) da fração boia em cafês, antes e após a aplicação do “Cladosporin”. Lavras, 2012.

Tratamentos	Atividade de PFO (u/min/g)			
	Ano 1		Ano 2	
	Número de Aplicações		Número de Aplicações	
	1	2	1	2
0	62,60 a*	62,60 a	62,35 a*	62,35 a
1,0 Kg/ha	63,26 a	63,70 b	64,63 a	63,87 b
1,5 Kg/ha	63,22 a	63,30 a	64,47 a	64,97 a
2,0 Kg/ha	63,26 b	64,00 a	64,68 a	63,95 b
2,5 Kg/ha	63,27 a	63,32 a	63,92 b	64,51 a
3,0 Kg/ha	63,60 a	63,25 a	64,51 a	63,51 b
CV (%)	0,40		0,63	

* Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

No segundo ano, ocorreu diferença significativa para a interação entre doses do “Cladosporin” e número de aplicações (Tabelas 8 e 46A). As diferenças entre o número de aplicações nos diferentes tratamentos apontaram que, na maioria das doses, a atividade da PFO foi maior com apenas uma aplicação do produto (Tabela 8). Ocorreram maiores valores médios para a

atividade da PFO com o aumento das doses pulverizadas do “Cladosporin”, assim como evidenciado no primeiro ano (Figura 5C e Figura 5D).

Fica constatado que a aplicação do “Cladosporin” favorece maior atividade de PFO, com o aumento das doses do produto, sendo, portanto, indicado 3,0Kg/ha em uma única aplicação.

Uma tabela de classificação proposta por Carvalho et al. (1994), sugere relacionar valores de atividade da PFO com padrões de bebida. Os autores atribuíram valores superiores a 67,66 u/min/g de amostra como cafés de bebida estritamente mole, valores na faixa de 62,99 a 67,66 u/min/g de amostra como bebida mole e apenas mole, 55,99 a 62,99 u/min/g de amostra como bebida classificada como dura e padrões de bebida rio e riada com valores inferiores a 55,99 u/min/g de amostra. De acordo com essa classificação, nos dois anos avaliados, a testemunha (dose 0) é classificada como bebida Dura e os demais tratamentos, como bebida Mole.

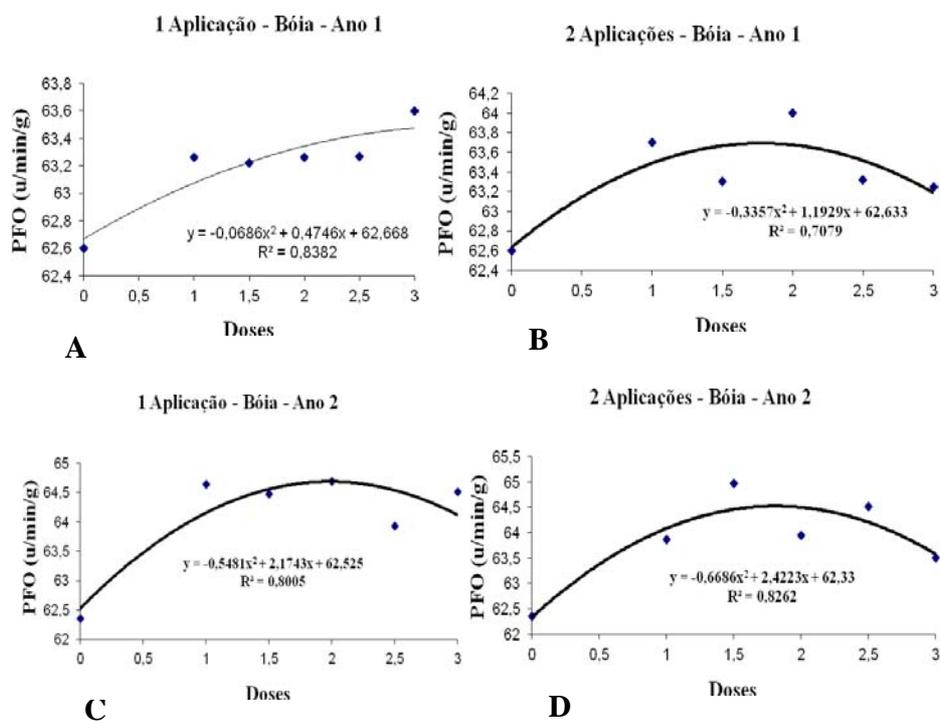


Figura 5 Valores de Atividade de PFO (u/min/g) em cafês da fração boia antes e após a aplicação do “Cladosporin”. Lavras, 2012.

Para a fração cereja + verde, o teste de Tukey, entre os dois anos, mostrou maior atividade de PFO no segundo ano (Tabelas 7 e 54A).

No primeiro ano, houve interação significativa entre as doses do “Cladosporin” aplicadas e o número de aplicações (Tabelas 9 e 62A). Os maiores valores médios para a atividade da PFO foram obtidos em duas aplicações do “Cladosporin” na maioria dos tratamentos, com exceção apenas da menor dose que não diferiu no número de aplicações do produto (Tabela 9),

assim, na fração cereja + verde, duas aplicações foram mais eficientes para o aumento dos valores da atividade da PFO.

De acordo com o teste de regressão (Figura 6A e Figura 6B), houve aumento nos valores da atividade da PFO nos tratamentos em relação à testemunha em uma ou duas aplicações.

Tabela 9 Valores de Atividade de PFO (u/min/g) da fração cereja + verde em cafés antes e após a aplicação do “Cladosporin”. Lavras, 2012.

Tratamentos	Atividade de PFO (u/min/g)			
	Ano 1		Ano 2	
	Número de Aplicações		Número de Aplicações	
	1	2	1	2
0	60,51 a*	60,51 a	62,12 a*	62,12 a
1,0 Kg/ha	61,75 a	61,65 a	61,63 b	63,00 a
1,5 Kg/ha	61,46 b	62,48 a	62,41 a	62,14 a
2,0 Kg/ha	61,63 b	62,77 a	62,20 a	62,70 a
2,5 Kg/ha	61,53 b	62,45 a	62,42 a	62,41 a
3,0 Kg/ha	61,21 b	62,00 a	63,17 a	63,80 a
CV (%)	0,40		1,01	

* Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

No segundo ano analisado, a interação entre doses do “Cladosporin” e o número de aplicações apresentou diferença significativa (Tabelas 9 e 70A). O teste de médias apontou diferença somente na menor dose testada, as demais foram iguais estatisticamente.

O aumento das doses aplicadas nessa fração promoveu, também, aumento da atividade da PFO em uma aplicação ou em duas aplicações (Figura 6C e Figura 6D), sendo a maior dose considerada a mais indicada, tanto em uma quanto em duas aplicações (Tabela 9).

De acordo com a tabela de classificação proposta por Carvalho et al. (1994), no primeiro ano para a fração cereja + verde, todos os tratamentos se enquadram como bebida Dura.

No segundo ano, somente a dose de 3,0Kg/ha pode ser classificada como bebida Mole, enquanto os demais tratamentos são classificados como bebida Dura.

Os resultados obtidos pelo teste de Tukey para as duas frações avaliadas nos dois anos (Tabelas 7, 78A e 86A) mostraram maior atividade de PFO na fração boia em relação à fração cereja + verde, provavelmente pelo maior número de frutos verdes nessa fração e demonstrando mais uma vez que a maior permanência do produto favorece a qualidade dos grãos.

Os resultados apontam que o “Cladosporin” promoveu aumento da atividade da enzima PFO nas duas frações estudadas, sendo considerado como melhor tratamento, a maior dose do produto em uma aplicação e, novamente, mostrando efeito positivo do produto aplicado de um ano para o outro, sugerindo, assim, que seria interessante a aplicação do “Cladosporin” por mais de uma safra consecutiva.

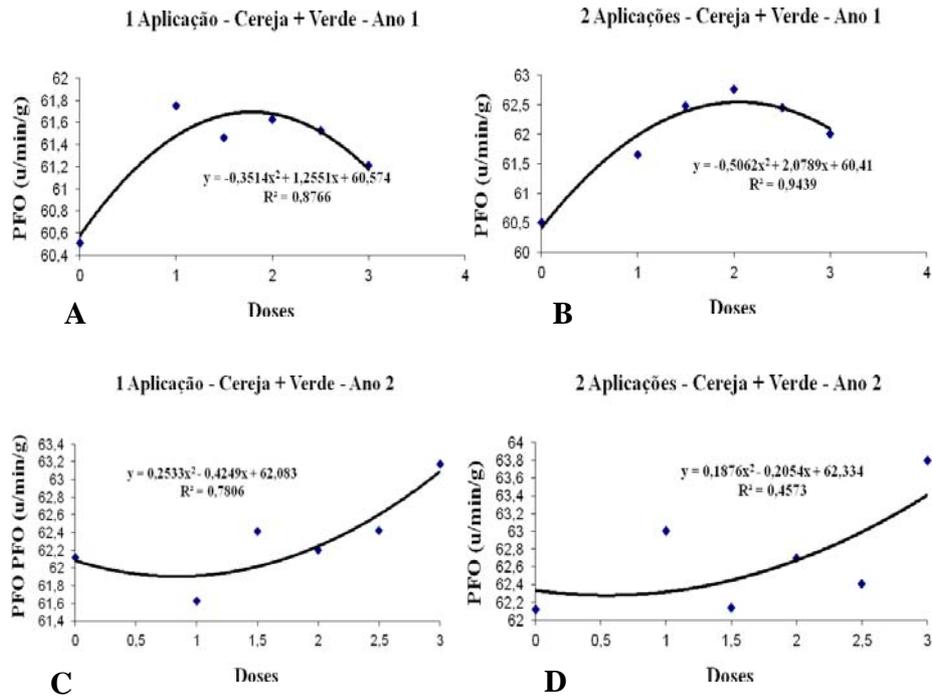


Figura 6 Valores de Atividade de PFO (u/min/g) em cafês da fração cereja + verde antes e após a aplicação do “Cladosporin”. Lavras, 2012.

3.4 Compostos Fenólicos Totais

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários de plantas, geralmente envolvidos na defesa contra radiação ultravioleta ou agressão por patógenos (FARAH; DONANGELO, 2006). São constituintes da maioria das plantas encontradas na natureza e comumente consumidas, como as frutas, vegetais, cereais e legumes e em bebidas derivadas de plantas como vinho, chá e café (CHEYNIER, 2005).

Os resultados demonstrados pelo teste de Tukey entre os anos para a fração boia demonstraram que no segundo ano houve aumento do valor médio de compostos fenólicos totais em relação ao primeiro ano (Tabelas 10 e 31A).

Tabela 10 Valores de Compostos Fenólicos Totais (%) da fração boia e cereja + verde de cafés antes e após a aplicação do “Cladosporin”. Lavras, 2012.

Estádios	Compostos Fenólicos Totais (%)		CV (%)
	Ano 1	Ano 2	
Boia	4,90 a A	5,53 b A	3,52
Cereja + Verde	4,96 a A	5,89 b B	3,51
CV (%)	3,25	3,98	

* Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

No primeiro ano, não ocorreu interação significativa entre doses do “Cladosporin” e número de aplicações (Tabelas 11 e 39A), sendo evidenciadas somente diferenças entre as doses estudadas (Figura 7A).

De acordo com o teste de regressão (Figura 7A), com o aumento das doses do “Cladosporin” nos frutos, houve um ligeiro aumento no teor de compostos fenólicos totais nos grãos.

Tabela 11 Valores de Compostos Fenólicos Totais (%) da fração boia em cafês antes e após a aplicação do “Cladosporin”. Lavras, 2012.

Tratamentos	Compostos Fenólicos Totais (%)		
	Ano 1	Ano 2	
	Número de aplicações	Número de aplicações	
	-	1	2
0	4,73	5,80 a*	5,80 a
1,0 Kg/ha	4,80	5,96 b	5,71 a
1,5 Kg/ha	4,86	5,63 b	5,26 a
2,0 Kg/ha	4,90	5,49 a	5,55 a
2,5 Kg/ha	5,10	5,50 a	5,47 a
3,0 Kg/ha	4,90	5,37 a	5,67 b
CV (%)	1,95	2,17	

No segundo ano, foi constatada a interação significativa entre as doses do “Cladosporin” e o número de aplicações (Tabelas 11 e 47A).

Os resultados teste de Tukey demonstraram que duas aplicações do “Cladosporin” proporcionaram valores médios de compostos fenólicos totais inferiores aos valores médios de somente uma aplicação, exceto na dose de 3,0Kg/ha.

Uma única aplicação ou em duas aplicações, os valores médios para essa variável sofreram redução com o aumento das doses do produto (Figura 7B e Figura 7C). Segundo Pereira, Pfenning e Castro (2005), o aumento gradual do fungo coincide com a conversão dos compostos fenólicos em açúcares facilitando a colonização interna do fruto e, como nessa fração os frutos se encontravam em sua maioria em estádios mais avançados de maturação, o aumento nas doses favoreceu a sua colonização e diminuição nos teores de compostos fenólicos totais.

Pimenta (1995) afirma que teores de fenólicos totais diminuem à medida que se intensifica o processo de maturação dos frutos e se mantém constante no

decorrer da secagem dos frutos na planta, inferindo que, no caso do café, um maior percentual de frutos cerejas nas misturas ou índices baixos de frutos verdes proporcionariam bebidas menos adstringentes e, conseqüentemente, de melhor qualidade, por isso a aplicação do “Cladosporin” aliada a uma maior permanência dos frutos na planta antes do início da queda no chão, seria desejável para manutenção de um menor teor desses compostos.

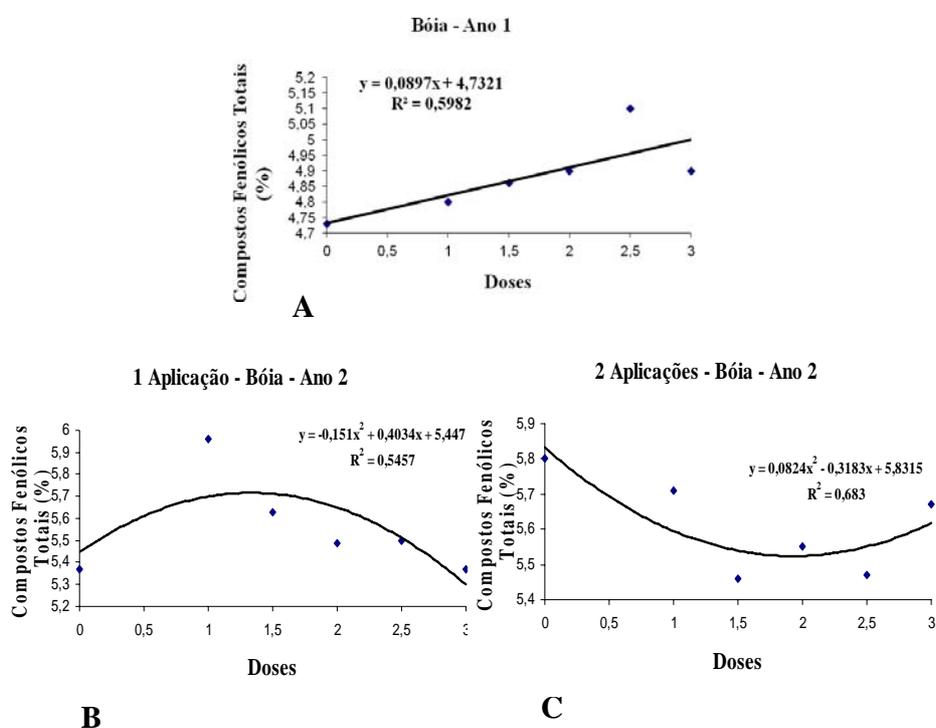


Figura 7 Valores de Compostos Fenólicos Totais (%) em cafés da fração boia antes e após a aplicação do “Cladosporin”. Lavras, 2012.

Para a fração cereja + verde, entre os dois anos, os resultados de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade apresentaram diferenças significativas entre os valores médios de compostos fenólicos totais, sendo o menor valor médio obtido no primeiro ano (Tabelas 10 e 55A).

Tais resultados podem ser decorrentes da aplicação do “Cladosporin” ter ocorrido em um número maior de frutos verdes no primeiro ano, pois como a região apresentava muita umidade, houve preocupação no sentido dos frutos passarem rapidamente do estágio verde cana para cereja, o que não ocorreu no segundo ano, onde as pulverizações do produto foram um pouco mais tardias.

No primeiro ano do ensaio, foi constatada a interação significativa entre as doses do “Cladosporin” ministradas e o número de aplicações do produto (Tabelas 12 e 63A).

Os resultados entre as duas aplicações não foram bem evidenciados, porém o tratamento que proporcionou menor teor de compostos fenólicos totais foi a dose de 1,0Kg/ha em uma única aplicação.

Os resultados mostraram que nas duas aplicações testadas os valores médios também foram crescentes, à medida que se aumentavam as doses do produto (Figura 8A e Figura 8B).

Tabela 12 Valores de Compostos Fenólicos Totais (%) da fração cereja + verde em cafés antes e após a aplicação do “Cladosporin”. Lavras, 2012.

Compostos Fenólicos Totais (%)				
Tratamentos	Ano 1		Ano 2	
	Número de Aplicações		Número de Aplicações	
	1	2	1	2
0	4,86 a*	4,86 a	5,47 a*	5,47 a
1,0 Kg/ha	4,80 a	4,92 b	6,14 a	6,06 a
1,5 Kg/ha	4,82 a	4,91 a	6,01 a	5,89 a
2,0 Kg/ha	4,85 a	4,92 a	5,87 a	6,40 b
2,5 Kg/ha	4,88 a	5,20 b	5,92 a	5,95 a
3,0 Kg/ha	5,05 a	5,10 a	5,92 a	5,91 a
CV (%)	1,66		1,74	

* Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

No segundo ano, o número de aplicações e as doses do “Cladosporin” apresentaram diferenças significativas (Tabelas 12 e 71A). Em praticamente todos os tratamentos, uma aplicação favoreceu um menor teor de compostos fenólicos totais, exceto na dose de 2,0Kg/ha em duas aplicações.

No segundo ano do estudo, a exemplo do primeiro, para a fração cereja + verde também ocorreu aumento nos valores médios dos compostos fenólicos totais com o aumento das doses do “Cladosporin” aplicadas, sendo o melhor tratamento, a dose de 2,0Kg/ha em somente uma aplicação (Figura 8C e Figura 8D).

Como o aumento nos teores de compostos fenólicos totais se apresentou juntamente com o aumento nas doses do “Cladosporin” aplicadas, pode-se sugerir que o fungo possui alguma substância que inibe a degradação desses compostos, pois na maioria dos tratamentos houve maior teor em relação à testemunha, por isso, seria importante um estudo mais detalhado sobre o tipo de

composto final que está compondo esses fenólicos totais para que se possa definir os reais efeitos do “Cladosporin” sobre esses compostos.

De acordo com os resultados apresentados, as menores doses em uma aplicação proporcionaram menores teores para as duas frações estudadas.

Ressalta-se, ainda, que apesar dos valores se apresentarem crescentes com o aumento das doses do Cladoporin nas duas frações, os teores de compostos fenólicos totais em todos os tratamentos foram semelhantes aos encontrados na literatura (CARVALHO JÚNIOR et al., 2003; LEITE; VILELA; CARVALHO, 1996).

Os resultados obtidos pelo teste de Tukey (Tabelas 10, 79A e 87A) demonstraram que, no primeiro ano, o teor médio de compostos fenólicos totais não diferiu entre as frações boia e cereja, porém, no segundo ano, na fração cereja + verde, os valores foram superiores à fração boia, provavelmente pela ocorrência de frutos verdes nessa fração, porém se encontram dentro dos valores comumente encontrados para café. Uma boa quantidade de compostos fenólicos é desejável, pois esses compostos têm recebido atenção como potenciais protetores contra doenças degenerativas crônicas em humanos (cataratas, degeneração muscular, doenças neurodegenerativas e diabetes mellitus), câncer e doença cardiovascular (PIMENTA, 1995; SCALBERT; JOHNSON; SALTMARSH, 2005).

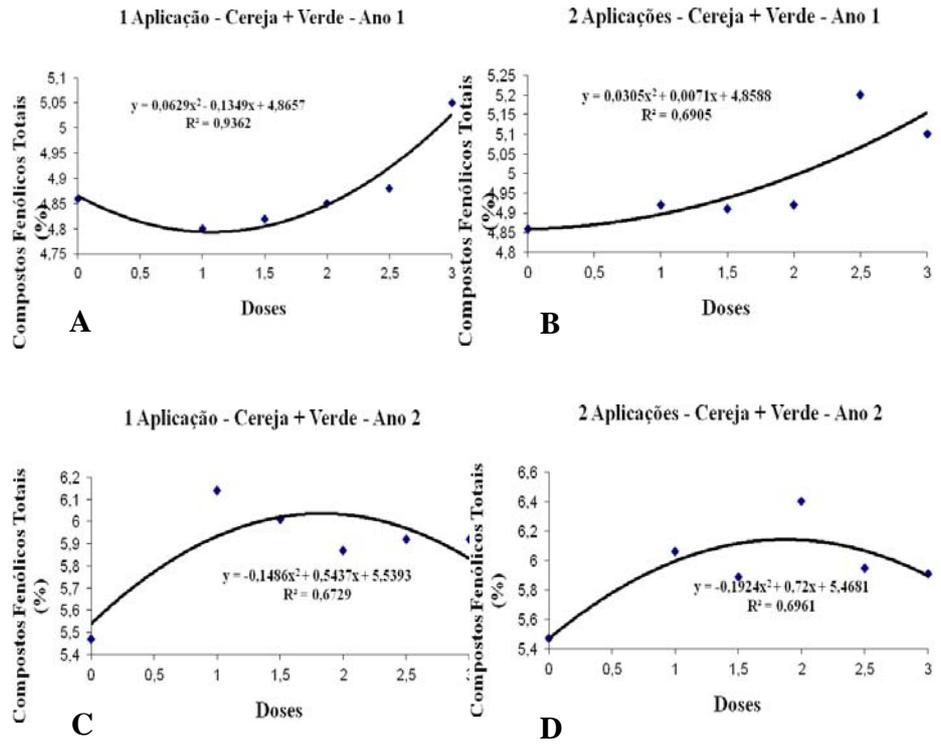


Figura 8 Valores de Compostos Fenólicos Totais (%) em cafês da fração cereja + verde antes e após a aplicação do “Cladosporin”. Lavras, 2012.

3.5 Massa de 50 grãos

O rendimento, isto é, a relação entre o massa de café beneficiado e o de café maduro ou seco é uma característica importante que compõe a economicidade da produção do cafeeiro. Essa característica influencia o custo final de produção do café, uma vez que afeta os gastos com colheita, secagem, manuseio, estocagem, infraestrutura de armazenamento, beneficiamento e outras operações (PEZZOPANE, 2003).

Para os dois anos avaliados o resultado apresentado pelo teste de Tukey demonstrou que o massa de 50 grãos na fração boia foi menor no segundo ano (Tabelas 13 e 32A).

Tabela 13 Valores de Massa de 50 grãos (g) da fração boia e cereja + verde de cafés antes e após a aplicação do “Cladosporin”. Lavras, 2012.

Estádios	Massa de 50 grãos (g)		CV (%)
	Ano 1	Ano 2	
Boia	7,27 a B	6,63 b A	2,78
Cereja + Verde	7,39 a A	6,70 b A	3,89
CV (%)	2,28	4,40	

* Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

No primeiro ano de avaliação, a interação entre as doses do “Cladosporin” e o número de aplicações foi significativa para a variável massa de 50 grãos na fração boia (Tabelas 14 e 40A).

O teste de médias demonstrou que entre o número de aplicações, as maiores doses proporcionaram maiores valores médios dessa variável com apenas uma aplicação do “Cladosporin”.

Observa-se que tanto em uma aplicação quanto em duas aplicações, os valores para o massa de 50 grãos foram crescentes com o aumento das doses do “Cladosporin”, de acordo com o teste de regressão (Figura 9A e Figura 9B), indicando que o fungo contribui para a preservação da integridade dos grãos, resultando num maior rendimento. Neste ano, 2,0Kg/ha em duas aplicações proporcionou maior teor para essa variável.

Tabela 14 Valores de Massa de 50 grãos (g) da fração boia em cafés antes e após a aplicação do “Cladosporin”. Lavras, 2012.

Tratamentos	Massa de 50 grãos (g)			
	Ano 1		Ano 2	
	Número de Aplicações		Número de Aplicações	
	1	2	1	2
0	6,93 a*	6,93 a	6,48 a*	6,48 a
1,0 Kg/ha	7,30 a	7,34 a	6,44 a	6,60 a
1,5 Kg/ha	7,10 a	7,33 a	6,83 a	6,79 a
2,0 Kg/ha	7,36 b	7,53 a	6,71 a	6,77 a
2,5 Kg/ha	7,45 a	7,26 b	6,80 a	6,55 b
3,0 Kg/ha	7,31 a	7,23 b	6,56 a	6,51 a
CV (%)	1,05		2,32	

* Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

No segundo ano, também ocorreu interação significativa para as doses aplicadas e o número de aplicações (Tabelas 14 e 48A) para a variável massa de 50 grãos na fração boia.

O resultado do teste de médias demonstrou que não houve diferença significativa para a maioria dos tratamentos com uma ou duas aplicações, exceto na dose de 2,5Kg/ha que apresentou melhor resultado com apenas uma aplicação.

Os resultados dos testes de regressão (Figura 9C e Figura 9D) mostraram que em uma aplicação ou em duas aplicações, na dose de 1,5Kg/ha foram os tratamentos que proporcionaram maiores valores de massa de 50 grãos.

Apesar dos valores médios terem decrescido nas maiores dosagens nos dois anos avaliados, ainda são superiores aos encontrados por Leite, Vilela e Carvalho (1996), para essa fração. Esses resultados indicam haver maior número de frutos secos na planta na época da colheita, característica da composição dos frutos nessa região (Capítulo 3).

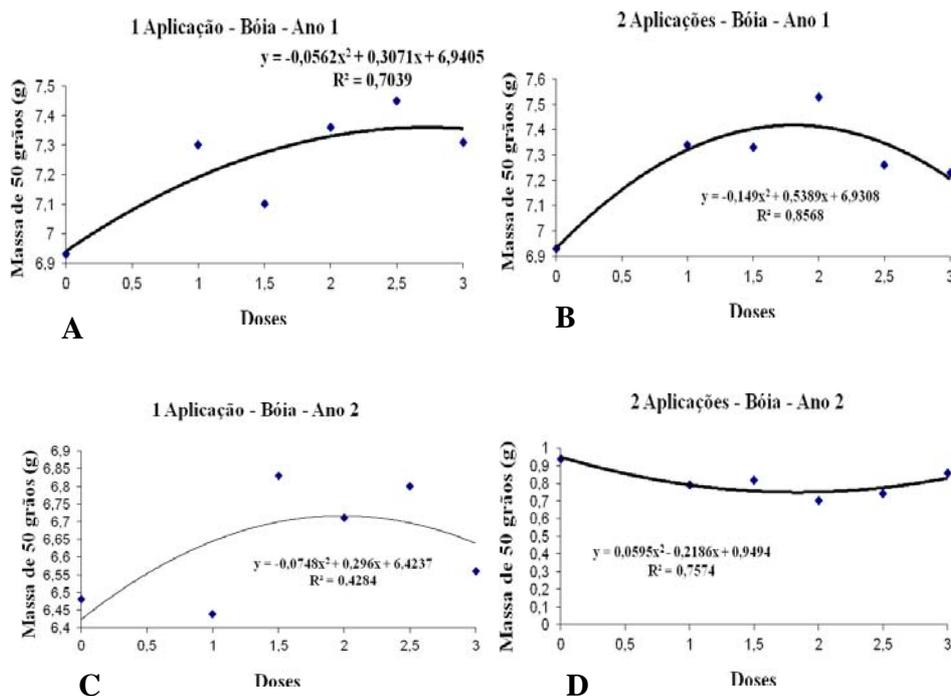


Figura 9 Valores de Massa de 50 grãos (g) em cafés da fração boia antes e após a aplicação do “Cladosporin”. Lavras, 2012.

Para a fração cereja + verde, o resultado do teste de Tukey demonstrou ter ocorrido menor valor médio para o massa de 50 grãos no segundo ano (Tabelas 13 e 56A).

No primeiro ano, o teste de médias demonstrou diferença somente na maior dose do “Cladosporin” com menor rendimento em duas aplicações (Tabela 15). A interação entre as doses do produto e o número de aplicações também foi evidenciada (Tabelas 15 e 64A).

Os resultados do teste de regressão (Figura 10) demonstraram que em uma aplicação, os valores médios da variável analisada foram crescentes com o aumento da dose do “Cladosporin” pulverizada (Figura 10A). Em duas aplicações também houve aumento nos teores com o aumento das doses do “Cladosporin”, exceto na maior dose (Figura 10B).

Tabela 15 Valores de Massa de 50 grãos (g) da fração cereja + verde em cafés antes e após a aplicação do “Cladosporin”. Lavras, 2012.

Tratamentos	Massa de 50 grãos (g)		
	Ano 1		Ano 2
	Número de Aplicações		Número de Aplicações
	1	2	-
0	7,15 a*	7,15 a	6,60
1,0 Kg/ha	7,51 a	7,50 a	6,75
1,5 Kg/ha	7,44 a	7,39 a	6,82
2,0 Kg/ha	7,42 a	7,45 a	6,85
2,5 Kg/ha	7,44 a	7,42 a	6,83
3,0 Kg/ha	7,52 a	7,23 b	6,82
CV (%)	0,85		5,07

* Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

No segundo ano, a análise estatística não detectou interação significativa entre os tratamentos, sendo observadas diferenças somente entre as doses do “Cladosporin” aplicadas (Tabelas 15 e 72A).

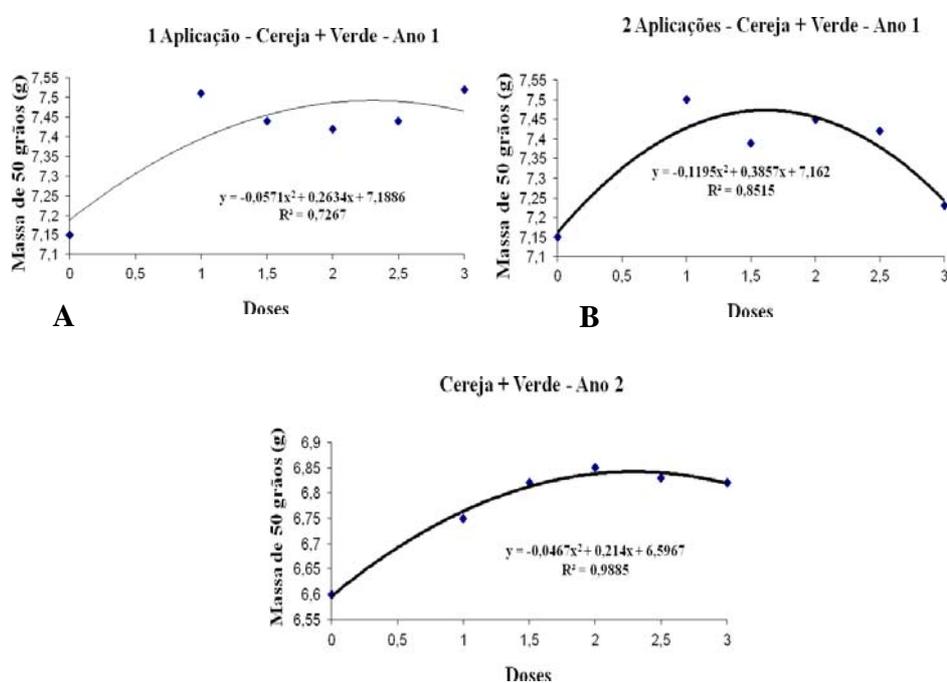


Figura 10 Valores de Massa de 50 grãos (g) em cafés da fração cereja + verde antes e após a aplicação do “Cladosporin”. Lavras, 2012.

À medida que se aumentou a dose do produto, houve também aumento nos valores do massa de 50 grãos (Figura 10C). Diante dos resultados, concluiu-se que para a fração cereja + verde, somente uma aplicação do “Cladosporin” na maior dose, proporciona maior rendimento dos grãos e que, ao se pensar em

rendimento, a aplicação do “Cladosporin” foi favorável sendo 2,0Kg/ha em apenas uma aplicação, o tratamento mais viável.

Apesar dos valores do massa de 50 grãos terem diferido entre os dois anos avaliados, os valores médios inferiores do segundo ano, estão acima dos valores médios encontrados por outros autores (LEITE; VILELA; CARVALHO, 1996; MALTA; PEREIRA; CHAGAS, 2005).

Esses menores valores médios podem ter ocorrido em decorrência de fatores climáticos adversos de um ano para o outro ou, também, pela adubação da lavoura que pode ter proporcionado menor enchimento dos grãos, pois os menores valores médios no segundo ano foram inferiores nas duas frações em relação ao ano 1.

Os resultados apresentados pelo teste de Tukey apontaram diferença significativa entre as frações boia e cereja + verde somente no primeiro ano (Tabelas 13, 80A e 88A).

O menor massa de 50 grãos na fração boia em relação a fração cereja + verde no primeiro ano, pode ser decorrente da presença de grãos brocados, chochos e mal granados que favorecem a diminuição do rendimento do café. No segundo ano, apesar da ocorrência de menor massa entre as duas frações, a diferença entre elas não foi evidenciada comprovando mais uma vez que a maior permanência do “Cladosporin” nos frutos, contribui para a melhoria da qualidade dos grãos. Esses menores valores foram em razão da maior permanência dos frutos na planta o que proporcionou maior quantidade de frutos secos.

3.6 Sólidos Solúveis

Os sólidos solúveis são constituídos por compostos solúveis em água, tais como açúcares, ácidos, vitamina C e algumas pectinas (OLIVEIRA et al., 1999) e utilizados como índice dos açúcares totais em frutos, indicando o grau de maturidade. No café, estão diretamente relacionados com o corpo da bebida e são constituintes desejáveis em quantidades elevadas (LOPES, 2000).

De acordo com os resultados obtidos pelo teste de Tukey, ocorreram diferenças significativas entre os valores médios de sólidos solúveis nos dois anos, demonstrando que, no segundo ano, o teor foi muito superior ao do primeiro ano (Tabelas 16 e 34A).

Tabela 16 Teores de Sólidos Solúveis (%) da fração boia e cereja + verde de cafês, antes e após a aplicação do “Cladosporin”. Lavras, 2012.

Sólidos Solúveis (%)			
Estádios	Ano 1	Ano 2	CV (%)
Boia	27,91 b A	36,14 a B	4,18
Cereja + Verde	27,81 b A	36,83 a A	5,26
CV (%)	6,47	3,24	

* Médias seguidas da mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Os resultados no primeiro ano não apontaram diferenças significativas entre as diferentes doses do “Cladosporin” e entre o número de aplicações. A interação entre as doses e número de aplicações também não foi significativa (Tabelas 17 e 42A). Portanto, para a fração boia o “Cladosporin” não proporcionou alterações nos teores de sólidos solúveis no primeiro ano, mas os valores estão dentro da faixa estipulada por Moraes et al. (1974) para café arábica que é de 23,85% a 27,31%.

Tabela 17 Teores de Sólidos Solúveis (%) da fração boia em cafês antes e após a aplicação do “Cladosporin”. Lavras, 2012.

Tratamentos	Sólidos Solúveis (%)			
	Ano 1		Ano 2	
	Número de Aplicações		Número de Aplicações	
	1	2	1	2
0	27,50 a*	27,50 a	36,25 a*	36,25 a
1,0 Kg/ha	27,50 a	28,12 a	36,25 a	36,25 a
1,5 Kg/ha	27,50 a	28,12 a	36,50 a	36,50 a
2,0 Kg/ha	27,50 a	29,37 a	36,25 a	37,00 a
2,5 Kg/ha	28,12 a	28,75 a	35,00 a	36,00 a
3,0 Kg/ha	28,12 a	27,75 a	35,00 a	35,62 a
CV (%)	4,68		2,97	

* Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Os resultados do segundo ano também não apresentaram diferenças significativas para as doses do “Cladosporin” aplicadas, para o número de aplicações do produto e também para a interação entre doses e número de aplicações (Tabelas 17 e 50A), porém como demonstrado pelo teste de Tukey (Tabelas 16 e 34A), os valores no segundo ano foram muito superiores aos do primeiro ano, inclusive superiores aos encontrados na literatura para a fração boia (CARVALHO JÚNIOR et al., 2003; SILVA et al., 2008). Como os tratamentos não diferenciaram da testemunha, mais uma vez se constata que o produto migrou para áreas adjacentes à experimental, favorecendo outras lavouras.

Diante desses resultados, pode-se concluir que o “Cladosporin” foi capaz de proporcionar aumento no teor médio de sólidos solúveis para a fração boia em todos os tratamentos no segundo ano.

Para a fração cereja + verde, os valores no segundo ano foram superiores aos encontrados no primeiro, de acordo com o teste de Tukey entre os anos (Tabelas 16 e 58A).

No primeiro ano, a interação entre doses do “Cladosporin” e número de aplicações apresentou diferença significativa no primeiro ano (Tabelas 18 e 66A).

Os resultados do teste de médias demonstraram que até a dose de 2,0Kg/ha não houve diferenças entre o número de aplicações. Nas maiores doses, duas aplicações promoveram maiores valores médios de sólidos solúveis nos grãos (Tabela 18).

Houve aumento nos valores médios de sólidos solúveis com o aumento das doses aplicadas em uma ou duas aplicações sendo o melhor tratamento, a aplicação do “Cladosporin” na dose de 3,0Kg/ha em duas aplicações (Figura 11A e Figura 11B).

Tabela 18 Teores de Sólidos Solúveis (%) da fração cereja + verde em cafês, antes e após a aplicação do “Cladosporin”. Lavras, 2012.

Tratamentos	Sólidos Solúveis (%)			
	Ano 1		Ano 2	
	Número de Aplicações		Número de Aplicações	
	1	2	1	2
0	25,00 a*	25,00 a	35,62 a*	35,62 a
1,0 Kg/ha	27,50 a	27,50 a	35,62 a	36,87 a
1,5 Kg/ha	27,50 a	27,50 a	36,25 a	37,50 a
2,0 Kg/ha	28,12 a	28,12 a	35,00 a	36,25 a
2,5 Kg/ha	26,87 b	31,87 a	36,87 a	37,50 a
3,0 Kg/ha	27,50 b	31,25 a	37,50 a	37,50 a
CV (%)	2,82		2,71	

* Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

No segundo ano, a interação entre doses do “Cladosporin” e o número de aplicações não foi significativa, sendo constatada diferenças para doses aplicadas e número de aplicações (Tabelas 18 e 74A).

Para uma aplicação, o teste de regressão (Figura 11C) mostrou que os valores médios apresentaram variações, sendo, inclusive semelhantes à testemunha em alguns tratamentos, indicando provavelmente haver nesses tratamentos, um maior número de frutos no estágio verde que contribuíram com esses menores valores.

Em duas aplicações (Figura 11D), os valores médios foram crescentes em relação à testemunha em todos os tratamentos com valores superiores aos encontrados em uma aplicação, indicando ter ocorrido maior quantidade de frutos cereja por causa do intervalo entre as aplicações, favorecendo maior ação do “Cladosporin”.

Tanto em uma quanto em duas aplicações, a maior dosagem do “Cladosporin” aplicada foi o melhor tratamento para o aumento no teor de sólidos solúveis nos grãos no estágio cereja + verde (Figura 11C e Figura 11D).

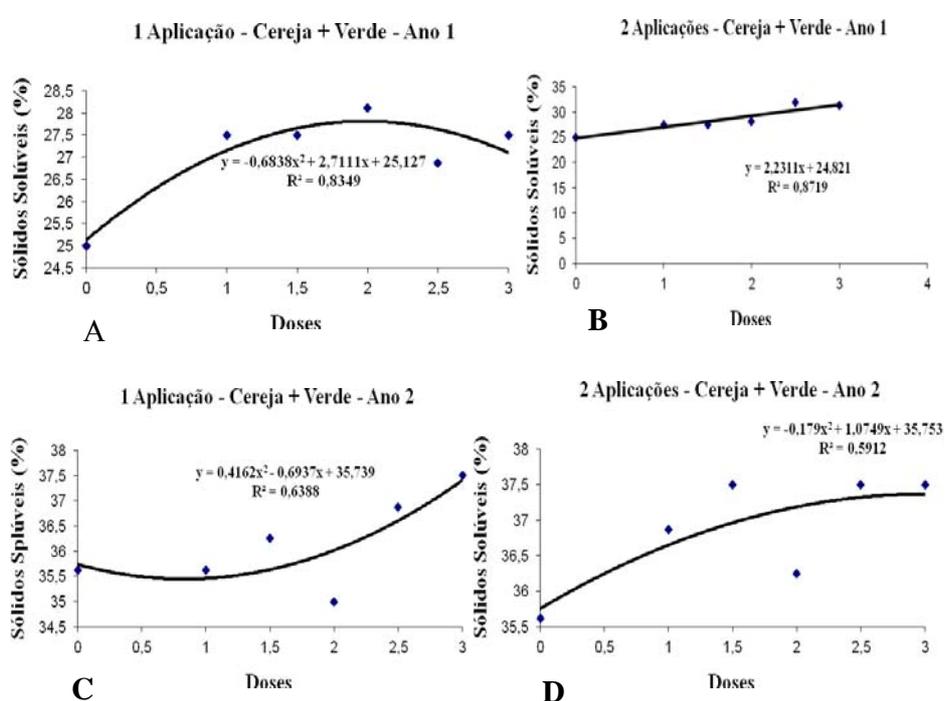


Figura 11 Teores de Sólidos Solúveis (%) em cafés da fração cereja + verde, antes e após a aplicação do “Cladosporin”. Lavras, 2012.

De acordo com o teste de Tukey, entre as frações boia e cereja + verde, nos dois anos do estudo, houve diferenças no teor de sólidos solúveis somente no segundo ano (Tabelas 16, 82A e 90A), onde a fração cereja + verde apresentou valor médio superior estatisticamente à fração boia pela sua constituição, com frutos no grau máximo de maturidade fisiológica.

3.7 Açúcares Totais

Os açúcares presentes nos grãos de café estão associados aos aminoácidos e proteínas sendo precursores de vários compostos voláteis e não voláteis. Durante o processo de torração, a sacarose é degradada por meio da reação de Maillard, ocorrendo o escurecimento e a degradação de Strecker, originando glicose e frutose, obtendo-se, como produtos, os açúcares caramelizados que são importantes substâncias responsáveis pela cor, viscosidade e corpo da bebida (BARRIOS, 2001).

Nos resultados, de acordo com o teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade, o valor médio de açúcares totais, no segundo ano, foi superior ao obtido no primeiro na fração boia (Tabelas 19 e 35A).

Tabela 19 Teores de Açúcares Totais (%) da fração boia e cereja + verde de cafês, antes e após a aplicação do “Cladosporin”. Lavras, 2012.

Açúcares Totais (%)			
Estádios	Ano 1	Ano 2	CV(%)
Boia	9,60 b A	10,26 a A	10,78
Cereja + Verde	8,37 b B	10,19 a A	11,81
CV (%)	8,78	10,08	

* Médias seguidas da mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

No primeiro ano, a interação entre as doses do “Cladosporin” e o número de aplicações foi significativa (Tabelas 20 e 43A). Observa-se pela Tabela 20 que em quase todos os tratamentos, duas aplicações proporcionaram valores médios de açúcares totais superiores aos de somente uma aplicação, indicando que a segunda reforçou o inóculo do *Cladosporium* nos frutos favorecendo seu maior desenvolvimento, diminuindo a ocorrência de fungos

fermentadores da mucilagem e, conseqüentemente, favorecendo um maior teor de açúcares nos grãos.

Os resultados do teste de regressão (Figura 12A e Figura 12B) mostraram que os valores de açúcares totais foram maiores em todos os tratamentos em relação à testemunha, tanto em uma quanto em duas aplicações, sendo a dose de 2Kg/ha, o tratamento com maior teor.

Já, neste primeiro ano, os valores foram superiores aos encontrados para esta fração em outros estudos (ABRAHÃO et al., 2009; REINATO et al., 2003).

Tabela 20 Teores de Açúcares Totais (%) da fração boia em cafés, antes e após a aplicação do “Cladosporin”. Lavras, 2012.

Tratamentos	Açúcares Totais (%)			
	Ano 1		Ano 2	
	Número de Aplicações		Número de Aplicações	
	1	2	1	2
0	8,00 a*	8,00 a	10,06 a*	10,06 a
1,0 Kg/ha	8,72 b	9,79 a	10,06 b	11,11 a
1,5 Kg/ha	9,35 a	9,72 a	11,05 a	10,16 b
2,0 Kg/ha	9,70 b	11,72 a	11,18 a	10,21 b
2,5 Kg/ha	9,00 b	11,32 a	12,44 a	8,83 b
3,0 Kg/ha	9,23 b	10,90 a	10,54 a	9,31 b
CV (%)	3,25		2,26	

* Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

No segundo ano, houve interação entre doses e número de aplicações (Tabelas 20 e 51A), porém as diferenças entre o número de aplicações não se apresentaram de forma definida. Os teores médios para açúcares totais foram maiores neste segundo ano em relação ao primeiro, indicando que o *Cladosporium* inserido no produto possui ação bioprotetora nos frutos contra micro-organismos nocivos à qualidade, proporcionando um maior teor de

açúcares, devendo ser aplicado anualmente, pois o “Cladosporin” proporciona aumento do inóculo de *Cladosporium* na área, fato constatado neste estudo, porque os resultados apontam que, ao contrário do primeiro ano, no segundo, somente uma aplicação favoreceu maior teor de açúcares totais na maioria dos tratamentos, o que evitou maior quantidade de micro-organismos nos frutos.

O resultado do teste de regressão (Figura 12) demonstrou que, neste segundo ano, apenas uma aplicação proporcionou melhores teores de açúcares totais com o aumento das doses (Figura 12C), ao contrário do ocorrido em duas aplicações que apresentaram valores decrescentes com o aumento das doses aplicadas (Figura 12D). Tal fato pode ser em razão da ocorrência de competição entre o *Cladosporium* e os micro-organismos maléficos à qualidade ou até mesmo entre o próprio fungo, concorrendo com o mesmo substrato, proporcionando diminuição nos teores dessa variável. Assim, apenas uma aplicação na dosagem de 2,5Kg/ha favoreceu maior teor de açúcar nos grãos.

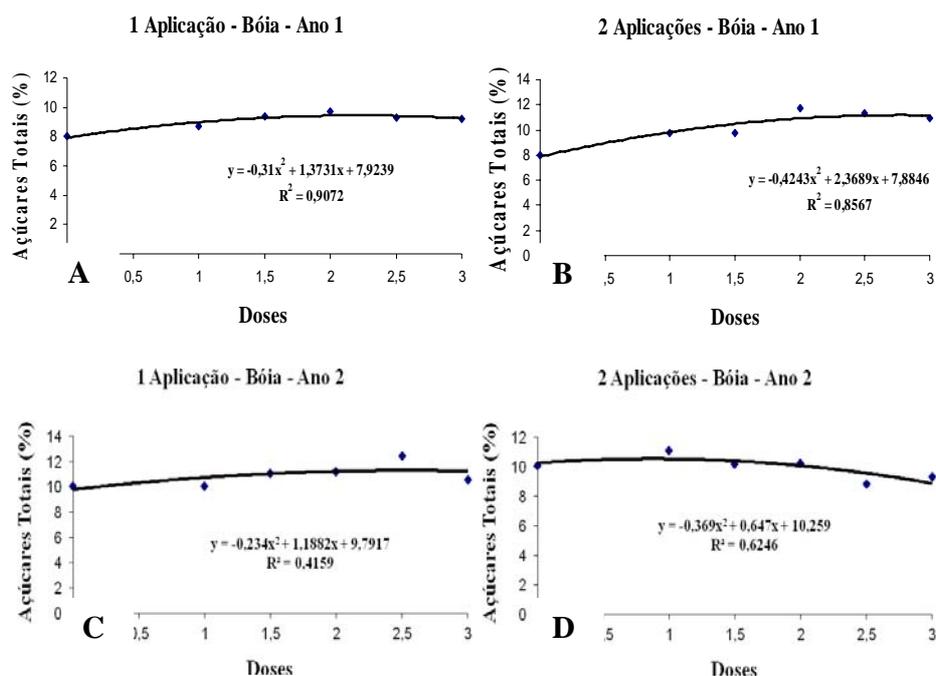


Figura 12 Teores de Açúcares Totais (%) em cafês da fração boia antes e após a aplicação do “Cladosporin”. Lavras, 2012.

Para a fração cereja + verde houve diferença significativa para a variável açúcares totais, entre os anos, de acordo com o teste de Tukey (Tabelas 19 e 59A), sendo os maiores teores obtidos no segundo ano.

No primeiro ano, os resultados do teste de Tukey demonstraram diferença significativa entre as doses do “Cladosporin” e o número de aplicações (Tabelas 21 e 67A).

Nas menores doses, não houve diferenças significativas nos valores médios entre uma ou duas aplicações, a partir de 2,0Kg/ha foram evidenciadas diferenças entre o número de aplicações, sendo os teores encontrados em duas

aplicações bastante inferiores aos teores de somente uma. Esses resultados mais uma vez sugerem competição por substrato ou espaço nos frutos entre os micro-organismos maléficos e o *Cladosporium* ou até mesmo entre o inóculo do próprio *Cladosporium*, pois, nesse estágio, o fruto se encontra com o máximo de maturação.

Os resultados do teste de regressão (Figura 12C e Figura 12D), apontaram que em uma ou duas aplicações do “Cladosporin” ocorreu aumento nos valores médios de açúcares totais com o aumento das doses aplicadas, exceto em uma aplicação onde na maior dose ocorreu diminuição no teor de açúcares. Assim, uma aplicação foi mais eficiente nesse primeiro ano, sendo o maior teor observado na dose de 2,5Kg/ha. Apesar dos valores serem baixos, em duas aplicações foram superiores aos encontrados por (MALTA; CHAGAS, 2008).

Tabela 21 Teores de Açúcares Totais (%) da fração cereja + verde em cafês, antes e após a aplicação do “Cladosporin”. Lavras, 2012.

Tratamentos	Açúcares Totais (%)			
	Ano 1		Ano 2	
	Número de Aplicações		Número de Aplicações	
	1	2	1	2
0	7,00 a*	7,00 a	9,23 a*	9,23 a
1,0 Kg/há	7,54 a	7,04 a	10,97 a	9,52 b
1,5 Kg/há	8,20 a	7,26 a	10,87 a	9,25 b
2,0 Kg/há	10,89 a	7,73 b	11,23 a	11,43 a
2,5 Kg/há	10,06 a	8,35 b	9,83 a	9,43 a
3,0 Kg/há	8,84 b	9,37 a	9,62 b	11,62 a
CV (%)	1,23		2,75	

* Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

No segundo ano, o teste de Tukey apontou diferença significativa entre as doses do “Cladosporin” e o número de aplicações (Tabelas 21 e 75A). Observa-se que os maiores teores foram obtidos em apenas uma aplicação do “Cladosporin” nas menores doses, não diferindo nas doses intermediárias, sendo inferior somente na maior dose.

De acordo com o teste de regressão (Figura 13), esses resultados mais uma vez sugerem a competição entre os micro-organismos, já que foram decrescentes com o aumento das doses em uma aplicação (Figura 13A) ou ainda pela constituição dos tratamentos com maior número de frutos cereja no momento da colheita, pois os valores apresentaram oscilações. Mesmo assim, para esse ano os valores encontrados foram superiores aos do primeiro em todos os tratamentos, indicando que o produto proporcionou melhor qualidade aos grãos. Observa-se também que 2,0Kg/ha em uma aplicação proporcionou teores de açúcares totais satisfatórios para essa fração nos dois anos (Figura 13A e Figura 13B).

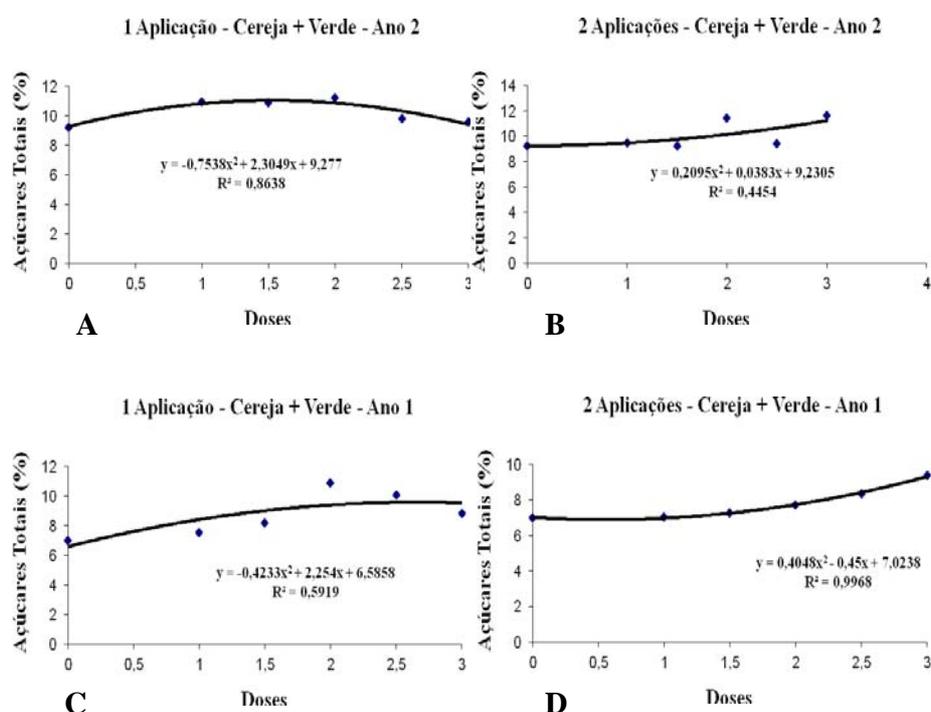


Figura 13 Teores de Açúcares Totais (%) em cafés da fração cereja + verde, antes e após a aplicação do “Cladosporin”. Lavras, 2012.

Os resultados do teste de Tukey entre as frações boia e cereja + verde para cada ano (Tabelas 19, 83A e 91 A), apontaram diferenças significativas somente no primeiro ano, onde a fração boia apresentou maior teor médio de açúcares totais em relação a fração cereja + verde, indicando que, possivelmente, havia grande quantidade de frutos verdes nessa fração no momento da colheita, o que não ocorreu no segundo ano, onde as médias foram estatisticamente iguais para as duas frações, provavelmente em razão da colheita ter sido realizada um pouco mais tardia, favorecendo um número maior de frutos

no estádio cereja. Observa-se ainda que a aplicação do “Cladosporin” favoreceu a fração boia que apresentou teores médios satisfatórios nos dois anos avaliados.

3.8 Acidez Titulável Total

Os resultados do teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade não demonstraram diferenças entre os valores médios de acidez titulável total entre os dois anos para a fração boia (Tabelas 22 e 34A), indicando que a aplicação manteve os níveis em todos os tratamentos.

Tabela 22 Valores de Acidez Titulável Total (NaOH 0,1N/100g) da fração boia e cereja + verde de cafés, antes e após a aplicação do “Cladosporin”. Lavras, 2012.

Acidez Titulável Total (NaOH 0,1N/100g)			
Estádios	Ano 1	Ano 2	CV (%)
Boia	227,08 a A	228,12 a A	10,99
Cereja + Verde	223,92 a A	221,87 a A	9,49
CV (%)	11,29	11,19	

* Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

No primeiro ano avaliado, nenhuma diferença foi detectada entre as diferentes doses do “Cladosporin”, entre o número de aplicações e nem a interação entre doses e número de aplicações (Tabelas 23 e 41A).

Tabela 23 Valores de Acidez Titulável Total (NaOH 0,1N/100g) da fração boia, em cafés antes e após a aplicação do “Cladosporin”. Lavras, 2012.

Acidez Titulável Total (NaOH 0,1N/100g)				
Tratamentos	Ano 1		Ano 2	
	Número de Aplicações		Número de Aplicações	
	1	2	1	2
0	225,00 a*	225,00 a	250,00 a	250,00 a
1,0 Kg/ha	250,00 a	225,00 a	225,00 a	212,50 a
1,5 Kg/ha	250,00 a	225,00 a	225,00 a	225,00 a
2,0 Kg/ha	225,00 a	212,50 a	225,00 a	225,00 a
2,5 Kg/ha	225,00 a	225,00 a	225,00 a	225,00 a
3,0 Kg/ha	212,50 a	225,00 a	225,00 a	225,00 a
CV (%)	10,55		8,20	

* Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

No segundo ano de aplicação do “Cladosporin”, os resultados da análise estatística apontaram diferenças significativas somente para doses aplicadas (Tabelas 23 e 49A).

De acordo com a Figura 14, todos os tratamentos com somente uma aplicação e todos os tratamentos com duas aplicações do “Cladosporin” proporcionaram diminuição nos teores de acidez titulável total em relação à testemunha (Figura 14Ae Figura 14B). Assim, já na menor dose com apenas uma aplicação o produto se mostrou eficiente na redução dessa variável.

A acidez percebida no café é um importante atributo para a análise sensorial da bebida. Sua intensidade varia em função do estágio de maturação dos frutos, local de origem, tipo de colheita, forma de processamento e condições climáticas durante a colheita e secagem (SIQUEIRA; ABREU, 2006), sendo os defeitos responsáveis pela elevação da acidez do café, principalmente os pretos e ardidos (COELHO, 2000). Portanto, a diminuição nos teores médios

nos tratamentos em que houve aplicação do “Cladosporin”, sugere a ocorrência de menor número de defeitos e, consequentemente, cafés de melhor qualidade.

Apesar dos teores terem diminuído com o aumento das doses do produto nesse segundo ano, os valores médios estão muito acima dos valores encontrados na literatura para essa fração (CARVALHO JÚNIOR et al., 2003; SILVA et al., 2008).

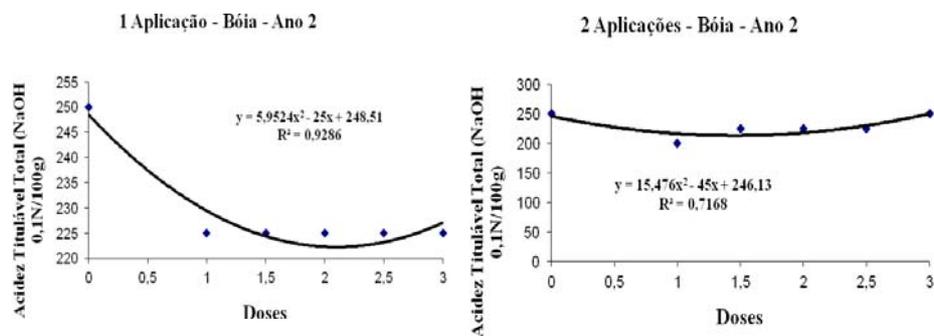


Figura 14 Valores de Acidez Titulável Total (NaOH 0,1N/100g) em cafés da fração boia, antes e após a aplicação do “Cladosporin”. Lavras, 2012.

Para a fração cereja + verde, os resultados obtidos por meio do teste de Tukey entre os dois anos avaliados não apresentaram diferenças significativas (Tabelas 22 e 57A).

Diferenças significativas entre doses do “Cladosporin”, número de aplicações e a interação entre doses e número de aplicações também não apresentaram diferenças significativas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade nos dois anos do experimento (Tabelas 24 e 65A e 73A).

Tabela 24 Valores de Acidez Titulável Total (NaOH 0,1N/100g) da fração cereja + verde em cafês antes e após a aplicação do “Cladosporin”. Lavras, 2012.

Tratamentos	Acidez Titulável Total (NaOH 0,1N/100g)			
	Ano 1		Ano 2	
	Número de Aplicações		Número de Aplicações	
	1	2	1	2
0	225,00 a*	225,00 a	225,00 a	225,00 a
1,0 Kg/ha	225,00 a	225,00 a	237,50 a	225,00 a
1,5 Kg/ha	225,00 a	225,00 a	212,50 a	225,00 a
2,0 Kg/ha	212,50 a	225,00 a	212,50 a	225,00 a
2,5 Kg/ha	225,00 a	225,00 a	225,00 a	225,00 a
3,0 Kg/ha	225,00 a	225,00 a	212,50 a	212,50 a
CV (%)	9,49		11,22	

* Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Diante dos resultados, o produto “Cladosporin” não alterou os teores de acidez titulável total nessa fração nos dois anos avaliados, porém, os valores estão muito acima dos encontrados por outros autores (CARVALHO JÚNIOR et al., 2003; SILVA et al., 2008). Tal fato pode ser decorrente do fator climático da região ou, também, pela grande porcentagem de frutos verdes em todos os tratamentos no momento da colheita (em média 31%), conforme discutido no capítulo 3, além, ainda, da possível ocorrência de fermentações durante a secagem. Os teores entre as frações boia e cereja + verde não apresentaram diferenças significativas nos dois anos avaliados (Tabelas 22, 81A e 89A).

Como os valores médios de acidez titulável não diferiram entre as frações, pode-se concluir que a constituição da fração cereja + verde foi a responsável por essa semelhança, pois em concentrações menores de frutos verdes, os valores de acidez titulável para essa fração geralmente são superiores

à fração boia. Assim, pode-se concluir que o “Cladosporin” foi eficiente na preservação da qualidade dos grãos das duas frações estudadas.

3.9 Perfil de Ácidos Orgânicos

Os resultados do perfil de ácidos orgânicos encontrados nas frações boia e cereja + verde estão inseridos nas Tabelas 25 e 26.

Tabela 25 Perfil de Ácidos Orgânicos (%) da fração boia de cafês, antes e após a aplicação do “Cladosporin” no ano agrícola 2009/2010. Lavras, 2012.

Tratamentos	Ácidos Orgânicos (%)*					
	1	2	3	4	5	6
0	traços	0,1	traços	0,8	0,38	0,36
1,0 Kg/ha 1apl.	traços	0,1	traços	0,9	0,38	0,36
1,0 Kg/ha 2 apl.	traços	0,1	traços	0,9	0,37	0,36
1,5 Kg/ha 1apl.	traços	0,1	traços	0,9	0,37	0,36
1,5 Kg/ha 2apl.	traços	0,1	traços	0,9	0,37	0,35
2,0 Kg/ha 1apl.	traços	0,1	traços	1,0	0,6	0,4
2,0 Kg/ha 2apl.	traços	0,1	traços	1,0	0,6	0,4
2,5 Kg/ha 1apl.	traços	0,1	traços	1,0	0,6	0,4
2,5 Kg/ha 2apl.	traços	0,1	traços	1,0	0,6	0,4
3,0 Kg/ha 1apl.	traços	0,1	traços	1,2	0,6	0,4
3,0 Kg/ha 2 apl.	traços	0,1	traços	1,2	0,6	0,4

1 – Ácido Fórmico; 2- Ácido Acético; 3 – Ácido Lático; 4 – Ácido Cítrico; 5- Ácido Málico; 6 – Ácido Quínico.

Tabela 26 Perfil de Ácidos Orgânicos da fração cereja + verde de cafês, antes e após a aplicação do “Cladosporin” no ano agrícola 2009/20010. Lavras, 2012.

Tratamentos	Ácidos Orgânicos*					
	1	2	3	4	5	6
0	traços	0,1	traços	0,7	0,38	0,37
1,0 Kg/ha 1apl.	traços	0,1	traços	0,7	0,3	0,3
1,0 Kg/ha 2 apl.	traços	0,1	traços	0,8	0,4	0,4
1,5 Kg/ha 1apl.	traços	0,1	traços	0,8	0,4	0,4
1,5 Kg/ha 2apl.	traços	0,1	traços	0,9	0,4	0,4
2,0 Kg/ha 1apl.	traços	0,1	traços	0,9	0,3	0,3
2,0 Kg/ha 2apl.	traços	0,1	traços	0,9	0,4	0,4
2,5 Kg/ha 1apl.	traços	0,1	traços	0,9	0,35	0,36
2,5 Kg/ha 2apl.	traços	0,1	traços	0,8	0,31	0,32
3,0 Kg/ha 1apl.	traços	0,1	traços	0,9	0,37	0,35
3,0 Kg/ha 2 apl.	traços	0,1	traços	0,9	0,37	0,35

1 – Ácido Fórmico; 2- Ácido Acético; 3 – Ácido Lático; 4 – Ácido Cítrico; 5- Ácido Málico; 6 – Ácido Quínico.

Apesar de os resultados do teste de regressão terem demonstrado que os teores médios de acidez titulável total diminuíram em relação à testemunha na fração boia (Figura 15), pode-se observar que os teores dos ácidos cítrico e málico variaram, apresentando aumento nas porcentagens, juntamente com o aumento das doses do “Cladosporin” pulverizadas, tanto em uma como em duas

aplicações (Tabela 25). Esse aumento proporcionou acidez mais suave o que acarretou nos menores valores médios encontrados na acidez total, pois segundo Pimenta et al. (2008b), os principais ácidos do café são o málico e cítrico, que são responsáveis por uma acidez desejável, proporcionando sabor ácido característico do produto, porém a ocorrência de fermentações pode alterar a acidez, sabor, aroma e cor desses grãos.

Na fração cereja + verde os teores de acidez titulável total não variaram entre os diferentes tratamentos, mas os valores dos ácidos cítrico e málico foram mais estáveis entre os tratamentos, porém superiores ao valor médio encontrado na testemunha (Tabela 26).

Os ácidos fórmico, acético e láctico foram encontrados em quantidades muito inferiores aos ácidos desejáveis (Tabelas 25 e 26). Micro-organismos consomem açúcares presentes na mucilagem e são capazes de produzir álcool, que é desdobrado em ácido acético, láctico, propiônico e butírico, sendo os dois últimos, os maiores causadores de prejuízos na qualidade da bebida (CHALFOUN, 1996). A ausência dos ácidos propiônico e butírico em todos os tratamentos indica que o “Cladosporin” foi capaz de promover diminuição de fermentações não desejáveis nos frutos.

Segundo dados da literatura, os principais ácidos carboxílicos voláteis encontrados no café torrado são o ácido acético (0,3%), o ácido fórmico (0,1%) e o ácido propanóico (0,01%) (STRATEN; BEAUVESER; VISSCHER, 1985). O ácido acético e o ácido fórmico são relacionados a um odor penetrante e irritante, sendo que o primeiro é mais comumente associado ao odor de vinagre (HOLSCHER; VITZTHUM; STEINHART, 1990). Sofrem redução à medida que o tempo de torrefação aumenta, sendo que essa diminuição está associada a volatilização dos mesmos (MOREIRA; TRUGO; MARIA, 2000). Assim, a

ocorrência dos ácidos fórmico e acético nas amostras pode não ser considerada um prejuízo à qualidade, pois além dos teores terem ocorrido em porcentagens inferiores às relatadas na literatura, ainda irão sofrer redução por ocasião da torração.

A presença de ácido quínico é desejável, pois os ácidos clorogênicos, compostos que têm chamado a atenção em razão da sua atividade anticancerígena comprovada para alguns tipos de câncer (MATTILA; KUMPULAINEN, 2002) e a sua ação benéfica no combate a doenças cardiovasculares pelas suas propriedades antioxidantes (DEL CASTILHO; AMES; GORDON, 2002) são formados, principalmente, pela esterificação do ácido quínico com os ácidos cafeico, ferúlico ou p-cumárico (TAVARES; FERREIRA, 2006).

Na fração boia (Tabela 25), os teores de ácido quínico foram superiores nas maiores dosagens e na fração cereja + verde (Tabela 26), os valores médios de ácido quínico não apresentaram comportamento definido. Tais resultados podem ser decorrentes da constituição das frações, provavelmente com um número maior de frutos verdes nos tratamentos onde os resultados para esse ácido foram superiores. Rogers et al. (1999) ressaltam que o decréscimo do ácido quínico, conforme o desenvolvimento do grão está relacionado com o metabolismo do teor de ácido clorogênico, por se tratar do precursor da sua síntese, comportamento que vai influenciar diretamente na qualidade da bebida.

Tais resultados novamente evidenciam a eficácia do produto na melhoria da qualidade para as duas frações estudadas e destaca mais uma vez a importância da maior permanência dos frutos em contato com o “Cladosporin”, pois os resultados favoráveis foram mais evidenciados na fração boia.

3.10 Compostos Bioativos

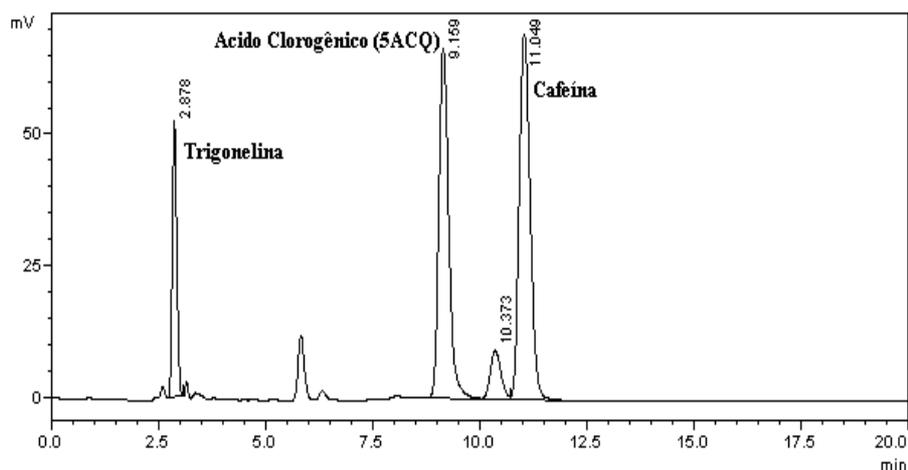


Figura 15 Picos dos compostos bioativos Cafeína, Trigonelina e Ácido Clorogênico (5ACQ) em cafés, antes e após a aplicação do “Cladosporin” no ano agrícola 2009/2010. Lavras, 2012.

3.10.1 Cafeína

A cafeína é um alcalóide farmacologicamente ativo, pertencente ao grupo das xantinas e suas principais fontes alimentares são café, mate e guaraná (ARNAUD, 1999). Possui efeitos fisiológicos sendo estimulante e bastante estável com a torração (ILLY; VIANI, 1995).

De acordo com os resultados apresentados pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, para a fração boia, houve diferença significativa para o

número de aplicações entre as diferentes doses e, também, para a interação entre os diferentes tratamentos (Tabelas 27 e 92A).

Observa-se que na maioria dos tratamentos, os teores de cafeína foram menores em uma aplicação, exceto na maior dose do “Cladosporin” (3,0Kg/ha), pois não houve diferença significativa para número de aplicações. Os menores valores encontrados na maioria dos tratamentos com uma aplicação pode ser decorrente da maior presença de fungos deletérios à qualidade, pois estudos demonstram que alguns micro-organismos possuem a capacidade de degradar a cafeína (TAGLIARI et al., 2003).

Apesar de ser considerada tóxica para a maioria dos micro-organismos, alguns possuem a habilidade de se desenvolverem na sua presença e capacidade de degradá-la, sendo que vários trabalhos investigam a utilização da cafeína como fonte de energia para o crescimento deles (MAZZAFERA; OLSSON; SANDBERG, 1994). *Penicillium* e *Aspergillus* são os gêneros fúngicos mais frequentemente encontrados como degradadores de cafeína e entre as bactérias, destaca-se o gênero *Pseudomonas* (HAKIL et al., 1999).

Diante desse fato, os maiores valores em duas aplicações pode ser atribuído ao maior inóculo de *Cladosporium* nos frutos, resultando em uma maior bioproteção do café e, conseqüentemente, apresentando maiores teores de cafeína.

Tabela 27 Teores de Cafeína (%) da fração boia em cafês, antes e após a aplicação do “Cladosporin” no ano agrícola 2009/2010. Lavras, 2012.

Tratamentos	Cafeína (%)	
	Número de Aplicações	
	1	2
0	1,19* a	1,19 a
1,0 Kg/ha	1,09 b	1,29 a
1,5 Kg/ha	1,09 b	1,29 a
2,0 Kg/ha	1,19 b	1,29 a
2,5 Kg/ha	1,19 b	1,29 a
3,0 Kg/ha	1,19 a	1,19 a
CV (%) = 2,12		

* Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Na Figura 16 demonstra-se que os valores em uma aplicação foram semelhantes a testemunha na maioria dos tratamentos (Figura 16A) ao contrário de duas aplicações onde os valores foram superiores a testemunha, exceto na maior dose do produto aplicada (Figura 16B).

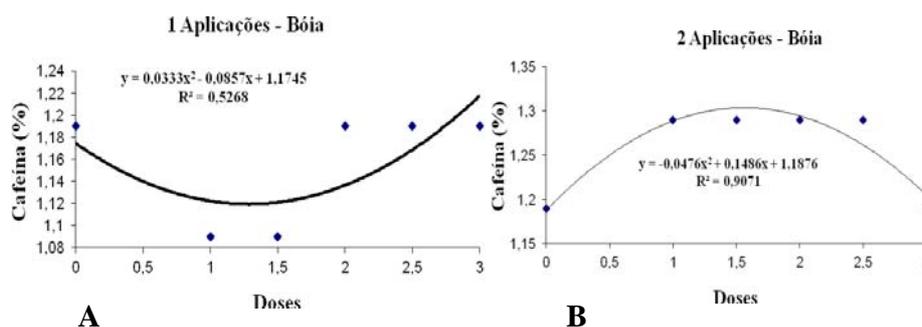


Figura 16 Teores de Cafeína (%) em cafés da fração boia antes e após a aplicação do “Cladosporin” no ano agrícola 2009/2010. Lavras, 2012.

Para a fração cereja + verde houve diferença significativa entre o número de aplicações. A interação entre doses aplicadas e número de aplicações também foi evidenciada (Tabelas 28 e 95A).

Em uma aplicação a maioria dos tratamentos apresentou maiores valores quando comparados a duas aplicações do “Cladosporin”, exceto na maior dose o que pode ser decorrente de um maior número de frutos no estágio verde, porém, mais uma vez evidenciou-se a possível degradação da cafeína por microorganismos, pois em uma aplicação (Figura 17A), os valores foram decrescentes com o aumento das doses aplicadas.

Em duas aplicações, o teste de regressão (Figura 17B) apresentou menores valores em relação a uma aplicação e em relação a testemunha, possivelmente por ter maior número de frutos cereja na época da segunda aplicação. Pimenta (1995) também encontrou menores teores de cafeína no

estádio cereja em relação ao estágio verde. Os valores mais estáveis demonstram novamente o efeito bioprotetor do “Cladosporin” na qualidade do café.

Tabela 28 Teores de Cafeína (%) da fração cereja + verde em cafés, antes e após a aplicação do “Cladosporin” no ano agrícola 2009/2010. Lavras, 2012.

Tratamentos	Cafeína (%)	
	Número de Aplicações	
	1	2
0	1,39* a	1,39 a
1,0 Kg/ha	1,49 a	1,19 b
1,5 Kg/ha	1,29 a	1,19 b
2,0 Kg/ha	1,39 a	1,09 b
2,5 Kg/ha	1,19 a	1,09 b
3,0 Kg/ha	1,19 a	1,19 a
CV (%) = 1,76		

* Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

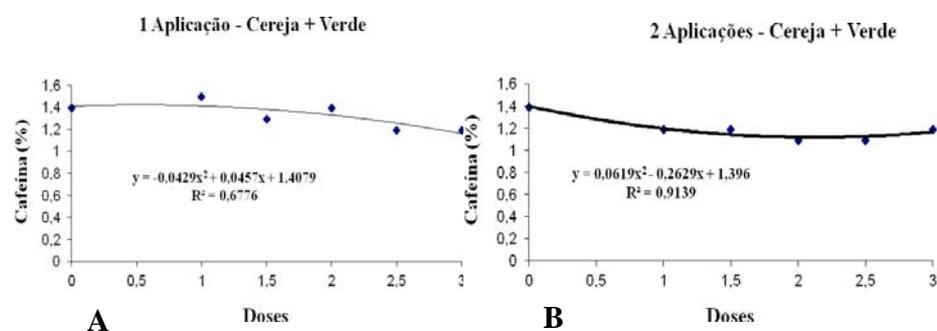


Figura 17 Teores de Cafeína (%) em cafés da fração cereja + verde, antes e após a aplicação do “Cladosporin” no ano agrícola 2009/2010. Lavras, 2012.

Tabela 29 Teores de Cafeína (%) da fração boia e cereja + verde em cafés antes e após a aplicação do “Cladosporin” no ano agrícola 2009/2010. Lavras, 2012.

Cafeína (%)	
Boia	Cereja + Verde
1,22* a	1,26 a
CV (%) = 8,60	

* Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Segundo Carvalho et al. (1983), o café arábica contém, em média, 1,2% de cafeína. Apresenta valores na faixa de 0,6 a 1,5% em grãos provenientes de frutos colhidos em diferentes estádios de maturação (TANGO, 1971) e diferentes cultivares (MENDONÇA, 2004).

Apesar de apresentarem comportamentos diferenciados, os valores médios entre as duas frações não apresentaram diferenças significativas (Tabelas 29 e 99A) sendo, os resultados semelhantes aos de outros estudos.

3.10.2 Trigonelina

A importância de compostos não-voláteis do café como a trigonelina está relacionada com a função desta como precursora de outros compostos voláteis que contribuem para o sabor e aroma do café torrado (MALTA; CHAGAS, 2009).

Para a fração boia houve diferença significativa entre o número de aplicações de acordo com o teste de Tukey. A interação entre doses e número de aplicações também apresentou diferenças (Tabelas 30 e 93A). Não foi possível determinar qual número de aplicação foi o mais eficiente, pois os valores médios não apresentaram comportamento definido, porém se apresentaram dentro da faixa proposta por Illy e Viani (1995) que é de 0,6% a 1,2%.

Tabela 30 Teores de Trigonelina (%) da fração boia em cafés, antes e após a aplicação do “Cladosporin” no ano agrícola 2009/2010. Lavras, 2012.

Tratamentos	Trigonelina (%)	
	Número de Aplicações	
	1	2
0	0,86* a	0,86 a
1,0 Kg/ha	0,86 b	1,01 a
1,5 Kg/ha	0,82 b	0,94 a
2,0 Kg/ha	0,92 a	0,85 b
2,5 Kg/ha	0,78 b	0,95 a
3,0 Kg/ha	0,80 a	0,73 b
CV (%) = 1,14		

* Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Em uma aplicação, o comportamento dos teores médios não apresentou tendência definida, pois os valores foram crescentes e decrescentes com o aumento das doses aplicadas e não se ajustaram bem aos modelos linear e quadrático (Figura 18A). Com duas aplicações pode-se observar que os valores foram crescentes com o aumento das doses aplicadas exceto na maior dose (Figura 18B).

Um maior teor de trigonelina nos grãos verdes é desejável, principalmente porque durante a torração sofre intensa degradação térmica, gerando uma série de compostos voláteis importantes para o sabor e aroma da bebida, degradando-se rapidamente e sofrendo desmetilação formando diversos compostos voláteis como as piridinas, o N-metilpirrol e uma vitamina importante para o metabolismo humano, a niacina (ALVES et al., 2006).

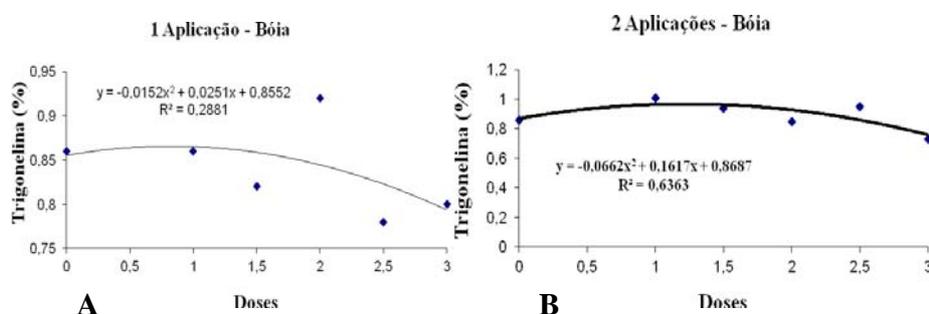


Figura 18 Teores de Trigonelina (%) em cafés da fração boia, antes e após a aplicação do “Cladosporin” no ano agrícola 2009/2010. Lavras, 2012.

Para a fração cereja + verde, houve diferença significativa entre o número de aplicações de acordo com o teste de médias. A interação entre número de aplicações e doses também apresentou diferença significativa

(Tabelas 31 e 96A). Os resultados para uma ou duas aplicações foram muito variáveis entre os tratamentos, porém estão dentro da faixa encontrada para café (ILLY; VIANI, 1995).

Tabela 31 Teores de Trigonelina (%) da fração cereja + verde em cafés antes e após a aplicação do “Cladosporin” no ano agrícola 2009/2010. Lavras, 2012.

Tratamentos	Trigonelina (%)	
	Número de Aplicações	
	1	2
0	0,94* a	0,94 a
1,0 Kg/ha	1,03 a	0,79 b
1,5 Kg/ha	0,59 b	0,82 a
2,0 Kg/ha	0,90 a	0,70 b
2,5 Kg/ha	0,76 a	0,74 b
3,0 Kg/ha	0,80 b	0,86 a
CV (%) = 0,31		

* Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Em uma aplicação, a exemplo da fração boia, o comportamento dos teores médios de trigonelina não apresentou tendência definida, pois os valores foram crescentes e decrescentes com o aumento das doses aplicadas e não se ajustaram bem aos modelos linear e quadrático (Figura 19A). Com duas aplicações, apesar dos valores terem sido inferiores à testemunha, foram mais estáveis nos diferentes tratamentos (Figura 19B).

A observação da diminuição dos teores de trigonelina com o aumento das doses do produto pode ser objeto de estudos futuros visando a observar a relação entre micro-organismos e sua possível degradação, pois na literatura consultada não foram encontrados trabalhos relacionados com o tema.

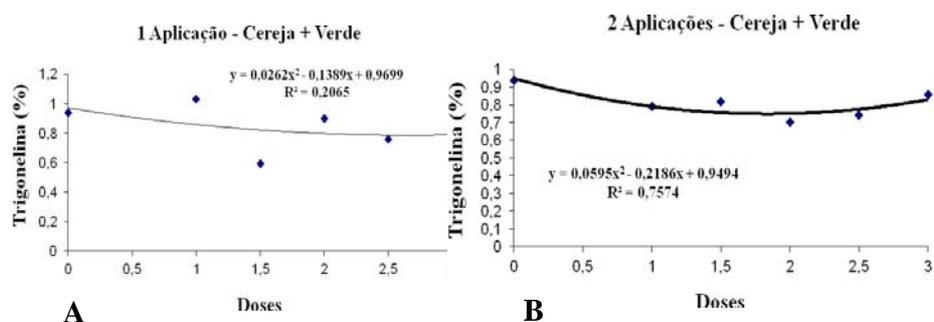


Figura 19 Teores de Trigonelina (%) em cafés da fração cereja + verde, antes e após a aplicação do “Cladosporin” no ano agrícola 2009/2010. Lavras, 2012.

Entre os resultados nos dois anos, não foi demonstrado por meio do teste de Tukey, diferenças significativas nos teores de trigonelina entre as diferentes frações analisadas apesar dos tratamentos apresentarem comportamentos diferenciados em cada fração (Tabelas 32 e 99A).

Tabela 32 Teores de Trigonelina (%) da fração boia e cereja + verde em cafés, antes e após a aplicação do “Cladosporin” no ano agrícola 2009/2010. Lavras, 2012.

Trigonelina (%)	
Boia	Cereja + Verde
0,86* a	0,82 a

CV (%) = 12,81

* Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

3.10.3 Ácido Clorogênico (5 ACQ)

Os teores médios de ácido clorogênico (5 ACQ), encontrados na fração boia, nos diferentes tratamentos estão exibidos nas Tabelas 33 e 94A e indicam a ocorrência de diferenças significativas entre o número de aplicações, entre as doses aplicadas e também a interação entre número de aplicações e doses aplicadas.

Nessa fração as diferenças entre o número de aplicações não ficou evidenciada entre os tratamentos, pois os valores apresentaram grande variação (Tabela 33).

Uma aplicação apresentou diminuição nos teores médios de ácido clorogênico (5 ACQ) com o aumento das doses do “Cladosporin” aplicadas (Figura 20A), ao contrário do ocorrido em duas aplicações, onde os valores médios apresentaram tendência de aumento (Figura 20B).

Tabela 33 Teores de Ácido clorogênico (5 ACQ) (%) da fração boia em cafês, antes e após a aplicação do “Cladosporin” no ano agrícola 2009/2010. Lavras, 2012.

Tratamentos	Ácido clorogênico (5 ACQ) (%)	
	Número de Aplicações	
	1	2
0	4,17 a	4,17 a
1,0 Kg/ha	5,06 a	4,09 b
1,5 Kg/ha	4,76 b	4,91 a
2,0 Kg/ha	4,43 a	4,11 b
2,5 Kg/ha	4,15 b	4,49 a
3,0 Kg/ha	3,81 b	5,45 a
CV (%) = 0,03		

* Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

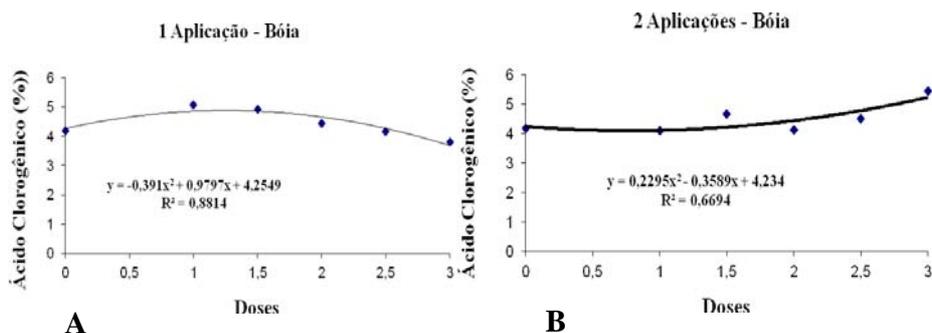


Figura 20 Teores de Ácido clorogênico (5 ACQ) (%) em cafés da fração boia antes e após a aplicação do “Cladosporin” no ano agrícola 2009/2010. Lavras, 2012.

Na fração cereja + verde, ocorreram diferenças entre o número de aplicações, entre as doses aplicadas e também a interação entre número de aplicações e doses aplicadas (Tabelas 34 e 97A), porém as diferenças entre o número de aplicações nos diferentes tratamentos não apresentaram resultados definidos a exemplo do ocorrido para a fração boia.

De acordo com o teste de regressão (Figura 21), uma aplicação apresentou diminuição nos teores médios de ácido clorogênico (5 ACQ) com o aumento das doses do “Cladosporin” aplicadas (Figura 21A) e em duas aplicações, os valores médios apresentaram tendência de aumento (Figura 21B).

Tabela 34 Teores de Ácido clorogênico (5 ACQ) (%) da fração cereja + verde em cafés, antes e após a aplicação do “Cladosporin”, no ano agrícola 2009/2010. Lavras, 2012.

Tratamentos	Ácido clorogênico (5 ACQ) (%)	
	Número de Aplicações	
	1	2
0	4,59* a	4,59 a
1,0 Kg/ha	5,07 a	3,88 b
1,5 Kg/ha	6,65 a	4,02 b
2,0 Kg/ha	4,85 b	6,19 a
2,5 Kg/ha	3,95 a	3,81 b
3,0 Kg/ha	4,03 b	5,69 a

CV (%) = 0,03

* Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

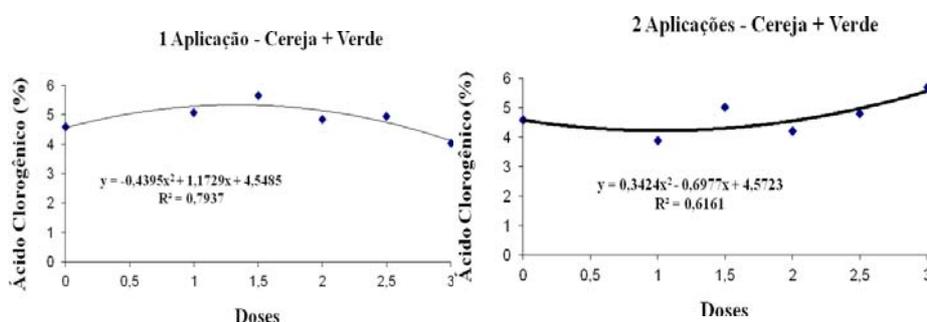


Figura 21 Teores de Ácido clorogênico (5 ACQ) (%) em cafés da fração cereja + verde antes e após a aplicação do “Cladosporin”, no ano agrícola 2009/2010. Lavras, 2012.

O café in natura contém de 6-12% de ácidos clorogênicos (FARAH et al., 2005). O ácido clorogênico (ACG) representa uma família de compostos fenólicos, cujo componente majoritário é o ácido cafeoilquínico (5-ACQ),

presente em grande quantidade na bebida (MARIA, 1995). No presente estudo, só foi quantificado o 5-ACQ, por isso, os teores encontrados estão um pouco abaixo dos encontrados na literatura, onde, geralmente, são quantificados todos os ácidos clorogênicos.

Os resultados encontrados para as duas frações indicam que o “Cladosporin” pode ter contribuído para a bioproteção dos frutos, evitando a fermentação e, conseqüente degradação do ácido clorogênico, pois os valores foram crescentes em duas aplicações. Maiores teores de ácidos clorogênicos após o processamento do café pode ser benéfica, tendo em vista sua atividade antioxidante (STADLER et al., 1994), porém devem estar dentro da faixa estipulada para café, pois resultados de estudos têm revelado que o amargor, a adstringência e o gosto de mofo da bebida de café se devem ao nível de concentração de ácidos clorogênicos e das proporções em que diferentes deles se encontram no café cru (SALVA; LIMA, 2007).

Os resultados pelo teste de Tukey demonstraram que os valores médios entre as frações boia e cereja + verde não apresentaram diferenças significativas para a variável ácido clorogênico (5 ACQ) (Tabelas 35 e 100A), indicando que nem mesmo a presença de grande número de frutos verdes na fração cereja + verde foi capaz de elevar os teores.

Tabela 35 Teores de Ácido clorogênico (5 ACQ) (%) da fração boia e cereja + verde em cafês, antes e após a aplicação do “Cladosporin”, no ano agrícola 2009/2010. Lavras, 2012.

Ácido clorogênico (5 ACQ) (%)	
Boia	Cereja + Verde
4,54* a	4,78 a

CV (%) = 8,95

* Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

3.12 Classificação pela prova de xícara

Nas Tabelas 36, 37 e 38 evidenciam-se os resultados da classificação pela prova de xícara em cafés da fração boia antes e após a aplicação do “Cladosporin” no primeiro ano de aplicação do produto.

3.12.1 Fração Boia – Ano 1

Tabela 36 Classificação pela prova de xícara em cafés da fração boia, antes e após a aplicação do “Cladosporin” de acordo com o provador 1.
Lavras – MG. Ano Agrícola 2008/2009.

Tratamento	Repetição	Aplicação	Dura (%)	Riado (%)	Rio (%)			
1	1	1	2	40	2	40	1	20
1	2	1	5	100	0	0	0	0
1	3	1	2	40	2	40	1	20
1	4	1	5	100	0	0	0	0
1	1	2	5	100	0	0	0	0
1	2	2	5	100	0	0	0	0
1	3	2	5	100	0	0	0	0
1	4	2	5	100	0	0	0	0
1,5	1	1	5	100	0	0	0	0
1,5	2	1	3	60	2	40	0	0
1,5	3	1	4	80	1	20	0	0
1,5	4	1	5	100	0	0	0	0
1,5	1	2	2	40	2	40	1	20
1,5	2	2	5	100	0	0	0	0
1,5	3	2	5	100	0	0	0	0
1,5	4	2	3	60	2	40	0	0
2	1	1	4	80	1	20	0	0
2	2	1	3	60	2	40	0	0
2	3	1	5	100	0	0	0	0
2	4	1	3	60	1	20	1	20

Tabela 36 Classificação pela prova de xícara em cafés da fração boia, antes e após a aplicação do “Cladosporin” de acordo com o provador 1. Lavras – MG. Ano Agrícola 2008/2009 (Continuação).

2	1	2	5	100	0	0	0	0
2	2	2	5	100	0	0	0	0
2	3	2	3	60	2	40	0	0
2	4	2	4	80	1	20	0	0
2,5	1	1	5	100	0	0	0	0
2,5	2	1	5	100	0	0	0	0
2,5	3	1	3	60	2	40	0	0
2,5	4	1	2	40	2	40	1	20
2,5	1	2	5	100	0	0	0	0
2,5	2	2	5	100	0	0	0	0
2,5	3	2	3	60	1	20	1	20
2,5	4	2	3	60	2	40	0	0
3	1	1	5	100	0	0	0	0
3	2	1	5	100	0	0	0	0
3	3	1	5	100	0	0	0	0
3	4	1	5	100	0	0	0	0
3	1	2	5	100	0	0	0	0
3	2	2	5	100	0	0	0	0
3	3	2	3	60	1	20	1	20
3	4	2	2	40	2	40	1	20
Média dos tratamentos	-	-	-	82	-	14	-	4
0	1	2	0	0	0	0	5	100
0	2	2	0	0	0	0	5	100
0	3	2	3	60	2	40	0	0
0	4	2	3	60	2	40	0	0
Média da testemunha	-	-	-	30	-	20	-	50
Média geral da fazenda (%)								
Dura/Riada				Riada/Rio				
20				80				

Tabela 37 Classificação pela prova de xícara em cafés da fração boia, antes e após a aplicação do “Cladosporin” de acordo com o provador 2.
Lavras – MG. Ano Agrícola 2008/2009.

Tratamentos	Repetição	Aplicação	Dura (%)	Riado (%)	Rio (%)
1	1	1	0	0	5
1	2	1	0	0	5
1	3	1	2	40	1
1	4	1	5	100	0
1	1	2	0	0	5
1	2	2	0	0	5
1	3	2	2	40	1
1	4	2	5	100	0
1,5	1	1	5	100	0
1,5	2	1	0	0	5
1,5	3	1	0	0	5
1,5	4	1	5	100	0
1,5	1	2	2	40	1
1,5	2	2	5	100	0
1,5	3	2	0	0	5
1,5	4	2	0	0	2
2	1	1	0	0	3
2	2	1	2	40	2
2	3	1	2	40	2
2	4	1	0	0	0
2	1	2	3	60	2
2	2	2	4	80	1
2	3	2	0	0	0
2	4	2	3	60	2
2,5	1	1	0	0	3
2,5	2	1	0	0	5
2,5	3	1	3	60	2
2,5	4	1	0	0	0
2,5	1	2	0	0	0
2,5	2	2	0	0	0
2,5	3	2	0	0	0
2,5	4	2	5	100	0

Tabela 37 Classificação pela prova de xícara em cafés da fração boia, antes e após a aplicação do “Cladosporin” de acordo com o provador 2. Lavras – MG. Ano Agrícola 2008/2009 (Continuação).

3	1	1	3	60	2	40	0	0
3	2	1	3	60	2	40	0	0
3	3	1	3	60	2	40	0	0
3	4	1	0	0	0	0	5	100
3	1	2	5	100	0	0	0	0
3	2	2	5	100	0	0	0	0
3	3	2	0	0	3	60	2	40
3	4	2	0	0	0	0	5	100
Média dos tratamentos	-	-	-	36	-	20	-	44
0	1	0	0	0	0	0	5	100
0	2	0	0	0	0	0	5	100
0	3	0	3	0	0	0	5	100
0	4	0	3	0	0	0	5	100
Média da testemunha	-	-	-	0	-	0	-	100
Média geral da fazenda (%)								
Dura/Riada				Riada/Rio				
20				80				

Tabela 38 Classificação pela prova de xícara em cafés da fração boia, antes e após a aplicação do “Cladosporin” de acordo com o provador 3. Lavras – MG. Ano Agrícola 2008/2009.

Tratamentos	Repetição	Aplicação	Dura (%)	Riado (%)	Rio (%)	Rio (%)	Rio (%)	
1	1	1	2	40	2	40	1	20
1	2	1	2	40	2	40	1	20
1	3	1	2	40	2	40	1	20
1	4	1	5	100	0	0	0	0
1	1	2	2	40	2	40	1	20
1	2	2	5	100	0	0	0	0
1	3	2	5	100	0	0	0	0
1	4	2	5	100	0	0	0	0
1,5	1	1	3	60	2	40	0	0
1,5	2	1	3	60	2	40	0	0
1,5	3	1	3	60	2	40	0	0
1,5	4	1	5	100	0	0	0	0
1,5	1	2	2	40	2	40	1	20
1,5	2	2	5	100	0	0	0	0
1,5	3	2	2	40	2	40	1	20
1,5	4	2	3	60	2	40	0	0
2	1	1	3	60	2	40	0	0
2	2	1	2	40	2	40	1	20
2	3	1	5	100	0	0	0	0
2	4	1	2	40	2	40	1	20
2	1	2	5	100	0	0	0	0
2	2	2	3	60	2	40	0	0
2	3	2	2	40	2	40	1	20
2	4	2	5	100	0	0	0	0
2,5	1	1	3	60	2	40	0	0
2,5	2	1	2	40	2	40	1	20
2,5	3	1	3	60	2	40	0	0
2,5	4	1	2	40	2	40	1	20
2,5	1	2	3	60	2	40	0	0
2,5	2	2	5	100	0	0	0	0
2,5	3	2	3	60	2	40	0	0
2,5	4	2	5	100	0	0	0	0

Tabela 38 Classificação pela prova de xícara em cafés da fração boia antes e após a aplicação do “Cladosporin” de acordo com o provador 3. Lavras – MG. Ano Agrícola 2008/2009 (Continuação).

3	1	1	5	100	0	0	0	0
3	2	1	5	100	0	0	0	0
3	3	1	2	40	2	40	0	0
3	4	1	2	40	2	40	1	20
3	1	2	5	100	0	0	0	0
3	2	2	5	100	0	0	0	0
3	3	2	3	60	2	40	0	0
3	4	2	2	40	2	40	1	20
Média dos tratamentos	-	-	-	68	-	25	-	7
0	1	0	2	40	2	40	1	20
0	2	0	2	40	2	40	1	20
0	3	0	2	40	2	40	1	20
0	4	0	3	60	2	40	0	0
Média da testemunha	-	-	-	45	-	40	-	15
Média geral da fazenda (%)								
Dura/Riada				Riada/Rio				
20				80				

O primeiro ano foi um ano agrícola com ocorrência de muita chuva o que prejudicou toda a cafeicultura da região Sul de Minas. Os resultados obtidos pela fazenda não foram bons, pois somente 20% da produção total apresentou padrão de classificação de bebida como Dura.

Com relação aos resultados, ressalta-se, que a prova de xícara promoveu bastante variação nas repetições entre os provadores quanto à classificação, constatando, mais uma vez, certa subjetividade e discordância entre os mesmos nos resultados entre os tratamentos avaliados. Porém, cabe destacar que todos

eles detectaram que a aplicação do “Cladosporin” proporcionou melhora significativa na qualidade da bebida, pois a quantidade de amostras classificadas como bebida Dura nos tratamentos foi bastante superior aos resultados das testemunhas e ao resultado geral da fazenda (Tabelas 36,37 e 38). O maior número de amostras classificadas com os padrões Riada e Rio também ocorreu na testemunha em relação aos demais tratamentos, evidenciando, assim, a eficácia do produto na bioproteção do café já no primeiro ano de aplicação para a fração boia.

Tabela 39 Média geral da classificação pela prova de xícara na fração boia no ano 1. Lavras, 2012.

	Média da Classificação pela Bebida (%)		
	Dura	Riada	Rio
Tratamentos	62	19,7	18,3
Testemunhas	25	20	55
Fazenda	20	80	-

No primeiro ano, independentemente das doses e do número de aplicações, observa-se que o aumento do inóculo na área experimental reduziu bastante o percentual de bebidas classificadas como Riada e Rio a 19,7(%) e, 20(%), respectivamente em relação à classificação geral de bebida obtida na fazenda que foi de 80%. Com relação à bebida Dura, o aumento foi evidenciado, obtendo-se 62% entre os tratamentos e 20% na média geral da fazenda. Esses valores demonstram que, já no primeiro ano, mudou-se o cenário no talhão utilizado para o experimento (Tabela 39).

Cabe ressaltar que os resultados da prova de xícara foram condizentes com os resultados obtidos nas análises físicas, físico-químicas e químicas, tidas como eficientes marcadores de qualidade.

3.12.2 Fração Boia – Ano 2

Nas Tabelas 40, 41 e 42 exibem-se os resultados da classificação pela prova de xícara em cafés da fração boia, antes e após a aplicação do “Cladosporin”, no segundo ano de aplicação do produto.

Tabela 40 Classificação pela prova de xícara em cafés da fração boia, antes e após a aplicação do “Cladosporin”, de acordo com o provador 1. Lavras – MG. Ano Agrícola 2009/2010.

Trat.	Rep.	Aplic.	Dura	(%)	Riado	(%)	Rio	(%)
1	1	1	3	60	2	40	0	0
1	2	1	3	60	2	40	0	0
1	3	1	5	100	0	0	0	0
1	4	1	5	100	0	0	0	0
1	1	2	5	100	0	0	0	0
1	2	2	3	60	2	40	0	0
1	3	2	3	60	2	40	0	0
1	4	2	3	60	2	40	0	0
1,5	1	1	5	100	0	0	0	0
1,5	2	1	5	100	0	0	0	0
1,5	3	1	3	60	2	40	0	0
1,5	4	1	5	100	0	0	0	0
1,5	1	2	5	100	0	0	0	0
1,5	2	2	3	60	2	40	0	0
1,5	3	2	5	100	0	0	0	0
1,5	4	2	5	100	0	0	0	0
2	1	1	5	100	0	0	0	0
2	2	1	5	100	0	0	0	0
2	3	1	5	100	0	0	0	0
2	4	1	3	60	2	40	0	0
2	1	2	5	100	0	0	0	0
2	2	2	3	60	2	40	0	0
2	3	2	5	100	0	0	0	0
2	4	2	5	100	0	0	0	0

Tabela 40 Classificação pela prova de xícara em cafés da fração boia, antes e após a aplicação do “Cladosporin” de acordo com o provador 1.
Lavras – MG. Ano Agrícola 2009/2010 (Continuação).

2,5	1	1	3	60	2	40	0	0
2,5	2	1	5	100	0	0	0	0
2,5	3	1	5	100	0	0	0	0
2,5	4	1	5	100	0	0	0	0
2,5	1	2	3	60	2	40	0	0
2,5	2	2	5	100	0	0	0	0
2,5	3	2	3	60	2	40	0	0
2,5	4	2	5	100	0	0	0	0
3	1	1	5	100	0	0	0	0
3	2	1	5	100	0	0	0	0
3	3	1	5	100	0	0	0	0
3	4	1	5	100	0	0	0	0
3	1	2	5	100	0	0	0	0
3	2	2	5	100	0	0	0	0
3	3	2	5	100	0	0	0	0
3	4	2	5	100	0	0	0	0
Média dos tratamentos	-	-	-	88	-	12	-	0
0	1	0	5	100	0	0	0	0
0	2	0	5	100	0	0	0	0
0	3	0	3	60	1	20	1	20
0	4	0	4	40	1	20	0	0
Média da testemunha	-	-	-	85	-	10	-	5
Média geral da fazenda (%)								
Dura/Riada			Riada			Riada/Rio		
83			9			8		

Tabela 41 Classificação pela prova de xícara em cafês da fração boia, antes e após a aplicação do “Cladosporin” de acordo com o provador 2.
Lavras – MG. Ano Agrícola 2009/2010.

Trat.	Rep.	Aplic.	Mole (%)	Dura (%)	Riado (%)	Rio (%)
1	1	1	0	4	1	0
1	2	1	0	4	1	0
1	3	1	5	0	0	0
1	4	1	5	0	0	0
1	1	2	5	0	0	0
1	2	2	5	0	0	0
1	3	2	0	3	0	2
1	4	2	0	3	0	2
1,5	1	1	0	4	1	0
1,5	2	1	0	4	1	0
1,5	3	1	0	5	0	0
1,5	4	1	0	5	0	0
1,5	1	2	0	3	2	0
1,5	2	2	0	3	2	0
1,5	3	2	0	5	0	0
1,5	4	2	0	5	0	0
2	1	1	0	5	0	0
2	2	1	0	5	0	0
2	3	1	0	1	2	2
2	4	1	0	1	2	2
2	1	2	0	5	0	0
2	2	2	0	5	0	0
2	3	2	0	5	0	0
2	4	2	0	5	0	0
2,5	1	1	0	5	0	0
2,5	2	1	0	5	0	0
2,5	3	1	0	2	2	1
2,5	4	1	0	2	2	1
2,5	1	2	0	4	0	1
2,5	2	2	0	4	1	0
2,5	3	2	0	4	0	1
2,5	4	2	0	3	1	0

Tabela 41 Classificação pela prova de xícara em cafês da fração boia, antes e após a aplicação do “Cladosporin” de acordo com o provador 2. Lavras – MG. Ano Agrícola 2009/2010 (Continuação).

3	1	1	0	0	3	60	2	40	0	0
3	2	1	0	0	5	100	2	40	0	0
3	3	1	0	0	5	100	0	0	0	0
3	4	1	0	0	5	100	0	0	0	0
3	1	2	0	0	5	100	0	0	0	0
3	2	2	0	0	5	100	0	0	0	0
3	3	2	0	0	5	100	0	0	0	0
3	4	2	0	0	5	100	0	0	0	0
Méd.	-	-	-	10	-	73	-	11	-	6
Trat.										
0	1	0	0	0	4	80	1	20	0	0
0	2	0	0	0	0	0	0	0	5	100
0	3	0	0	0	5	100	0	0	0	0
0	4	0	0	0	3	60	1	20	1	20
Méd.	-	-	-	-	-	60	-	10	-	30
Test.										

Média geral da fazenda (%)		
Dura/Riada	Riada	Riada/Rio
83	9	8

Tabela 42 Classificação pela prova de xícara em cafês da fração boia, antes e após a aplicação do “Cladosporin” de acordo com o provador 3.
Lavras – MG. Ano Agrícola 2009/2010.

Tratamento	Repetição	Aplicação	Dura (%)	Riado (%)	Rio (%)
1	1	1	5	100	0
1	2	1	3	60	1
1	3	1	3	60	2
1	4	1	5	100	0
1	1	2	3	60	2
1	2	2	3	60	1
1	3	2	5	100	0
1	4	2	5	100	0
1,5	1	1	5	100	0
1,5	2	1	5	100	0
1,5	3	1	5	100	0
1,5	4	1	5	100	0
1,5	1	2	3	60	2
1,5	2	2	3	60	2
1,5	3	2	3	60	2
1,5	4	2	5	100	0
2	1	1	3	60	2
2	2	1	3	60	1
2	3	1	5	100	0
2	4	1	5	100	0
2	1	2	3	60	2
2	2	2	5	100	0
2	3	2	5	100	0
2	4	2	3	60	2
2,5	1	1	3	60	1
2,5	2	1	3	60	1
2,5	3	1	5	100	0
2,5	4	1	5	100	0
2,5	1	2	3	60	1
2,5	2	2	5	100	0
2,5	3	2	3	60	1
2,5	4	2	3	60	1

Tabela 42 Classificação pela prova de xícara em cafés da fração boia antes e após a aplicação do “Cladosporin” de acordo com o provador 3. Lavras – MG. Ano Agrícola 2009/2010 (Continuação).

3	1	1	5	100	0	0	0	0
3	2	1	5	100	0	0	0	0
3	3	1	5	100	0	0	0	0
3	4	1	3	60	1	20	1	20
3	1	2	5	100	0	0	0	0
3	2	2	5	100	0	0	0	0
3	3	2	5	100	0	0	0	0
3	4	2	5	100	0	0	0	0
Média dos tratamentos	-	-	-	83	-	12,5	-	4,5
0	1	0	5	100	0	0	0	0
0	2	0	3	60	2	40	0	0
0	3	0	5	100	0	0	0	0
0	4	0	5	100	0	0	0	0
Média da testemunha	-	-	-	90	-	10	-	0

Média geral da fazenda (%)		
Dura/Riada	Riada	Riada/Rio
83	9	8

No segundo ano, houve um número reduzido de chuva, principalmente na época da aplicação do “Cladosporin” e na época da colheita, o que pode ter contribuído para uma colonização mais eficaz e maior permanência do inóculo no frutos. Nesse segundo ano, o resultado geral obtido pelos cafés da fazenda foi muito superior ao resultado do primeiro ano, ocorrendo 83% de bebida Dura na fração boia. Esse fato também pode estar relacionado à permanência do inóculo do *Cladosporium* na área e que pode ter se espalhado para grande parte da lavoura, pois os resultados apresentados pelos três provadores nesse segundo ano, apontaram semelhanças entre os tratamentos com aplicação do produto, em

relação à testemunha e ao resultado geral da fazenda nas três classificações obtidas (Tabelas 40,41 e 42).

Destaca-se ainda que ocorreu concordância entre os três provadores no tratamento que recebeu a maior dose do produto (3,0Kg/ha), tanto em uma quanto em duas aplicações que, segundo a prova de xícara, apresentou classificação como bebida Dura na maioria das repetições, ao contrário dos demais tratamentos onde não ocorreu relação definida entre os provadores.

Apesar das classificações quanto à prova de xícara dos tratamentos terem sido semelhantes à classificação geral da fazenda, os resultados são muito promissores para a fração boa, pois um dos provadores detectou padrão de bebida Mole entre os tratamentos. Essa detecção indica que a aplicação anual do “Cladosporin” contribui não só para a manutenção, mas, também, para a melhoria da qualidade.

Tabela 43 Média geral da classificação pela prova de xícara na fração boa no ano 2. Lavras, 2012.

	Média da Classificação pela Bebida (%)			
	Mole	Dura	Riada	Rio
Tratamentos	3,3	81,3	11,8	3,5
Testemunhas	-	78,3	10	11,7
Fazenda	-	83	9	8

No segundo ano, observa-se que o “Cladosporin” foi capaz de aumentar o percentual médio de bebida Dura (81,3%) em relação ao primeiro ano (62%), comprovando seu efeito na manutenção da qualidade, inclusive nas testemunhas, indicando que ocorreu sua migração para áreas adjacentes, promovendo

melhoras significativas de qualidade em cafés não pulverizados com o produto (Tabela 43), além de também poder ter havido uma associação entre a pulverização do “Cladosporin” com as condições climáticas do segundo ano, como menor incidência de chuvas durante a maturação, colheita e secagem dos frutos.

Com esse comportamento benéfico, o produto foi capaz de reduzir o percentual das bebidas inferiores Riada (11,8% no segundo ano e 20% no primeiro ano) e, principalmente, bebida Rio (55% no primeiro ano para apenas 11,7% no segundo).

De uma maneira geral, observa-se que a aplicação do “Cladosporin”, principalmente nas maiores doses, nos dois anos de estudo foi capaz de reduzir a condutividade elétrica, lixiviação de potássio e índice de coloração e aumentar a atividade de PFO, sólidos solúveis totais e açúcares totais. Assim, fica evidenciada a melhoria na qualidade dos grãos, por meio das análises físicas, físico-químicas e químicas e confirmada pela prova de xícara.

3.12.3 Fração Cereja + Verde – Ano 1

Nas Tabelas 44, 45 e 46, exibem-se os resultados da classificação pela prova de xícara em cafés da fração cereja + verde, antes e após a aplicação do “Cladosporin”, no primeiro ano de aplicação do produto.

Tabela 44 Classificação pela prova de xícara em cafés da fração cereja + verde, antes e após a aplicação do “Cladosporin” de acordo com o provador
1. Lavras – MG. Ano Agrícola 2008/2009.

Tratamentos	Repetição	Aplicação	Dura (%)	Riado (%)	Rio (%)
1	1	1	5	100	0
1	2	1	5	100	0
1	3	1	5	100	0
1	4	1	5	100	0
1	1	2	5	100	0
1	2	2	5	100	0
1	3	2	5	100	0
1	4	2	5	100	0
1,5	1	1	5	100	0
1,5	2	1	5	100	0
1,5	3	1	5	100	0
1,5	4	1	5	100	0
1,5	1	2	5	100	0
1,5	2	2	5	100	0
1,5	3	2	5	100	0
1,5	4	2	5	100	0
2	1	1	5	100	0
2	2	1	5	100	0
2	3	1	5	100	0
2	4	1	5	100	0
2	1	2	5	100	0
2	2	2	5	100	0
2	3	2	5	100	0
2	4	2	5	100	0

Tabela 44 Classificação pela prova de xícara em cafés da fração cereja + verde, antes e após a aplicação do “Cladosporin”, de acordo com o provador
1. Lavras – MG. Ano Agrícola 2008/2009 (Continuação).

2,5	1	1	5	100	0	0	0	0
2,5	2	1	5	100	0	0	0	0
2,5	3	1	5	100	0	0	0	0
2,5	4	1	5	100	0	0	0	0
2,5	1	2	5	100	0	0	0	0
2,5	2	2	5	100	0	0	0	0
2,5	3	2	5	100	0	0	0	0
2,5	4	2	5	100	0	0	0	0
3	1	1	5	100	0	0	0	0
3	2	1	5	100	0	0	0	0
3	3	1	5	100	0	0	0	0
3	4	1	5	100	0	0	0	0
3	1	2	5	100	0	0	0	0
3	2	2	5	100	0	0	0	0
3	3	2	5	100	0	0	0	0
3	4	2	5	100	0	0	0	0
Média dos tratamentos	-	-	-	100	-	-	-	-
0	1	0	5	100	0	0	0	0
0	2	0	5	100	0	0	0	0
0	3	0	5	100	0	0	0	0
0	4	0	5	100	0	0	0	0
Média da testemunha	-	-	-	100	-	-	-	-
Média geral da fazenda (%)								
Dura/Riada				Riada/Rio				
20				80				

Tabela 45 Classificação pela prova de xícara em cafés da fração cereja + verde, antes e após a aplicação do “Cladosporin”, de acordo com o provador
2. Lavras – MG. Ano Agrícola 2008/2009.

Tratamentos	Repetição	Aplicação	Dura (%)	Riado (%)	Rio (%)
1	1	1	5	100	0
1	2	1	5	100	0
1	3	1	5	100	0
1	4	1	5	100	0
1	1	2	5	100	0
1	2	2	5	100	0
1	3	2	5	100	0
1	4	2	5	100	0
1,5	1	1	5	100	0
1,5	2	1	5	100	0
1,5	3	1	5	100	0
1,5	4	1	5	100	0
1,5	1	2	5	100	0
1,5	2	2	5	100	0
1,5	3	2	5	100	0
1,5	4	2	5	100	0
2	1	1	5	100	0
2	2	1	5	100	0
2	3	1	5	100	0
2	4	1	5	100	0
2	1	2	5	100	0
2	2	2	5	100	0
2	3	2	5	100	0
2	4	2	5	100	0
2,5	1	1	5	100	0
2,5	2	1	5	100	0
2,5	3	1	5	100	0
2,5	4	1	5	100	0
2,5	1	2	5	100	0
2,5	2	2	5	100	0
2,5	3	2	5	100	0
2,5	4	2	5	100	0

Tabela 45 Classificação pela prova de xícara em cafés da fração cereja + verde, antes e após a aplicação do “Cladosporin”, de acordo com o provador
2. Lavras – MG. Ano Agrícola 2008/2009 (Continuação).

3	1	1	5	100	0	0	0	0
3	2	1	5	100	0	0	0	0
3	3	1	5	100	0	0	0	0
3	4	1	5	100	0	0	0	0
3	1	2	5	100	0	0	0	0
3	2	2	5	100	0	0	0	0
3	3	2	5	100	0	0	0	0
3	4	2	5	100	0	0	0	0
Média dos tratamentos	-	-	-	100	-	-	-	-
0	1	0	5	100	0	0	0	0
0	2	0	5	100	0	0	0	0
0	3	0	5	100	0	0	0	0
0	4	0	5	100	0	0	0	0
Média da testemunha	-	-	-	100	-	-	-	-
Média geral da fazenda (%)								
Dura/Riada				Riada/Rio				
20				80				

Tabela 46 Classificação pela prova de xícara em cafés da fração cereja + verde, antes e após a aplicação do “Cladosporin”, de acordo com o provador
3. Lavras – MG. Ano Agrícola 2008/2009.

Tratamentos	Repetição	Aplicação	Dura (%)	Riado (%)	Rio (%)
1	1	1	5	100	0
1	2	1	5	100	0
1	3	1	5	100	0
1	4	1	5	100	0
1	1	2	5	100	0
1	2	2	5	100	0
1	3	2	5	100	0
1	4	2	5	100	0
1,5	1	1	5	100	0
1,5	2	1	5	100	0
1,5	3	1	5	100	0
1,5	4	1	5	100	0
1,5	1	2	5	100	0
1,5	2	2	5	100	0
1,5	3	2	5	100	0
1,5	4	2	5	100	0
2	1	1	5	100	0
2	2	1	5	100	0
2	3	1	5	100	0
2	4	1	5	100	0
2	1	2	5	100	0
2	2	2	5	100	0
2	3	2	5	100	0
2	4	2	5	100	0
2,5	1	1	5	100	0
2,5	2	1	5	100	0
2,5	3	1	5	100	0
2,5	4	1	5	100	0
2,5	1	2	5	100	0
2,5	2	2	5	100	0
2,5	3	2	5	100	0
2,5	4	2	5	100	0

Tabela 46 Classificação pela prova de xícara em cafés da fração cereja + verde, antes e após a aplicação do “Cladosporin”, de acordo com o provador
3. Lavras – MG. Ano Agrícola 2008/2009 (Continuação).

3	1	1	5	100	0	0	0	0
3	2	1	5	100	0	0	0	0
3	3	1	5	100	0	0	0	0
3	4	1	5	100	0	0	0	0
3	1	2	5	100	0	0	0	0
3	2	2	5	100	0	0	0	0
3	3	2	5	100	0	0	0	0
3	4	2	5	100	0	0	0	0
Média dos tratamentos	-	-	-	100	-	-	-	-
0	1	0	5	100	0	0	0	0
0	2	0	5	100	0	0	0	0
0	3	0	5	100	0	0	0	0
0	4	0	5	100	0	0	0	0
Média da testemunha	-	-	-	100	-	-	-	-

Média geral da fazenda (%)	
Dura/Riada	Riada/Rio
20	80

Tabela 47 Média geral da classificação pela prova de xícara na fração cereja + verde no ano 1. Lavras, 2012.

Média da Classificação pela Bebida (%)		
	Dura	Riada/Rio
Tratamentos	100	-
Testemunhas	100	-
Fazenda	20	80

No primeiro ano, para a fração cereja + verde, os resultados da classificação pela prova de xícara, segundo os três provadores, classificaram todos os tratamentos, inclusive a testemunha, como padrão de bebida Dura (Tabelas 44, 45 e 46).

Essa fração, não estava relacionada a problemas de bebida, segundo relatos obtidos na fazenda, porém o produto também se mostrou eficaz para essa fração, pois promoveu manutenção da qualidade em um ano ruim para a cafeicultura, pois os resultados apresentaram média geral de 100% como classificação de bebida Dura, enquanto a média geral da fazenda foi de apenas 20% para esse padrão (Tabela 47).

3.12.4 Fração Cereja + Verde – Ano 2

Nas Tabelas 48, 49 e 50, exibem-se os resultados da classificação pela prova de xícara em cafés da fração cereja + verde, antes e após a aplicação do “Cladosporin”, no segundo ano de aplicação do produto.

Tabela 48 Classificação pela prova de xícara em cafés da fração cereja + verde, antes e após a aplicação do “Cladosporin”, de acordo com o provador
1. Lavras – MG. Ano Agrícola 2009/2010.

Tratamentos	Repetição	Aplicação	Dura (%)	Riado (%)	Rio (%)
1	1	1	5	100	0
1	2	1	5	100	0
1	3	1	5	100	0
1	4	1	5	100	0
1	1	2	5	100	0
1	2	2	5	100	0
1	3	2	5	100	0
1	4	2	5	100	0
1,5	1	1	5	100	0
1,5	2	1	5	100	0
1,5	3	1	5	100	0
1,5	4	1	5	100	0
1,5	1	2	5	100	0
1,5	2	2	5	100	0
1,5	3	2	5	100	0
1,5	4	2	5	100	0
2	1	1	5	100	0
2	2	1	5	100	0
2	3	1	5	100	0
2	4	1	5	100	0
2	1	2	5	100	0
2	2	2	5	100	0
2	3	2	5	100	0
2	4	2	5	100	0

Tabela 48 Classificação pela prova de xícara em cafés da fração cereja + verde, antes e após a aplicação do “Cladosporin”, de acordo com o provador
1. Lavras – MG. Ano Agrícola 2009/2010 (Continuação).

2,5	1	1	5	100	0	0	0	0
2,5	2	1	5	100	0	0	0	0
2,5	3	1	5	100	0	0	0	0
2,5	4	1	5	100	0	0	0	0
2,5	1	2	5	100	0	0	0	0
2,5	2	2	5	100	0	0	0	0
2,5	3	2	5	100	0	0	0	0
2,5	4	2	5	100	0	0	0	0
3	1	1	5	100	0	0	0	0
3	2	1	5	100	0	0	0	0
3	3	1	5	100	0	0	0	0
3	4	1	5	100	0	0	0	0
3	1	2	5	100	0	0	0	0
3	2	2	5	100	0	0	0	0
3	3	2	5	100	0	0	0	0
3	4	2	5	100	0	0	0	0
Média dos tratamentos	-	-	-	100	-	-	-	-
0	1	0	5	100	0	0	0	0
0	2	0	5	100	0	0	0	0
0	3	0	5	100	0	0	0	0
0	4	0	5	100	0	0	0	0
Média da testemunha	-	-	-	100	-	-	-	-
Média geral da fazenda (%)								
Dura/Riada			Riada			Riada/Rio		
83			9			8		

Tabela 49 Classificação pela prova de xícara em cafés da fração cereja + verde, antes e após a aplicação do “Cladosporin”, de acordo com o provador
2. Lavras – MG. Ano Agrícola 2009/2010.

Tratamentos	Repetição	Aplicação	Dura	(%)	Riado	(%)	Rio	(%)
1	1	1	5	100	0	0	0	0
1	2	1	5	100	0	0	0	0
1	3	1	5	100	0	0	0	0
1	4	1	5	100	0	0	0	0
1	1	2	5	100	0	0	0	0
1	2	2	5	100	0	0	0	0
1	3	2	5	100	0	0	0	0
1	4	2	5	100	0	0	0	0
1,5	1	1	5	100	0	0	0	0
1,5	2	1	5	100	0	0	0	0
1,5	3	1	5	100	0	0	0	0
1,5	4	1	5	100	0	0	0	0
1,5	1	2	5	100	0	0	0	0
1,5	2	2	5	100	0	0	0	0
1,5	3	2	5	100	0	0	0	0
1,5	4	2	5	100	0	0	0	0
2	1	1	5	100	0	0	0	0
2	2	1	5	100	0	0	0	0
2	3	1	5	100	0	0	0	0
2	4	1	5	100	0	0	0	0
2	1	2	5	100	0	0	0	0
2	2	2	5	100	0	0	0	0
2	3	2	5	100	0	0	0	0
2	4	2	5	100	0	0	0	0
2,5	1	1	5	100	0	0	0	0
2,5	2	1	5	100	0	0	0	0
2,5	3	1	5	100	0	0	0	0
2,5	4	1	5	100	0	0	0	0
2,5	1	2	5	100	0	0	0	0
2,5	2	2	5	100	0	0	0	0
2,5	3	2	5	100	0	0	0	0
2,5	4	2	5	100	0	0	0	0

Tabela 49 Classificação pela prova de xícara em cafés da fração cereja + verde, antes e após a aplicação do “Cladosporin”, de acordo com provador 2. Lavras – MG. Ano Agrícola 2009/2010 (Continuação).

3	1	1	5	100	0	0	0	0
3	2	1	5	100	0	0	0	0
3	3	1	5	100	0	0	0	0
3	4	1	5	100	0	0	0	0
3	1	2	5	100	0	0	0	0
3	2	2	5	100	0	0	0	0
3	3	2	5	100	0	0	0	0
3	4	2	5	100	0	0	0	0
Média dos tratamentos	-	-	-	100	-	-	-	-
0	1	0	5	100	0	0	0	0
0	2	0	5	100	0	0	0	0
0	3	0	5	100	0	0	0	0
0	4	0	5	100	0	0	0	0
Média da testemunha	-	-	-	100	-	-	-	-
Média geral da fazenda (%)								
Dura/Riada			Riada			Riada/Rio		
83			9			8		

Tabela 50 Classificação pela prova de xícara em cafés da fração cereja + verde, antes e após a aplicação do “Cladosporin”, de acordo com o provador
3. Lavras – MG. Ano Agrícola 2009/2010.

Tratamentos	Repetição	Aplicação	Dura (%)	Riado (%)	Rio (%)
1	1	1	5	100	0
1	2	1	5	100	0
1	3	1	5	100	0
1	4	1	5	100	0
1	1	2	5	100	0
1	2	2	5	100	0
1	3	2	5	100	0
1	4	2	5	100	0
1,5	1	1	5	100	0
1,5	2	1	5	100	0
1,5	3	1	5	100	0
1,5	4	1	5	100	0
1,5	1	2	5	100	0
1,5	2	2	5	100	0
1,5	3	2	5	100	0
1,5	4	2	5	100	0
2	1	1	5	100	0
2	2	1	5	100	0
2	3	1	5	100	0
2	4	1	5	100	0
2	1	2	5	100	0
2	2	2	5	100	0
2	3	2	5	100	0
2	4	2	5	100	0
2,5	1	1	5	100	0
2,5	2	1	5	100	0
2,5	3	1	5	100	0
2,5	4	1	5	100	0
2,5	1	2	5	100	0
2,5	2	2	5	100	0
2,5	3	2	5	100	0
2,5	4	2	5	100	0

Tabela 50 Classificação pela prova de xícara em cafés da fração cereja + verde, antes e após a aplicação do “Cladosporin”, de acordo com o provador
3. Lavras – MG. Ano Agrícola 2009/2010 (Continuação).

3	1	1	5	100	0	0	0	0
3	2	1	5	100	0	0	0	0
3	3	1	5	100	0	0	0	0
3	4	1	5	100	0	0	0	0
3	1	2	5	100	0	0	0	0
3	2	2	5	100	0	0	0	0
3	3	2	5	100	0	0	0	0
3	4	2	5	100	0	0	0	0
Média dos tratamentos	-	-	-	100	-	-	-	-
0	1	0	5	100	0	0	0	0
0	2	0	5	100	0	0	0	0
0	3	0	5	100	0	0	0	0
0	4	0	5	100	0	0	0	0
Média da testemunha	-	-	-	100	-	-	-	-

Média geral da fazenda (%)		
Dura/Riada	Riada	Riada/Rio
83	9	8

Tabela 51 Média geral da classificação pela prova de xícara na fração cereja + verde no ano 2. Lavras, 2012.

Média da Classificação pela Bebida			
	Dura	Riada	Rio
Tratamentos	100	-	-
Testemunhas	100	-	-
Fazenda	86	9	8

No segundo ano, a exemplo do primeiro, os provadores classificaram 100% dos cafés como bebida Dura para essa fração tanto nos tratamentos quanto nas testemunhas (Tabelas 48, 49 e 50).

Dessa forma, neste segundo ano, os resultados também foram satisfatórios, pois o produto continuou mantendo sua função de bioproteção sobre os frutos e ainda foi capaz de auxiliar na melhoria do padrão de bebida da fazenda provavelmente pela difusão do inóculo em toda a área, pois ocorreu 83% de bebida Dura como média geral e apenas 9% e 8% para bebida Riada e Rio, respectivamente (Tabela 51).

4 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados pode-se concluir que:

- O produto “Cladosporin” proporciona melhoria da qualidade nos grãos de café já no primeiro ano de aplicação, com melhoras ainda mais significativas no segundo para a fração boia e mantém a qualidade na fração cereja + verde.
- A fração boia apresentou resultados semelhantes ou superiores à fração cereja + verde na maioria dos parâmetros avaliados, indicando que o maior tempo de exposição do “Cladosporin” nos frutos é benéfica para a qualidade dessa fração.
- Os melhores teores das variáveis analisadas foram obtidos com o aumento das doses do “Cladosporin” aplicadas.
- Uma aplicação apresentou melhores resultados, indicando haver menor competição entre os micro-organismos nos frutos, quando comparada aos resultados em duas aplicações na maioria dos parâmetros analisados.
- O produto “Cladosporin” promove melhoria da composição física, química e físico-química do café nas frações boia e cereja + verde, devendo ser aplicado anualmente até o estabelecimento ou reestabelecimento do *Cladosporium* em áreas com histórico de qualidade inferior de bebida.
- De acordo com os resultados obtidos pela prova de xícara, o produto promove melhorias relevantes na fração boia, fração esta com histórico de problemas na

qualidade, inclusive detectando bebida Mole entre os tratamentos. Para a fração cereja também apresenta eficiência, sendo que todos os tratamentos foram classificados como bebida Dura nos dois anos de avaliação.

- Os resultados apontam que somente uma aplicação do “Cladosporin” na faixa de 2,5Kg/ha a 3,0Kg/ha proporciona resultados mais satisfatórios na maioria dos parâmetros avaliados, pois em algumas análises se apresentam como os tratamentos mais eficientes e em outras, promove resultados intermediários, porém dentro dos padrões para café.

- Os parâmetros condutividade elétrica, lixiviação de potássio, atividade da PFO, sólidos solúveis e açúcares totais se apresentaram como os mais eficientes marcadores de qualidade e apresentaram resultados condizentes com a média da prova de xícara, apesar de terem ocorrido diferenças entre os provadores, confirmando certa subjetividade nesse tipo de classificação.

REFERÊNCIAS

- ABRAHÃO, A. A. et al. Classificação física e composição química do café submetido a diferentes tratamentos fungicidas. **Coffee Science**, Lavras, v. 4, n. 2, p. 100-109, jul./dez. 2009.
- AGUIAR, A. T. E. et al. Diversidade química de cafeeiros na espécie *Coffea canephora*. **Bragantia**, Campinas, v. 64, n. 4, p. 577-582, 2005.
- ALVES, S. T. et al. Metodologia para análise simultânea de ácido nicotínico, trigonelina, ácido clorogênico e cafeína em café torrado por cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 6, p. 1164-1168, nov./dez. 2006.
- AMORIM, H. V.; SILVA, D. M. Relationship between the polyphenol oxidase activity of coffee beans and the quality of beverage. **Nature**, London, v. 219, n. 27, p. 381-382, July 1968.
- ARNAUD, M. J. **Encyclopedia of human nutrition**. London: Academic, 1999. v. 1, 206 p.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association of Official Agricultural Chemists**. 12th ed. Washington, 1990. 1985 p.
- BARRIOS, B. E. B. **Caracterização física, química, microbiológica e sensorial de cafés (*Coffea arabica* L.) da região Alto Rio Grande, Sul de Minas Gerais**. 2001. 72 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2001.
- BORÉM, F. M. et al. Características químicas e físico-químicas do café (*Coffea arabica* L.) secado em diferentes pavimentações e espessuras de camadas. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 5., 2007, Águas de Lindóia. **Resumos Expandidos...** Águas de Lindóia: CBP&D/CAFÉ-EMBRAPA/CAFÉ, 2007. 1 CD-ROM.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa n. 8**, de 11 de junho de 2003. Aprova o regulamento técnico da identidade e de qualidade para a classificação de café beneficiado grão cru. Brasília, 2003. Disponível em: <<http://www.ministerio.gov.br>>. Acesso em: 10 nov. 2011.

CABRAL, P. S. C.; CARVALHO, M. L. M. Teste de condutividade elétrica individual na avaliação da qualidade fisiológica de sementes de café (*Coffea arabica* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 1, p. 92-96, jan./fev. 2006.

CARVALHO, A. et al. Observações sobre características dos frutos de introduções de *Coffea arabica* da Etiópia. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEIRAS, 10., 1983, Piracicaba. **Resumos...** Piracicaba: FEALQ, 1983. p. 90-92.

CARVALHO, V. D. de et al. Relação entre a composição físico-química e química do grão beneficiado e a qualidade de bebida do café. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 3, p. 449-454, mar. 1994.

CARVALHO JÚNIOR, C. et al. Influência de diferentes sistemas de colheita na qualidade do café (*Coffea arabica* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 5, p. 1089-1096, set./out. 2003.

CHALFOUN, S. M. Biological control and bioactive microbial metabolites: a coffee quality perspective. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 5, p. 1071-1085, set./out. 2010.

_____. **O café (*Coffea arabica* L.) na região Sul de Minas Gerais: relação da qualidade com fatores ambientais, estruturais e tecnológicos.** 1996. 171 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1996.

CHEYNIER, V. Polyphenols in foods are more complex than often thought. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 81, p. 223-229, 2005. Supplement.

COELHO, K. F. **Avaliação química e sensorial da qualidade do café de bebida estritamente mole após a inclusão de grãos defeituosos**. 2000. 96 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000.

CORTEZ, J. G. Controle das fermentações do café e a qualidade da bebida. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 19., 1993, Três Pontas. **Resumos...** Rio de Janeiro: MARA, 1993. p. 86-87.

DEL CASTILHO, M. D.; AMES, J. M.; GORDON, M. H. Effect of roasting on the antioxidant activity of coffee brews. **Journal Agriculture and Food Chemistry**, Easton, v. 50, n. 13, p. 3698-3703, June 2002.

DISHE, Z. General colors reactions. In: WHISTLER, R. L.; WOLFRAM, M. L. (Ed.). **Carbohydrate chemistry**. New York: Academic, 1962. p. 477-512.

DRAETTA, L. S.; LIMA, D. C. Isolamento e caracterização das polifenoloxidasas do café. **Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 7, p. 13-28, jun. 1976.

FARAH, A.; DONANGELO, C. M. Phenolic compounds in coffee. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Piracicaba, v. 18, n. 1, p. 23-26, Feb. 2006.

FARAH, A. et al. Effect of roasting on the formation of chlorogenic acid lactones in coffee. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, p. 1505-1513, 2005.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do SISVAR para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 2000. p. 255-258.

GOLDSTEIN, J. L.; SWAIN, T. Changes in tannins in ripening fruits. **Phytochemistry**, Oxford, v. 2, n. 4, p. 371-383, Dec. 1963.

GOULART, P. F. P. et al. Aspectos histoquímicos e morfológicos de grãos de café de diferentes qualidades. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 3, p. 662-666, maio/jun. 2007.

HAKIL, M. et al. Caffeine degradation in solid state fermentation by *Aspergillus tamari*: effect of additional nitrogen source. **Process Biotechnology**, Ness-Ziona, v. 10, n. 35, p. 103-109, 1999.

HOLSCHER, W.; VITZTHUM, O. G.; STEINHART, H. Identification and sensorial evaluation of aroma-impact compounds in roasted colombian coffee. **Café Cacao Thé**, Montpellier, v. 34, n. 3, p. 205-212, 1990.

ILLY, A.; VIANI, R. **Espresso coffee: the chemistry of quality**. San Diego: Academic, 1996. 253 p.

LEITE, I. P.; VILELA, E. R.; CARVALHO, V. D. Efeito do armazenamento na composição física e química do grão de café em diferentes processamentos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 3, p. 159-163, 1996.

LEITE, R. A. et al. Qualidade tecnológica do café (*Coffea arabica* L.) pré-processado por “via seca” e “via úmida” avaliada por método químico. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 2, n. 3, p. 308-311, 1998.

LIMA, V. B. et al. Teor de cafeína em introduções e variedades de *Coffea arabica* do banco de germoplasma do Instituto Agronômico, IAC. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 5., 2007, Águas de Lindóia. **Resumos Expandidos...** Águas de Lindóia: CBP&D/CAFÉ-EMBRAPA/CAFÉ, 2007. p. 391-393.

LOPES, L. M. V. **Avaliação da qualidade de grãos crus e torrados de cultivares de cafeeiro (*Coffea arabica* L.)**. 2000. 87 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000.

MALTA, M. R.; CHAGAS, S. J. R. Avaliação da composição química do café submetido a diferentes formas de preparo e tipos de terreiro de secagem. **Revista Brasileira de Armazenamento - Especial Café**, Viçosa, MG, n. 10, p. 1-8, 2008.

_____. Avaliação de compostos não-voláteis em diferentes cultivares de cafeeiro produzidas na região sul de Minas Gerais. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 31, n. 1, p. 57-61, 2009.

MALTA, M. R.; PEREIRA, R. G. F. A.; CHAGAS, S. J. R. Condutividade elétrica e lixiviação de potássio do exsudato de grãos de café: alguns fatores que podem influenciar essas avaliações. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 5., 2007, Águas de Lindóia. **Resumos...** Águas de Lindóia: CBP&D/CAFÉ/EMBRAPA/CAFÉ, 2007. 1 CD-ROM.

MALTA, M. R.; SANTOS, M. L. dos; SILVA, F. A. de M. Qualidade de grãos de diferentes cultivares de cafeeiro (*Coffea arabica* L.). **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 24, n. 5, p. 1385-1390, 2002.

MARIA, C. A. B. de. **Uma nova abordagem para o estudo de precursores e componentes do aroma do café**. 195 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1995.

MATTILA, P.; KUMPULAINEN, J. Determination of free and total phenolic acids in plant-derived by HPLC with diode-array detection. **Journal Agriculture and Food Chemistry**, Easton, v. 50, n. 13, p. 3660-3667, June 2002.

MAZZAFERA, P.; OLSSON, O.; SANDBERG, G. Degradation of caffeine and related methylxanthines by *Serratia marcescens* isolated from soil under coffee cultivation. **Microbial Ecology**, Chicago, v. 31, n. 1, p. 199-207, Feb. 1994.

MENDONÇA, L. M. V. L. **Características químicas, físico-químicas e sensoriais de cultivares de *Coffea arabica* L.** 2004. 153 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.

MORAES, R. de M. et al. Determinação de sólidos solúveis em cafés arabica e canephora. **Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 5, p. 199-221, 1974.

MOREIRA, R. F. A.; TRUGO, L. C.; MARIA, C. A. B. de. Compostos voláteis do café torrado: parte II, compostos alifáticos, alicíclicos e aromáticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 23, n. 2, p. 195-203, mar./abr. 2000.

OLIVEIRA, M. E. B. de et al. Avaliação de parâmetros de qualidade físico-químicos de polpas congeladas de acerola, cajá e caju. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 19, n. 3, p. 326-332, set./dez. 1999.

PEREIRA, R. T. G.; PFENNING, L. H.; CASTRO, H. A. Caracterização e dinâmica de colonização de *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries em frutos do cafeeiro (*Coffea arabica* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 6, p. 1112-1116, nov./dez. 2005.

PEZZOPANE, C. G. **Influências ambientais e da variabilidade genética no rendimento intrínseco do café**. 2003. 64 p. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) - Instituto Agronômico, Campinas, 2003.

PIMENTA, C. J. **Qualidade do café (*Coffea arabica* L.) originado de frutos colhidos em quatro estádios de maturação**. 1995. 94 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1995.

PIMENTA, C. J. et al. Avaliação físico-química e de qualidade do café (*Coffea arabica* L.) submetido a diferentes tempos de espera para secagem. **Revista Brasileira de Armazenamento - Especial Café**, Viçosa, MG, n. 10, p. 36-41, 2008b.

_____. Composição química e avaliação da qualidade do café (*Coffea arabica* L.) colhido em diferentes épocas. **Revista Brasileira de Armazenamento - Especial Café**, Viçosa, MG, n. 10, p. 29-35, 2008a.

PONTING, J. D.; JOSLING, M. A. Ascorbic acid oxidation and browning in apple tissue extracts. **Archives of Biochemistry**, New York, v. 19, p. 47-63, 1948.

PRETE, C. E. C. **Condutividade elétrica do exudado de grãos de café (*Coffea arabica* L.) e sua relação com a qualidade da bebida**. 1992. 125 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 1992.

REINATO, C. H. R. et al. Avaliação técnica, econômica e qualitativa do uso de lenha e GLP na secagem de café. **Revista Brasileira de Armazenamento - Especial Café**, Viçosa, MG, n. 7, p. 3-13, 2003.

ROGERS, W. J. et al. Changes to the content of sugars, sugar alcohols, myo-inositol, carboxylic acids and inorganic anions in developing grains from different varieties of Robusta (*Coffea canephora*) and Arabica (*C. arabica*) coffees. **Plant Science**, Shannon, v. 149, n. 1, p. 115-123, Mar. 1999.

SALVA, T. J. G.; LIMA, V. B. A composição química do café e as características da bebida e do grão. **O Agrônomo**, Campinas, v. 59, n. 1, p. 57-59, 2007.

SCALBERT, A.; JOHNSON, I. T.; SALTMARSH, M. Polyphenols: antioxidants and beyond. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 8, p. 215-217, 2005. Supplement.

SILVA, F. A. M. et al. Determinação de ácidos orgânicos de baixo massa molecular na rizosfera de cafeeiro por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, p. 1391-1395, dez. 2002. Edição especial.

SIQUEIRA, H. H.; ABREU, C. M. P. Composição físico-química e qualidade do café submetido a dois tipos de torração e com diferentes formas de processamento. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 1, p. 112-117, jan./fev. 2006.

STADLER, R. H. et al. The inhibitory effects of coffee on radical-mediated oxidation and mutagenicity. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 308, n. 2, p. 177-190, 1994.

STRATEN, S. van; BEAUVESER, J. C.; VISSCHER, C. A. **Coffee chemistry**. London: Elsevier Applied Science, 1985. v. 1, 260 p.

TAGLIARI, A. et al. Caffeine degradation by *Rhizopus delemar* in packed bed column bioreactor using coffee husk as substrate. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 34, n. 1, p. 102-104, Feb. 2003.

TANGO, J. S. Utilização industrial do café e dos seus subprodutos. **Boletim do ITAL**, Campinas, v. 28, p. 48-73, 1971.

TAVARES, L. A.; FERREIRA, A. G. Análises quali e quantitativa de cafés comerciais via ressonância magnética nuclear. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 5, p. 1121-1128, set./out. 2006.

ANEXOS

CAPÍTULO 3 - AGENTE BIOLÓGICO *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries NO CONTROLE DE MICRO-ORGANISMOS ASSOCIADOS AO CAFÉ (*Coffea arabica* L.) PRODUZIDO ÀS MARGENS DE REPRESA

ANO 1

PLAQUEAMENTO DOS FRUTOS APÓS 30 DIAS DA PRIMEIRA APLICAÇÃO DO “CLADOSPORIN”

Tabela 1A Resumo da análise de variância para a variável *Cladosporium*.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Tratamento	10	140.154623	14.015462	0.0329
Repetição	3	13.597225	4.532408	0.5212
Erro	30	177.120850	5.904028	
Total	43	330.872698		
Média Geral		2.5097727		
CV (%) = 33,21				

Tabela 2A Resumo da análise de variância para a variável *Fusarium*.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Tratamento	10	6145.231818	614.523182	0.0057
Repetição	3	189.540000	63.180000	0.7992
Erro	30	5638.110000	187.937000	
Total	43	11972.881818		
Média Geral		39.6636364		
CV (%) = 17				

Tabela 3A Resumo da análise de variância para a variável *Penicillium*.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Tratamento	10	25.056818	2.505682	0.0000
Repetição	3	0.177045	0.590015	0.4064
Erro	30	1.770455	0.059015	
Total	43	27.004318		
Média Geral	0.2386364			
CV (%) = 8.44				

Tabela 4A Resumo da análise de variância para a variável *Seção Circumdati*.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Tratamento	10	0.455400	0.045540	0.0913
Repetição	3	0.029700	0.009900	0.7502
Erro	30	0.732600	0.024420	
Total	43	1.217700		
Média Geral	0.0450000			
CV (%) = 11.96				

Tabela 5A Resumo da análise de variância para a variável *Seção Nigri*.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Tratamento	10	1.115600	0.111560	0.6604
Repetição	3	0.871200	0.290400	0.1366
Erro	30	4.376400	0.145880	
Total	43	6.363200		
Média Geral	0.1200000			
CV (%) = 23.73				

Tabela 6A Resumo da análise de variância para a variável Leveduras.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Tratamento	10	11273.621364	1127.362136	0.0000
Repetição	3	703.510000	234.503333	0.0275
Erro	30	2011.815000	67.060500	
Total	43	13988.946364		
Média Geral	36.2590909			
CV (%) = 12.73				

PLAQUEAMENTO DOS FRUTOS APÓS 60 DIAS DA 1ª APLICAÇÃO DO “CLADOSPORIN”

Tabela 7A Resumo da análise de variância para a variável *Cladosporium*.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Tratamento	10	352.082273	35.208227	0.0253
Repetição	3	12.372727	4.124242	0.8299
Erro	30	421.692273	14.056409	
Total	43	786.147273		
Média Geral		4.92272727		
CV (%) = 30.16				

Tabela 8A Resumo da análise de variância para a variável *Fusarium*.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Tratamento	10	5984.090455	598.409045	0.0000
Repetição	3	4.919091	1.639697	0.9894
Erro	30	1228.065909	40.935530	
Total	43	7217.075455		
Média Geral		14.2318182		
CV (%) = 24.94				

Tabela 9A Resumo da análise de variância para a variável *Penicillium*.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Tratamento	10	66.699091	6.669909	0.0172
Repetição	3	10.358182	3.452727	0.2628
Erro	30	74.131818	2.471061	
Total	43	151.189091		
Média Geral		0.8545455		
CV (%) = 47.72				

Tabela 10A Resumo da análise de variância para a variável *Seção Nigri*.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Tratamento	10	0.384091	0.038409	0.4654
Repetição	3	0.115227	0.038409	0.4064
Erro	30	1.152273	0.038409	
Total	43	1.651591		
Média Geral		0.0295455		
CV (%) = 13.26				

Tabela 11A Resumo da análise de variância para a variável Leveduras.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Tratamento	10	12552.215000	1255.221500	0.0000
Repetição	3	976.400909	325.466970	0.1417
Erro	30	4989.634091	166.321136	
Total	43	18518.250000		
Média Geral		49.7500000		
CV (%) = 14.80				

PLAQUEAMENTO DOS FRUTOS APÓS 90 DIAS DA PRIMEIRA APLICAÇÃO DO “CLADOSPORIN”

Tabela 12A Resumo da análise de variância para a variável *Cladosporium*.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Tratamento	10	2043.727273	204.372727	0.0422
Repetição	3	554.909091	184.969697	0.1300
Erro	30	2726.090909	90.869697	
Total	43	5324.727273		
Média Geral		23.7272727		
CV (%) = 19.29				

Tabela 13A Resumo da análise de variância para a variável *Fusarium*.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Tratamento	10	3115.136364	311.513636	0.0033
Repetição	3	424.250000	141.416667	0.2049
Erro	30	2614.500000	87.150000	
Total	43	6153.886364		
Média Geral	27.1590909			
CV (%) = 16.83				

Tabela 14A Resumo da análise de variância para a variável *Penicillium*.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Tratamento	10	1021.000000	102.100000	0.1288
Repetição	3	849.340909	283.113636	0.0084
Erro	30	1809.909091	60.330303	
Total	43	3680.250000		
Média Geral	14.25000			
CV (%) = 29				

Tabela 15A Resumo da análise de variância para a variável Leveduras.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Tratamento	10	4752.227273	475.22222727	0.1137
Repetição	3	1740.818182	580.272727	0.1156
Erro	30	8122.681818	270.756061	
Total	43	14615.727273		
Média Geral	13.7727273			
CV (%) = 66.85				

ANO 2**PLAQUEAMENTO DOS FRUTOS APÓS 30 DIAS DA PRIMEIRA APLICAÇÃO DO “CLADOSPORIN”**

Tabela 16A Resumo da análise de variância para a variável *Cladosporium*.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Tratamento	10	1618.654273	161.865427	0.0801
Repetição	3	419.975373	139.991791	0.1946
Erro	30	2516.017727	83.867258	
Total	43	554.647373		
Média Geral		9.9822727		
CV (%) = 33				

Tabela 17A Resumo da análise de variância para a variável *Fusarium*.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Tratamento	10	1383.422273	138.343227	0.0008
Repetição	3	550.884318	183.628106	0.0029
Erro	30	942.173182	31.405773	
Total	43	2876.489773		
Média Geral		12.2977273		
CV (%) = 23.78				

Tabela 18A Resumo da análise de variância para a variável *Penicillium*.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Tratamento	10	17.154091	1.715409	0.6992
Repetição	3	7.289091	2.429697	0.3975
Erro	30	71.445909	2.381530	
Total	43	95.889091		
Média Geral		0.4545455		
CV (%) = 56.16				

Tabela 19A Resumo da análise de variância para a variável *Seção Circumdati*.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Tratamento	10	14.545455	1.454545	0.4654
Repetição	3	4.363636	1.454545	0.4664
Erro	30	43.636364	1.454545	
Total	43	62.545455		
Média Geral		0.1818182		
CV (%) = 43.96				

Tabela 20A Resumo da análise de variância para a variável *Seção Nigri*.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Tratamento	10	14.545455	1.454545	0.4654
Repetição	3	4.363636	1.454545	0.4664
Erro	30	43.636364	1.454545	
Total	43	62.545455		
Média Geral	0.181812			
CV (%) = 43.96				

Tabela 21A Resumo da análise de variância para a variável *Leveduras*.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Tratamento	10	9843.529091	984.352909	0.0001
Repetição	3	39.818864	13.272955	0.9697
Erro	30	4880.303636	162.676788	
Total	43	14763.651591		
Média Geral	45.6295455			
CV (%) = 15.12				

PLAQUEAMENTO DOS FRUTOS APÓS 60 DIAS DA PRIMEIRA APLICAÇÃO DO “CLADOSPORIN”

Tabela 22A Resumo da análise de variância para a variável *Cladosporium*.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Tratamento	10	2606.554091	260.655409	0.4076
Repetição	3	95.682727	31.894242	0.9403
Erro	30	7243.582273	241.452742	
Total	43	9945.819091		
Média Geral	32.2045455			
CV (%) = 24.25				

Tabela 23A Resumo da análise de variância para a variável *Fusarium*.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Tratamento	10	2044.526818	204.452682	0.0000
Repetição	3	142.495227	47.498409	0.2158
Erro	30	904.382873	30.146076	
Total	43	3091.404318		
Média Geral	9.1613636			
CV (%) = 31.65				

Tabela 24A Resumo da análise de variância para a variável *Penicillium*.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Tratamento	10	0.384091	0.038409	0.4654
Repetição	3	0.115227	0.038409	0.4064
Erro	30	1.152273	0.038409	
Total	43	1.651591		
Média Geral	0.0295455			
CV (%) = 13.26				

Tabela 25A Resumo da análise de variância para a variável Leveduras.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Tratamento	10	2133.237273	213.323727	0.1470
Repetição	3	1152.749773	384.249924	0.0497
Erro	30	3936.882727	131.229424	
Total	43	7222.869773		
Média Geral	44.6477273			
CV (%) = 25.66				

CAPÍTULO 4 – VIABILIDADE DO AGENTE BIOLÓGICO BIOPROTETOR DA QUALIDADE DO CAFÉ *Cladosporium Cladosporioides* (Fresen) de Vries NO PRODUTO “Cladosporin” EM DIFERENTES TEMPERATURAS DE ARMAZENAMENTO

Tabela 26A Resumo da análise de variância para a variável Diâmetro das Colônias.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Tratamento	2	122.765247	61.382623	0.0000
Erro 1	16	13.710864	0.856929	
Dias	11	442.447747	40.222522	0.0000
Tratamento x Dias	22	136.014012	6.182455	0.0000
Erro 2	272	210.373580	0.740344	
Total	323	916.311451		
Média Geral	3,1293			
CV (%) 1 = 29,58	CV (%) 2 = 27,50			

Tabela 27A Resumo da análise de variância para a variável Esporulação.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Tratamento	2	2.502780049	1.25139002	0.0012
Erro 1	16	1.882695751	1.17668484	
Dias	11	5.790272586	5.26388417	0.0000
Tratamento x Dias	22	6.688938472	3.04042658	0.0000
Erro 2	272	6.403836205	2.35435155	
Total	323	7.143404812		
Média Geral	4114126.5432099			
CV (%) 1 = 26,37	CV (%) 2 = 37,30			

CAPÍTULO 5 - ANÁLISES QUÍMICAS, FÍSICAS, FÍSICO-QUÍMICAS E SENSORIAL DE CAFÉS PRODUZIDOS ÀS MARGENS DE REPRESA ANTES E APÓS A APLICAÇÃO DO AGENTE BIOLÓGICO *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries NO PRODUTO “Cladosporin”

CONTRASTE ENTRE OS ANOS – FRAÇÃO BOIA

Tabela 28A Resumo da análise de variância para a variável Condutividade Elétrica.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Tratamento	1	4074.811901	4074.871901	0.0012
Repetição	3	100.558661	33.519554	0.9646
Erro	91	33055.616711	363.248535	
Total	95			
Média Geral	204.0561458			
CV (%) = 9.52				

Tabela 29A Resumo da análise de variância para a variável Lixiviação de Potássio.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Tratamento	1	756.565104	756.565104	0.000
Repetição	3	10.810646	3.603549	0.9647
Erro	91	3559.091946	39.110901	
Total	95	4326.467696		
Média Geral	47.3989583			
CV (%) = 13.19				

Tabela 30A Resumo da análise de variância para a variável PFO.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Tratamento	1	18.559209	18.559209	0.0000
Repetição	3	0.214203	0.071401	0.9155
Erro	91	37.833611	0.415754	
Total	95	56.607024		
Média Geral	63.7263542			
CV (%) = 1.01				

Tabela 31A Resumo da análise de variância para a variável Compostos Fenólicos Totais.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Tratamento	1	9.506709	9.506709	0.0000
Repetição	3	0.078061	0.026020	0.5221
Erro	91	3.063970	0.033670	
Total	95	12.648741		
Média Geral	5.2171875			
CV (%) = 3.52				

Tabela 32A Resumo da análise de variância para a variável Massa de 50 grãos.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Tratamento	1	9.958817	9.958817	0.0000
Repetição	3	0.122833	0.040944	0.3564
Erro	91	3.409883	0.037471	
Total	95	13.491533		
Média Geral	6.9516667			
CV (%) = 2.78				

Tabela 33A Resumo da análise de variância para a variável Acidez Titulável Total.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Tratamento	1	104.166667	104.166667	0.6849
Repetição	3	1770.833333	590.277778	0.4151
Erro	91	57187.500000	628.434066	
Total	95	59062.500000		
Média Geral	228.1250000			
CV (%) = 10.99				

Tabela 34A Resumo da análise de variância para a variável Sólidos Solúveis.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Tratamento	1	1625.260417	1625.260417	0.0000
Repetição	3	2.864583	0.954861	0.6613
Erro	91	163.281250	1.794299	
Total	95	1791.406250		
Média Geral	32.0312500			
CV (%) = 4.18				

Tabela 35A Resumo da análise de variância para a variável Açúcares Totais.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Tratamento	1	10.401667	10.401667	0.0033
Repetição	3	0.161621	0.053874	0.9871
Erro	91	104.147975	1.144483	
Total	95	114.711262		
Média Geral	9.9281250			
CV (%) = 10.78				

FRAÇÃO BOIA - ANO 1

Tabela 36A Resumo da análise de variância para a variável Condutividade Elétrica.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Repetição	3	278.564023	92.854674	0.7089
Aplicação	1	2116.433602	2116.433602	0.0026
Dose	5	19081.278094	3816.255619	0.0000
Dose x Aplicação	5	13231.717010	2646.343402	0.0000
Erro	33	6595.757752	199.871447	
Total	47	41303.750481		
Média Geral	214.3693750			
CV (%) = 6.91				

Tabela 37A Resumo da análise de variância para a variável Lixiviação de Potássio.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Repetição	3	0.313625	0.104542	0.0945
Aplicação	1	62.517125	12.503425	0.0000
Dose	5	4.440833	4.440833	0.0000
Dose x Aplicação	5	2.320267	0.464053	0.0000
Erro	33	1.494075	0.045275	
Total	47	71.085925		
Média Geral	50.2062500			
CV (%) = 0.42				

Tabela 38A Resumo da análise de variância para a variável PFO.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Repetição	3	0.128650	0.042883	0.5820
Aplicação	1	5.312642	1.062528	0.0000
Dose	5	0.197633	0.197633	0.0903
Dose x Aplicação	5	1.680742	0.336148	0.0013
Erro	33	2.141600	0.064897	
Total	47	9.461267		
Média Geral	63.2866667			
CV (%) = 0.40				

Tabela 39A Resumo da análise de variância para a variável Compostos Fenólicos Totais.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Repetição	3	0.059083	0.019694	0.1126
Aplicação	1	0.548650	0.109730	0.0000
Dose	5	0.027075	0.027075	0.0949
Dose x Aplicação	5	0.055325	0.011065	0.3269
Erro	33	0.302167	0.009157	
Total	47	0.992300		
Média Geral	4.90250000			
CV (%) = 1.95				

Tabela 40A Resumo da análise de variância para a variável Massa de 50 grãos.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Repetição	3	0.003175	0.001058	0.9088
Aplicação	1	1.290400	0.258080	0.0000
Dose	5	0.000300	0.000300	0.8223
Dose x Aplicação	5	0.141725	0.028345	0.0020
Erro	33	0.193125	0.005852	
Total	47	1.628725		
Média Geral	7.2737500			
CV (%) = 1.05				

Tabela 41A Resumo da análise de variância para a variável Acidez Titulável Total.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Repetição	3	3541.666667	1180.555556	0.1252
Aplicação	1	2916.666667	583.333333	0.4244
Dose	5	208.3333333	208.333333	0.5512
Dose x Aplicação	5	4166.666667	833.333333	0.2325
Erro	33	18958.333333	574.4949494	
Total	47	29791.666667		
Média Geral		227.083333		
CV (%) = 10.55				

Tabela 42 Resumo da análise de variância para a variável Sólidos Solúveis.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Repetição	3	15.625000	5.208333	0.0419
Aplicação	1	7.291667	1.458333	0.5210
Dose	5	2.083333	2.083333	0.2769
Dose x Aplicação	5	10.416667	2.083333	0.3207
Erro	33	56.250000	1.704545	
Total	47	91.666667		
Média Geral		27.9166667		
CV (%) = 4.68				

Tabela 43A Resumo da análise de variância para a variável Açúcares Totais.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Repetição	3	0.117956	0.039319	0.7513
Aplicação	1	32.831385	6.566277	0.0000
Dose	5	16.957519	16.957519	0.0000
Dose x Aplicação	5	7.756519	1.551304	0.0000
Erro	33	3.214269	0.097402	
Total	47	60.877648		
Média Geral		9.5989583		
CV (%) = 3.25				

FRAÇÃO BOIA – ANO 2

Tabela 44A Resumo da análise de variância para a variável Condutividade Elétrica.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Repetição	3	7.193823	2.397941	0.6480
Aplicação	1	1468.673035	293.734607	0.0000
Dose	5	6.712552	6.712552	0.2211
Dose x Aplicação	5	271.596435	54.319287	0.0000
Erro	33	142.404802	4.315297	
Total	47	1896.580648		
Média Geral	193.6910417			
CV (%) = 1.07				

Tabela 45A Resumo da análise de variância para a variável Lixiviação de Potássio.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Repetição	3	16.715625	5.571875	0.0342
Aplicação	1	42.000208	42.000208	0.0000
Dose	5	3287.809375	657.561875	0.0000
Dose x Aplicação	5	92.906042	18.581208	0.0000
Erro	33	56.656875	1.716875	
Total	47	3496.088125		
Média Geral	47.9062500			
CV (%) = 2.94				

Tabela 46A Resumo da análise de variância para a variável PFO.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Repetição	3	0.836156	0.278719	0.1887
Aplicação	1	0.239419	0.239419	0.2372
Dose	5	13.399310	2.679862	0.0000
Dose x Aplicação	5	8.660794	1.732159	0.0000
Erro	33	5.450869	0.165178	0.0000
Total	47	28.586548		
Média Geral	64.1660417			
CV (%) = 0.63				

Tabela 47A Resumo da análise de variância para a variável Compostos Fenólicos Totais.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Repetição	3	0.040190	0.013397	0.4379
Aplicação	1	0.026602	0.026602	0.1837
Dose	5	1.046544	0.209309	0.0000
Dose x Aplicação	5	0.555810	0.111162	0.0001
Erro	33	0.476185	0.014430	
Total	47	2.145331		
Média Geral	5.6018750			
CV (%) = 2.17				

Tabela 48A Resumo da análise de variância para a variável Massa de 50 grãos.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Repetição	3	0.214275	0.071425	0.0431
Aplicação	1	0.004408	0.004408	0.6683
Dose	5	0.722567	0.144513	0.0004
Dose x Aplicação	5	0.184417	0.036883	0.1976
Erro	33	0.778325	0.023596	
Total	47	1.903992		
Média Geral	6.6295833			
CV (%) = 2.32				

Tabela 49A Resumo da análise de variância para a variável Acidez Titulável Total.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Repetição	3	2083.333333	694.444444	0.1385
Aplicação	1	208.333333	208.333333	0.4482
Dose	5	6041.666667	1208.333333	0.0135
Dose x Aplicação	5	9166.666667	1833.333333	0.1713
Erro	33	11666.666667	353.535354	
Total	47	29166.1666667		
Média Geral	229.1666667			
CV (%) = 8.20				

Tabela 50A Resumo da análise de variância para a variável Sólidos Solúveis.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Repetição	3	8.854167	2.951389	0.0716
Aplicação	1	0.520833	0.520933	0.5060
Dose	5	13.541667	2.708333	0.0624
Dose x Aplicação	5	13.541667	2.708333	0.0624
Erro	33	38.020833	1.152146	
Total	47	74.479167		
Média Geral	36.1458333			
CV (%) = 2.97				

Tabela 51A Resumo da análise de variância para a variável Açúcares Totais.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Repetição	3	0.069056	0.023019	0.7351
Aplicação	1	4.418475	4.418475	0.0000
Dose	5	6.684584	1.336917	0.0000
Dose x Aplicação	5	30.514333	6.102867	0.0000
Erro	33	1.780312	0.053949	
Total	47	43.466760		
Média Geral	10.4167833			
CV (%) = 2.26				

CONTRASTE ENTRE OS ANOS – FRAÇÃO CEREJA + VERDE

Tabela 52A Resumo da análise de variância para a variável Condutividade Elétrica.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Tratamento	1	7190.521484	71490.521484	0.0000
Repetição	3	15.761295	5.253765	0.9979
Erro	91	26971.202449	296.394722	
Total	95	98478.202449		
Média Geral	243.9292708			
CV (%) = 7.06				

Tabela 53A Resumo da análise de variância para a variável Lixiviação de Potássio.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Tratamento	1	1531.203750	1531.203750	0.0000
Repetição	3	17.344792	5.781597	0.9301
Erro	91	3518.494042	38.664770	
Total	95	5067.042583		
Média Geral	55.6229167			
CV (%) = 11.18				

Tabela 54A Resumo da análise de variância para a variável PFO.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Tratamento	1	14.298984	14.298984	0.0002
Repetição	3	0.613545	0.204515	0.8812
Erro	91	83.883145	0.921793	
Total	95	98.795674		
Média Geral	62.0538542			
CV (%) = 1.55				

Tabela 55A Resumo da análise de variância para a variável Compostos Fenólicos Totais.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Tratamento	1	20.776204	20.776204	0.0000
Repetição	3	0.035288	0.011763	0.8080
Erro	91	3.301771	0.036283	
Total	95	24.113262		
Média Geral	5.4281250			
CV (%) = 3.51				

Tabela 56A Resumo da análise de variância para a variável Massa de 50 grãos.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Tratamento	1	11.460926	11.460926	0.0000
Repetição	3	0.133011	0.044337	0.6234
Erro	91	6.843961	0.075208	
Total	95	18.437899		
Média Geral	7.0432292			
CV (%) = 3.89				

Tabela 57A Resumo da análise de variância para a variável Acidez Titulável Total.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Tratamento	1	651.041667	651.041667	0.3051
Repetição	3	494.791667	164.930556	0.8475
Erro	91	55703.125000	612.122253	
Total	95	56848.958333		
Média Geral	219.2708333			
CV (%) = 11.28				

Tabela 58A Resumo da análise de variância para a variável Sólidos Solúveis.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Tratamento	1	1948.502604	1948.502604	0.0000
Repetição	3	3.841146	1.280382	0.7230
Erro	91	263.216146	2.892485	
Total	95	2215.559896		
Média Geral	32.3177083			
CV (%) = 5.26				

Tabela 59A Resumo da análise de variância para a variável Açúcares Totais.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Tratamento	1	78.916267	78.916267	0.0000
Repetição	3	0.585288	0.195096	0.9218
Erro	91	109.446142	1.202705	
Total	95	188.947696		
Média Geral	10.0927083			
CV (%) = 11.81				

FRAÇÃO CEREJA + VERDE – ANO 1

Tabela 60A Resumo da análise de variância para a variável Condutividade Elétrica.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Repetição	3	197.540833	65.846944	0.8099
Dose	5	15389.856667	3077.971333	0.0000
Aplicação	1	753.667500	753.667500	0.0638
Dose x Aplicação	5	1582.495000	316.499000	0.2032
Erro	33	6762.999167	204.939369	
Total	47	24686.559167		
Média Geral		272.0458333		
CV (%) = 5.26				

Tabela 61A Resumo da análise de variância para a variável Lixiviação de Potássio.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Repetição	3	31.409167	10.469722	0.0000
Dose	5	75.891667	15.178333	0.0000
Aplicação	1	23.800833	23.800833	0.0000
Dose x Aplicação	5	92.701667	18.540333	0.0000
Erro	33	16.255833	0.492601	
Total	47	240.059167		
Média Geral		62.9791667		
CV (%) = 1.11				

Tabela 62A Resumo da análise de variância para a variável PFO.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Repetição	3	0.440225	0.146742	0.0835
Dose	5	14.694317	2.938863	0.0000
Aplicação	1	4.813333	4.813333	0.0000
Dose x Aplicação	5	2.951192	0.590238	0.0000
Erro	33	2.000325	0.060616	
Total	47	24.899392		
Média Geral		61.6679167		
CV (%) = 0.40				

Tabela 63A Resumo da análise de variância para a variável Compostos Fenólicos Totais.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Repetição	3	0.014275	0.004758	0.5585
Dose	5	0.375717	0.075143	0.0000
Aplicação	1	0.151875	0.151875	0.0000
Dose x Aplicação	5	0.209950	0.041990	0.0004
Erro	33	0.224175	0.006793	
Total	47	0.975992		
Média Geral	4.9329167			
CV (%) = 1.66				

Tabela 64A Resumo da análise de variância para a variável Massa de 50 grãos.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Repetição	3	0.026475	0.008825	0.1037
Dose	5	0.597875	0.119575	0.0000
Aplicação	1	0.038533	0.038533	0.0038
Dose x Aplicação	5	0.142967	0.028593	0.0001
Erro	33	0.130875	0.003966	
Total	47	0.936725		
Média Geral	7.3887500			
CV (%) = 0.85				

Tabela 65A Resumo da análise de variância para a variável Acidez Titulável Total.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Repetição	3	989.583333	329.861111	0.5337
Dose	5	2343.750000	468.750000	0.4016
Aplicação	1	52.083333	52.083333	0.7340
Dose x Aplicação	5	11510.416667	2302.083333	0.7213
Erro	33	14635.416667	443.497475	
Total	47	29531.250000		
Média Geral	221.87500000			
CV (%) = 9.49				

Tabela 66A Resumo da análise de variância para a variável Sólidos Solúveis.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Repetição	3	4.687500	1.562500	0.0734
Dose	5	106.250000	21.250000	0.0000
Aplicação	1	25.520833	25.520833	0.0000
Dose x Aplicação	5	51.041667	10.208333	0.0000
Erro	33	20.312500	0.615530	
Total	47	207.812500		
Média Geral		27.8125000		
CV (%) = 2.82				

Tabela 67A Resumo da análise de variância para a variável Açúcares Totais.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Repetição	3	0.662773	0.220924	0.0543
Dose	5	21.971519	4.394304	0.0000
Aplicação	1	0.531302	0.531302	0.0138
Dose x Aplicação	5	17.362795	3.472557	0.0000
Erro	33	2.589902	0.078482	
Total	47	43.118281		
Média Geral		10.1893750		
CV (%) = 2.75				

FRAÇÃO CEREJA + VERDE – ANO 2

Tabela 68A Resumo da análise de variância para a variável Condutividade Elétrica.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Repetição	3	86.260540	28.753513	0.0978
Dose	5	1088.611285	217.722257	0.0000
Aplicação	1	47.382002	47.382002	0.0613
Dose x Aplicação	5	35.514385	7.102877	0.7278
Erro	33	416.608485	12.624500	
Total	47	1674.376698		
Média Geral		217.6402083		
CV (%) = 1.64				

Tabela 69A Resumo da análise de variância para a variável Lixiviação de Potássio.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Repetição	3	0.051250	0.017083	0.0386
Dose	5	121.761142	24.352228	0.0000
Aplicação	1	3.080533	3.080533	0.0000
Dose x Aplicação	5	8.899292	1.779858	0.0000
Erro	33	0.179950	0.005453	
Total	47	133.972167		
Média Geral		51.6291667		
CV (%) = 0.14				

Tabela 70A Resumo da análise de variância para a variável PFO.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Repetição	3	0.260673	0.086891	0.8819
Dose	5	18.255019	3.651004	0.0000
Aplicação	1	1.646502	1.646502	0.0492
Dose x Aplicação	5	11.678885	2.335777	0.0005
Erro	33	13.028802	0.394812	
Total	47	44.869881		
Média Geral		62.5106250		
CV (%) = 1.01				

Tabela 71A Resumo da análise de variância para a variável Compostos Fenólicos Totais.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Repetição	3	0.038442	0.012814	0.3177
Dose	5	1.875950	0.375190	0.0000
Aplicação	1	0.000300	0.000300	0.8668
Dose x Aplicação	5	0.147375	0.029475	0.0321
Erro	33	0.346458	0.010499	
Total	47	2.408525		
Média Geral		5.9162500		
CV (%) = 1.74				

Tabela 72A Resumo da análise de variância para a variável Massa de 50 grãos.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Repetição	3	0.179450	0.059817	0.6719
Dose	5	1.656042	0.331208	0.0291
Aplicação	1	0.040833	0.040833	0.5556
Dose x Aplicação	5	0.325242	0.065048	0.7262
Erro	33	3.801100	0.115185	
Total	47	6.002667		
Média Geral	6.6966667			
CV (%) = 5.07				

Tabela 73A Resumo da análise de variância para a variável Acidez Titulável Total.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Repetição	3	3906.250000	1302.083333	0.1192
Dose	5	2968.750000	593.750000	0.4579
Aplicação	1	52.083333	52.083333	0.7738
Dose x Aplicação	5	2135.416667	427.083333	0.6356
Erro	33	20468.750000	620.265152	
Total	47	29531.250000		
Média Geral	221.8750000			
CV (%) = 11.22				

Tabela 74A Resumo da análise de variância para a variável Sólidos Solúveis.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Repetição	3	3.515625	1.171875	0.3276
Dose	5	25.651042	5.130208	0.0012
Aplicação	1	6.380208	6.380208	0.0157
Dose x Aplicação	5	3.776042	0.755208	0.5791
Erro	33	32.421875	0.982481	
Total	47	71.744792		
Média Geral	36.5104167			
CV (%) = 2.71				

Tabela 75A Resumo da análise de variância para a variável Açúcares Totais.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Repetição	3	0.299710	0.099903	0.0001
Dose	5	25.70222228	5.140446	0.0000
Aplicação	1	6.974588	6.974588	0.0000
Dose x Aplicação	5	33.176618	6.635324	0.0000
Erro	33	0.348383	0.010557	
Total	47	66.501527		
Média Geral	8.3776208			
CV (%) = 1.23				

CONTRASTE ENTRE AS FRAÇÕES BOIA E CEREJA + VERDE NO ANO 1

Tabela 76A Resumo da análise de variância para a variável Condutividade Elétrica.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Tratamento	1	12639.942017	12639.942017	0.0000
Repetição	3	44.467787	14.822596	0.7657
Erro	91	3526.489558	38.752633	
Total	95	16210.899363		
Média Geral	243.1656250			
CV (%) = 3.03				

Tabela 77A Resumo da análise de variância para a variável Lixiviação de Potássio.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Tratamento	1	48.592604	48.592604	0.0000
Repetição	3	0.243188	0.081063	0.9916
Erro	91	204.814904	2.250713	
Total	95	253.650696		
Média Geral	56.5877083			
CV (%) = 2.95				

Tabela 78A Resumo da análise de variância para a variável PFO.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Tratamento	1	62.888438	62.888438	0.0000
Repetição	3	0.114637	0.038212	0.9594
Erro	91	34.246021	0.376330	
Total	95	97.249096		
Média Geral	62.4772917			
CV (%) = 0.98				

Tabela 79A Resumo da análise de variância para a variável Compostos Fenólicos Totais.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Tratamento	1	0.034504	0.034504	0.2492
Repetição	3	0.054987	0.018329	0.5458
Erro	91	2.334504	0.025654	
Total	95	2.423996		
Média Geral	4.9214583			
CV (%) = 3.25				

Tabela 80A Resumo da análise de variância para a variável Massa de 50 grãos.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Tratamento	1	0.317400	0.317400	0.0011
Repetição	3	0.013025	0.004342	0.9267
Erro	91	2.552425	0.028049	
Total	95	2.882850		
Média Geral	7.3312500			
CV (%) = 2.28				

Tabela 81A Resumo da análise de variância para a variável Acidez Titulável Total.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Tratamento	1	651.041667	651.041667	0.3166
Repetição	3	911.458333	303.819444	0.7015
Erro	91	58411.458333	641.884158	
Total	95	59973.958333		
Média Geral		225.5791667		
CV (%) = 11.29				

Tabela 82A Resumo da análise de variância para a variável Sólidos Solúveis.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Tratamento	1	0.260417	0.260417	0.7779
Repetição	3	3.385417	1.128472	0.7914
Erro	91	296.093750	3.253777	
Total	95	299.739583		
Média Geral		27.8645833		
CV (%) = 6.47				

Tabela 83A Resumo da análise de variância para a variável Açúcares Totais.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Tratamento	1	8.272004	8.272004	0.0083
Repetição	3	0.327475	0.109158	0.9625
Erro	91	103.517521	1.137555	
Total	95	112.117000		
Média Geral		10.2225000		
CV (%) = 8.78				

CONTRASTE ENTRE AS FRAÇÕES BOIA E CEREJA + VERDE NO ANO 2

Tabela 84A Resumo da análise de variância para a variável Condutividade Elétrica.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Tratamento	1	98167.087704	98167.087704	0.0000
Repetição	3	21.207312	7.069104	0.9998
Erro	91	57130.961679	627.812766	
Total	95	155319.256696		
Média Geral	205.6989583			
CV (%) = 10.5				

Tabela 85A Resumo da análise de variância para a variável Lixiviação de Potássio.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Tratamento	1	5418.015000	5418.015000	0.0000
Repetição	3	44.627500	14.875833	0.8982
Erro	91	6856.055833	75.341273	
Total	95	12318.698333		
Média Geral	48.1141667			
CV (%) = 11.66				

Tabela 86A Resumo da análise de variância para a variável PFO.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Tratamento	1	71.518537	71.518537	0.0000
Repetição	3	1.072433	0.357478	0.7722
Erro	91	87.111412	0.957268	
Total	95	159.702383		
Média Geral	63.3029167			
CV (%) = 1.55				

Tabela 87A Resumo da análise de variância para a variável Compostos Fenólicos Totais.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Tratamento	1	2.961037	2.961037	0.0000
Repetição	3	0.102258	0.034086	0.5785
Erro	91	4.697104	0.051617	
Total	95			
Média Geral	5.7075000			
CV (%) = 3.98				

Tabela 88A Resumo da análise de variância para a variável Massa de 50 grãos.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Tratamento	1	0.106001	0.106001	0.2696
Repetição	3	0.261803	0.087268	0.3896
Erro	91	7.819536	0.085929	
Total	95	8.187341		
Média Geral	6.6628125			
CV (%) = 4.40				

Tabela 89A Resumo da análise de variância para a variável Acidez Titulável Total.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Tratamento	1	2109.375000	2109.375000	0.0706
Repetição	3	494.791667	164.930556	0.8531
Erro	91	57369.791667	630.437271	
Total	95	59973.958333		
Média Geral	224,9791667			
CV (%) = 11.19				

Tabela 90A Resumo da análise de variância para a variável Sólidos Solúveis.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Tratamento	1	11.002604	11.002604	0.0062
Repetição	3	6.445312	2.148437	0.2105
Erro	91	127.278646	1.398666	
Total	95	144.726563		
Média Geral	36.4843750			
CV (%) = 3.24				

Tabela 91A Resumo da análise de variância para a variável Açúcares Totais.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Tratamento	1	100.860000	100.860000	0.9775
Repetição	3	1.856788	0.618929	0.6092
Erro	91	91.080886	1.012010	
Total	95	193.797674		
Média Geral	8.9894737			
CV (%) = 10.08				

COMPOSTOS BIOATIVOS – FRAÇÃO BOIA

Tabela 92A Resumo da análise de variância para a variável Cafeína.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Repetição	3	0,007950	0,002650	0,0161
Dose	5	0,083333	0,083333	0,0000
Aplicação	1	0,030000	0,006000	0,0000
Dose x Aplicação	5	0,136667	0,027333	0,0000
Erro	33	0,022050	0,000668	
Total	47	0,280000		
Média Geral	1,22			
CV (%) = 2.12				

Tabela 93A Resumo da análise de variância para a variável Trigonelina.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Repetição	3	0,002656	0,000885	0,0001
Dose	5	0,013669	0,013669	0,0000
Aplicação	1	0,220035	0,044007	0,0000
Dose x Aplicação	5	0,184369	0,036874	0,0000
Erro	33	0,003219	0,000098	
Total	47	0,423948		
Média Geral	0,8627083			
CV (%) = 1.14				

Tabela 94A Resumo da análise de variância a variável Ácido Clorogênico.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Repetição	3	0,005906	0,001969	0,0000
Dose	5	0,698419	0,698419	0,0000
Aplicação	1	7,634860	1,526972	0,0000
Dose x Aplicação	5	22,586194	4,517239	0,0000
Erro	33	0,000069	0,000002	
Total	47	30,925448		
Média Geral	4,5477083			
CV (%) = 0,03				

COMPOSTOS BIOATIVOS – FRAÇÃO CEREJA + VERDE

Tabela 95A Resumo da análise de variância para a variável Cafeína.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Repetição	3	0,013667	0,004556	0,0001
Dose	5	0,346667	0,069333	0,0000
Aplicação	1	0,213333	0,213333	0,0000
Dose x Aplicação	5	0,186667	0,037333	0,0000
Erro	33	0,016333	0,000495	
Total	47	0,776667		
Média Geral	1,2616667			
CV (%) = 1.76				

Tabela 96A Resumo da análise de variância para a variável Trigonelina.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Repetição	3	0,005656	0,001885	0,0000
Dose	5	0,332985	0,066597	0,0000
Aplicação	1	0,009919	0,009919	0,0000
Dose x Aplicação	5	0,303219	0,060644	0,0000
Erro	33	0,000219	0,000007	
Total	47	0,651998		
Média Geral	0,8285417			
CV (%) = 0.31				

Tabela 97A Resumo da análise de variância para a variável Ácido Clorogênico.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Repetição	3	0,005608	0,001869	0,0000
Dose	5	14,420775	2,884155	0,0000
Aplicação	1	0,304008	0,304008	0,0000
Dose x Aplicação	5	25,479842	5,095968	0,0000
Erro	33	0,000092	0,000003	
Total	47	40,210325		
Média Geral	4,78125000			
CV (%) = 0.03				

CONTRASTE COMPOSTOS BIOATIVOS BOIA E CEREJA + VERDE

Tabela 98A Resumo da análise de variância para a variável Cafeína.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Tratamento	1	0,041667	0,041667	0,0588
Repetição	3	0,021208	0,007069	0,6030
Erro	91	1,035458	0,011379	
Total	95	1,098333		
Média Geral	1,2408333			
CV (%) = 8.60				

Tabela 99A Resumo da análise de variância para a variável Trigonelina.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Tratamento	1	0,028017	0,028017	0,1258
Repetição	3	0,008012	0,002671	0,8772
Erro	91	1,067933	0,011736	
Total	95	1,103963		
Média Geral	0,8456250			
CV (%) = 12.81				

Tabela 100A Resumo da análise de variância para a variável Ácido Clorogênico.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Tratamento	1	1,309001	1,309001	0,1989
Repetição	3	0,011511	0,003837	1,0000
Erro	91	71,124261	0,781585	
Total	95	72,444774		
Média Geral	4,6644792			
CV (%) = 18.95				