

# MICROBIOTA ISOLADA DURANTE AS FASES DE PRÉ E PÓS-COLHEITA DOS GRÃOS DE CAFÉ ASSOCIADA À QUALIDADE E SANIDADE DA BEBIDA \*

MÁRCIA REGINA BEUX \*\*

CARLOS RICARDO SOCCOL \*\*\*

O objetivo desta revisão residiu em compilar dados sobre a microbiota dos grãos de café, visando correlacioná-la com procedimentos que permitam minimizar a contaminação microbiológica. Foram abordados o cultivo e o processamento dos grãos de café, os microrganismos a eles associados nas fases de pré e pós-colheita, bem como a contaminação por fungos, especificamente o *Aspergillus ochraceus* (produtor de ocratoxina). Concluiu-se que para manter a sanidade da bebida, a longo prazo, devem ser adotadas boas práticas de produção, porém em curto prazo é necessário buscar alternativas que inibam ou impeçam o desenvolvimento da toxina em grãos armazenados.

*PALAVRAS-CHAVE: CAFÉ, OCRATOXINA, Aspergillus ochraceus.*

## 1 INTRODUÇÃO

O cultivo do café no Brasil integra importante complexo agro-industrial, tornando-o o principal país exportador.

A aceitabilidade da bebida está interligada com uma série de fatores relacionados às fases de pré e pós-colheita dos grãos de café. Os atributos de classificação estão vinculados não só às condições naturais (solo, clima, chuvas e altitude do terreno), mas também aos cuidados adotados no cultivo (adubação, poda, seleção dos pés, coleta e manipulação dos frutos) (LUNA-FILHO, 2003).

\* Parte da Tese de Doutorado da primeira autora.

\*\* Doutoranda, Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná (UFPR) (e-mail: mrbeux@engquim.ufpr.br).

\*\*\* Professor Orientador, Pós-Doutorado em Biotecnologia, Institut Français de Recherche Scientific Pour le Devellopement en Cooperat, Orstom, França; Professor Coordenador, Curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, UFPR (e-mail: soccol@ufpr.br).

Duas espécies de café são exploradas comercialmente em nível mundial. *Coffea arabica* (arabica), considerada mais nobre, e *Coffea canephora* (robusta), mais ácida porém mais resistente à pragas (PETTIGREW, 1999).

Algumas espécies de microrganismos, principalmente bactérias lácticas, leveduras e fungos filamentosos estão associados com a má qualidade da bebida do café. Esses alteram seu sabor e aroma ou produzem metabólitos tóxicos potencialmente prejudiciais à saúde, como a ocratoxina A. (ALVES e CASTRO, 1998 e BITANCOURT, 1957). A ocratoxina A, metabólito termoestável e solúvel em água, é produzida por determinadas cepas de fungos filamentosos, sendo *Aspergillus ochraceus* a principal espécie pesquisada em café. Ocorre principalmente na etapa pós-colheita, quando os grãos são armazenados ou transportados em condições inadequadas de umidade.

Países importadores como Espanha, Itália e Holanda estão avaliando a segurança microbiológica dos lotes de grãos de café verde, desde 2002, mediante quantificação de ocratoxina A.

A presença de ocratoxina A em lotes de café produzido no Brasil pode comprometer não só as relações comerciais com países importadores, mas principalmente a saúde dos consumidores.

O objetivo desse trabalho foi compilar dados sobre a microbiota dos grãos de café, visando correlacioná-la com procedimentos que permitam minimizar a contaminação.

## 2 A CAFEICULTURA

Segundo DEMARCHI (2001), a produção mundial de café na última década apresentou crescimento de 2,7% ao ano situando-se, em média, em 103 milhões de sacas de 60 kg.

Dez países respondem por quase 80% da produção mundial de café. Desse percentual, a América do Sul, a Ásia, a América Central e a África participam, respectivamente, com 43%, 24%, 18% e 16%.

Brasil, Vietnã e Colômbia, 1º, 2º e 3º produtores mundiais, detém

quase metade da oferta mundial de café. A produção do Vietnã, que registrou aumento de 1169% entre 1989 e 2001, desbancou a Colômbia.

No Brasil, Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Paraná, Rondônia e Bahia são estados notoriamente produtores de café. Juntos representam 96% do café brasileiro, concentrando-se a produção de *Coffea arabica* em Minas Gerais, São Paulo, Paraná e Bahia, enquanto no Espírito Santo são cultivadas ambas as espécies.

Minas Gerais, maior produtor, concentra 47% da produção do café brasileiro, seguindo-se o Espírito Santo com 19% (maior produtor de café robusta). Na terceira colocação situa-se São Paulo, com 13%, e o Paraná, quarto maior produtor com 7% do café nacional, seria o terceiro se considerada apenas a produção de café arábica (DEMARCHI, 2001).

Da espécie *C. arabica* são cultivadas no Brasil variedades como Icatu, Obatã e Catuai, enquanto da *C. canephora* cultiva-se apenas a variedade conillon (LUNA-FILHO, 2003).

## 2.1 CULTIVO E PROCESSAMENTO DO CAFÉ

O cafeeiro, planta perene da família das Rubiáceas, pode atingir 10 a 12 metros de altura, porém é mantido entre 2 a 3 metros para facilitar a colheita dos frutos (LUNA-FILHO, 2003).

Os frutos, denominados “cerejas”, estão distribuídos nos ramos e sua coloração varia de acordo com o estágio de maturação entre verde, amarelo e vermelho. Quando adquirem coloração vermelho-escuro estão prontos para a colheita.

Na maioria das áreas de cultivo há uma colheita por ano, mas em países cujo clima permanece constante o ano todo ocorrem duas safras.

A escolha da época para colheita é fundamental, pois se os frutos não estiverem maduros não amadurecerão após colhidos. Ao contrário, grãos de frutos muito maduros sofrem alteração e basta apenas um

grão estragado numa saca para contaminar o restante e comprometer seu sabor (PETTIGREW, 1999).

Como os frutos amadurecem alternadamente, os apanhadores devem colher apenas alguns por vez e voltar aos mesmos arbustos a cada dez dias até o término da colheita. Depois de colhidas as cerejas são submetidas à diversas operações para retirada dos grãos. Existem duas tecnologias para obtenção do grão descascado: a via seca ou a via úmida (CLARKE e MACRAE, 1987). Por via seca, os frutos são espalhados ao sol por três a quatro semanas e rastelados de vez em quando para garantir secagem uniforme. Durante esse período ocorrem fermentações naturais por microrganismos, a polpa ou mucilagem degrada-se e o exocarpo torna-se quebradiço (café “coco”) permitindo separação dos grãos e casca pela sua passagem por peneiras vibratórias e ventilação. Esse processo predomina na cafeicultura brasileira e proporciona bebida mais encorpada e menos ácida, devido a migração dos açúcares da polpa para o grão durante a secagem. Entretanto, a bebida resultante é considerada de qualidade inferior à obtida pelo outro processo (MACHADO, 2002). Por via úmida, após a colheita, as cerejas são lavadas em água corrente e despulpadas mecanicamente. Seus grãos, imersos em água por até 36 horas, são naturalmente fermentados e posteriormente lavados e secos ao sol. Essa metodologia é mais onerosa e requer grandes volumes de água, originando bebida de melhor qualidade (PETTIGREW, 1999).

Depois que os grãos foram removidos dos frutos, por um dos dois métodos, resta uma película muito fina que também deve secar para que os mesmos possam ser armazenados. Os grãos são espalhados ao sol durante cerca de 14 dias ou depositados em bandejas e secos artificialmente para a obtenção do “café pergaminho”. Esse pode ser estocado por até um ano em sacos de juta ou outra fibra natural, desde que mantidas condições adequadas de temperatura e umidade relativa do ar. Os grãos expostos ao sol, em lugar arejado, secam rapidamente originando bebida de melhor qualidade. Já os que permanecem muitos dias no terreiro sem secar favorecem o desenvolvimento de microrganismos (LUNA-FILHO, 2003).

Antes de ser exportado, o “pergaminho” é removido por máquinas e os grãos submetidos ao polimento para apresentar aparência brilhante e coloração azulada (PETTIGREW, 1999).

### 3 MICRORGANISMOS ASSOCIADOS AO CAFÉ NAS FASES DE PRÉ E PÓS-COLHEITA DOS GRÃOS

LOPEZ-GARAY et al. (1988) isolaram microrganismos presentes em grãos de café cultivados na Bolívia e afirmaram que a qualidade da bebida pode ser mantida desde que sua contagem, durante a estocagem, seja inferior a 10.000 unidades formadoras de colônias por grama.

AVALLONE et al. (2001) consideram que os gêneros e espécies de bactérias lácticas mais freqüentes no café são *Leuconostoc* sp, *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus brevis*, já a microbiota fúngica é bem mais diversificada e heterogênea.

SILVA et al. (2000) isolaram a microbiota presente em cerejas de café de 15 localidades de Minas Gerais nas fases de pré e pós colheita. Das 624 cepas identificadas, 43,8% eram bactérias e 56,2% fungos, sendo 16,1% de leveduras e 40,1% de fungos filamentosos.

Os fungos compreendem seres eucarióticos, heterotróficos, aclorofilados e quimiotróficos, que obtêm energia mediante reações químicas nas quais substratos adequados são oxidados (TORTORA, 2000). São ubíquos e portanto encontrados no ar, no solo, na água, em vegetais e animais. Formam grupo complexo e divergente de microrganismos constituído por centenas de espécies (APHA, 2001).

Segundo LACAZ (1998), o reino Mycetalia ou Fungi engloba os fungos gelatinosos (Divisão Myxomycota) e os verdadeiros (Divisão Eumycota). Os Eumycota compreendem seres com organização miceliana e dependendo da origem dos esporos, sexuada ou assexuada, são divididos em fungos perfeitos ou imperfeitos (deuteromicetos), respectivamente.

Sob o ponto de vista morfológico torna-se conveniente distingui-los em fungos filamentosos ou bolores e leveduras. Essa distinção não tem valor taxonômico, pois ambas as formas podem ser encontradas no mesmo grupo de fungos.

Artificialmente, os fungos crescem sobre meios de cultura e apresentam colônias visíveis macroscopicamente. As leveduras formam

aglomerados de aspecto cremoso ou rugoso e nos bolores massas filamentosas.

Segundo MINAMI (2003), o substrato e a temperatura de incubação são fatores que interferem no dimorfismo (leveduriforme ou filamentosos) apresentado por algumas espécies.

### 3.1 LEVEDURAS

As leveduras são geralmente unicelulares, de forma esférica, elíptica ou filamentosa. O tamanho varia de 1 a 5  $\mu\text{m}$  de diâmetro a 5-30  $\mu\text{m}$  de comprimento (BORZANI et al., 2001). Compõem a microbiota natural de frutas e vegetais, sendo a colonização influenciada pelas condições ambientais, de colheita ou de armazenamento (SKINNER, 1980).

Segundo LACAZ (1998), as colônias apresentam coloração variada (branca, vermelha, amarela e preta) e são caracterizadas por reprodução mediante brotamento ou cissiparidade. Raramente formam micélio rudimentar e nunca micélio bem desenvolvido, sem formação de hifas aéreas, podendo ocorrer em algumas espécies a formação de pseudo-hifas.

As leveduras apresentam estruturas relativamente simples, porém de identificação mais complexa que a de outros fungos, sendo baseada em diferenças morfológicas e propriedades bioquímicas (HERITAGE, EVANS e KILLINTON, 1996).

Segundo LEITÃO et al. (1988), a ocorrência de espécies patogênicas em alimentos é praticamente desconhecida e considerada basicamente como agente de deterioração.

Condições seletivas para proliferação são condicionadas ao pH ácido (ótimo entre 4,0 e 4,5), valores de atividade de água inferiores a 0,94, temperatura entre 25°C e 28°C e substratos ricos em carboidratos (particularmente açúcares), razão pela qual tem como principal habitat a superfície de frutos e vegetais.

A utilização dos carboidratos pode ocorrer por meio de anaerobiose e por processos respiratório ou oxidativo.

Vários são os açúcares passíveis de utilização no processo metabólico, sendo o etanol e o gás carbônico os principais produtos finais da atividade fermentativa. Entre as leveduras oxidativas destacam-se *Candida* sp, *Pichia* sp, *Hansenula* sp, *Debaromyces* sp.

PEE e CASTELEIN (1971) isolaram leveduras presentes em amostras de café robusta na República do Congo, identificando oito espécies: *Candida guilliermondii*, *Candida parapsilopsis*, *Candida pelliculosa*, *Candida famata*, *Candida tropicalis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces marxianus* e *Rhodotorula mucilaginosa*.

### 3.2 FUNGOS FILAMENTOSOS

Os fungos filamentosos ou bolores são constituídos por células multinucleadas (cenocitos), formando tubos denominados hifas que entrelaçadas constituem o micélio (BORZANI et al., 2001).

O micélio pode ser vegetativo ou reprodutivo. O primeiro tem por finalidade absorver e metabolizar nutrientes e o segundo multiplicar, reproduzir, transmitir caracteres genéticos e perpetuar a espécie. Multiplicam-se por fragmentação das hifas ou formação de esporos mediante fusão (sexuadamente) ou dispersão dos mesmos no ambiente (assexuadamente) (LACAZ, 1998).

Os fungos imperfeitos ou deuteromicetos assumem importância diferenciada, pois apresentam micélio septado e reprodução exclusivamente assexuada com esporos exógenos formados em conidióforos. A identificação de gêneros e espécies está vinculada a coloração do micélio, além da forma, cor e disposição dos conídios (BORZANI et al., 2001).

ALVES e CASTRO (1998) isolaram fungos presentes nas fases de maturação (verde-cana, cereja, passa e seco no pé), chão e beneficiamento de cafés cultivados na cidade de Lavras, Minas Gerais. Identificaram *Colletotrichum* sp, *Phoma* sp, *Cercospora* sp, *Fusarium* sp, *Cladosporium* sp, *Penicillium* sp e *Aspergillus* sp. *Colletotrichum* sp e *Phoma* sp foram isolados nas fases verde-cana e cereja, já *Cercospora* sp apenas na fase verde-cana. A ausência desses fungos nas fases posteriores pode ser devido a gêneros como *Fusarium* sp,

*Penicillium* sp e *Cladosporium* sp aproveitarem-se das injúrias provocadas nos frutos pelos primeiros para penetrarem e colonizarem os tecidos mais rapidamente. *Fusarium* sp foi encontrado em todas as fases, sendo as maiores percentagens verificadas nas fases cereja, passas, seco no pé e chão. *Penicillium* sp, presente em todas as fases, apresentou maior percentagem no café beneficiado, talvez por suportar baixa umidade (condição de armazenamento). *Cladosporium* sp também foi isolado em todas as fases, porém com maior incidência nas fases passas e seco no pé. Quanto ao *Aspergillus* sp, as espécies *Aspergillus niger* e *Aspergillus ochraceus* (relacionadas com bebida de pior qualidade) foram encontradas a partir das fases de passas, com maior incidência na fase chão e de café beneficiado.

Segundo DAIVASIKAMANI e KANNAN (1986), a presença dos gêneros *Cladosporium* sp, *Penicillium* sp e *Aspergillus* sp está associada aos grãos de café na fase pós-colheita.

TANIWAKI, IAMANAKA e VICENTINI (2003) isolaram e identificaram as espécies de fungos filamentosos presentes em amostras de grãos de *Coffea arabica*, provenientes de três regiões do estado de São Paulo (Parapuã, Franca e Pirajú), nos estágios de cereja na árvore, cereja no chão, passas na árvore, passas no chão, terreiro e tulha. Os gêneros isolados foram *Penicillium* sp, *Fusarium* sp, *Aspergillus niger* e *Aspergillus ochraceus* (produtor de ocratoxina A). A frequência de *Aspergillus ochraceus* foi menor em grãos da árvore e solo, contudo na fase de secagem (terreiro e tulha) houve predominância dessa espécie.

TANIWAKI, BANHE e IAMANAKA (1998) analisaram amostras de café provenientes de Minas Gerais e isolaram *Alternaria alternata*, *Fusarium incarnatum*, *Phoma sorghina*, *Penicillium aurantiogriseum* e *Aspergillus ochraceus*.

ROUSSOS et al. (1995) identificaram os gêneros *Aspergillus* sp, *Penicillium* sp, *Trichoderma* sp, *Fusarium* sp e *Humicola* sp de amostras de cerejas de café originárias do México.

MILISVEC, BRUCE e GIBSON (1983) isolaram e identificaram as espécies de fungos filamentosos presentes em 865 amostras de grãos



de café verde provenientes de 26 Países, reportando 100% de contaminação por *Aspergillus ochraceus*.

### 3.4 FUNGOS TOXIGÊNICOS

O desenvolvimento de fungos toxigênicos e a produção de micotoxinas depende de complexo conjunto de fatores. Os principais são a suscetibilidade do substrato, a colonização do fungo produtor, a temperatura e a umidade do substrato, a umidade relativa do ar durante o armazenamento e a capacidade biológica do fungo produzir micotoxinas (SCUSSEL, 2000).

Segundo BLACK (2002) micotoxinas são metabólicos secundários produzidos por algumas espécies de fungos, que quando ingeridos causam alterações biológicas prejudiciais aos seres humanos e aos animais. Tais metabólitos, quimicamente diversos, podem estar contidos no micélio, no interior dos esporos ou serem liberados no alimento contaminado por esses microrganismos.

Segundo FORSYTHE (2002), a toxicidade das micotoxinas pode ser subdividida em aguda (provoca danos aos rins ou fígado), crônica (resulta em câncer de fígado), mutagênica (causa danos ao DNA) e teratogênica (provoca câncer em crianças por nascer). A preocupação reside também na possibilidade do aparecimento de tumores malignos relacionados com a ingestão repetida de baixas doses (sub-agudas) de micotoxinas.

Considerando-se a ocorrência de micotoxinas em alimentos é importante realçar que nem todas as cepas da mesma espécie são toxigênicas. A presença de fungo viável produtor de toxina não indica necessariamente que a toxina esteja presente. Além disso, pode-se detectar micotoxina na ausência de fungos viáveis. Os incidentes de casos de micotoxicidade aguda, nos quais pode-se determinar a relação causa-efeito são raros e afetam sempre espécies sensíveis expostas a alimentos muito contaminados. Algumas micotoxinas podem induzir a formação de lesões orgânicas em animais após ingestão repetida de pequenas quantidades. O controle das micotoxinas deve buscar o equilíbrio prático entre a eliminação completa e nível baixo, porém tolerável (ICMSF, 2000).

Numerosos fungos foram testados em laboratório visando detectar a produção de micotoxinas. As principais espécies produtoras pertencem aos gêneros *Alternaria* sp (muitas espécies), *Aspergillus* sp (mais de vinte espécies), *Chaetomium globosum*, *Cladosporium* sp (pelo menos duas espécies), *Claviceps* sp (pelo menos duas espécies), *Fusarium* sp (pelo menos seis espécies), *Gibberella zea*, *Paecilomyces variota* (*Byssosclamyces fulva*), *Penicillium* sp (mais de quinze espécies), *Myrothecium* sp (pelo menos duas espécies), *Phoma herbarium*, *Pithomyces chartarum*, *Rhizopus oryzae*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Stachybothys atra* e *Trichoderma lignorum* (SCUSSEL, 2000). Entretanto, os gêneros *Aspergillus* sp, *Penicillium* sp e *Fusarium* sp são os mais freqüentemente associados com micotoxinas que ocorrem naturalmente em cereais, grãos e sementes em níveis que tornam os alimentos impróprios para consumo (APHA, 2001).

*Aspergillus ochraceus* K.Wilh (classificado também como *Aspergillus alutaceus*) pertence ao Reino Mycetalia, Sub-divisão Deuteromycotina, Classe Hyphomycetes (conídios formados em conidióforos), Família Aspergillaceae, Gênero *Aspergillus* sp e Espécie *Aspergillus ochraceus* (POHLAND, NESHEIM e FRIEDMAN, 1992). Em meio sólido as colônias são circulares com aproximadamente 40-55 mm de diâmetro, planas ou sulcadas, micélio branco, membrana do conidióforo caracteristicamente rugosa, amarelo ocre a amarelo dourado com conídios na mesma tonalidade (LACAZ, 1998). Desenvolve-se em temperatura entre 8°C e 37°C (temperatura ótima 24-31°C), atividade de água mínima de 0,76 a 25°C (aw ótima 0,95-0,99) e pH entre 3-10 (PITT e HOCKING, 1997).

Segundo SCUSSEL (1998), o grupo das ocratoxinas divide-se em ocratoxina A, ocratoxina B e ocratoxina C. Quimicamente, são compostos que apresentam uma  $\beta$ -fenilalanina ligada a uma isocumarina por ligação amida. A ocratoxina A apresenta fluorescência verde e uma molécula de Cloro na fórmula (radical R1), responsável pelo caráter tóxico. A ocratoxina B, fluorescência azulada, não revela toxicidade pela ausência de molécula de Cloro. A ocratoxina C com fluorescência verde, constitui um etil éter da ocratoxina A, sendo muito menos tóxica que a outra.

A ocratoxina A tem sido encontrada em cereais diversos, alimentos de origem vegetal, cerveja, vinho, suco de uva, grãos de café verde e

torrado e café solúvel (FURLANI, SOARES e OLIVEIRA, 1999).

A ocratoxina A é nefrotóxica e tem ação teratogênica. O fígado constitui alvo secundário da toxina (SCUSSEL, 1998). A nefropatia endêmica dos Balcãs, doença degenerativa dos rins em humanos, tem sido correlacionada com altos níveis de contaminação por ocratoxina A nos alimentos daquela região (FURLANI, SOARES e OLIVEIRA, 1999). Apesar do *Aspergillus ochraceus* desenvolver-se a partir de 0,76 de atividade de água, a ocratoxina é produzida a partir de 0,85 (sendo 0,97 a aw ótima). A temperatura em que ocorre a produção da toxina situa-se entre 12°C e 37°C (ótima de 25°C) e o pH ótimo de produção entre 5-6 (MOSS, 1996).

FURLANI, OLIVEIRA e SOARES (1998) consideram que a produção de ocratoxina A ocorre no café principalmente na etapa pós-colheita, quando os grãos são transportados e armazenados em condições de umidade relativa alta ou ainda úmidos, independentemente da espécie (*C. arabica* ou *C. canephora*).

Segundo CLARKE e MACRAE (1987), a umidade relativa do ar deve ser inferior a 74% para evitar o desenvolvimento de fungos como *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus* e *Rhizopus* sp.

Diversos pesquisadores isolaram cepas de fungos em amostras de grãos de café verde e torrado, avaliando a produção de ocratoxina A. Das 991 cepas de *Aspergillus* sp e *Penicillium* sp de amostras de grãos de café verde do Egito, isoladas por ABD-ALLA, SAHAB e ALY (1997), 45 (4,54%) eram produtoras de Ocratoxina A. De 25 amostras de grãos de café exportados para a Suíça, avaliadas por STUDER-ROHR et al. (1995), 13 (52%) continham ocratoxina A em níveis de até 7,8 ng/g.

MICCO et al. (1989) avaliaram 627 amostras de grãos de café verde provenientes do Brasil, da Costa Rica, do México e da África. Afirmaram que 56 (9%), estavam contaminadas com ocratoxina A em níveis que variaram entre 0,5 e 360 ng/g e que a incidência independe da espécie cultivada (*C. arabica* ou *C. canephora*).

FURLANI, OLIVEIRA e SOARES (1998) analisaram 50 amostras de café verde provenientes do Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Espírito

Santo, Roraima e Bahia. Encontraram ocratoxina em 15 (30%) amostras, em níveis que variaram entre 0,8 ng/g a 117,4 ng/g.

TSUBOUCHI et al. (1988) isolaram em grãos de café verde uma cepa de *Aspergillus ochraceus* produtora de ocratoxina A e avaliaram sua estabilidade ao calor após torrefação dos grãos artificialmente contaminados a 200°C. Verificaram que a ocratoxina foi reduzida em apenas 12%.

BURDASPAL e LEGARDA (1998) analisaram 37 amostras de café torrado comercializado na Espanha e observaram que todas apresentaram contaminação (níveis de ocratoxina A entre 0,19 ng/g e 5,65 ng/g).

PRADO et al. (2000) verificaram que 73% das amostras de café torrado comercializado em Minas Gerais evidenciaram contaminação por ocratoxina A entre 0,31 ng/g a 5,87 ng/g.

STEGEN et al. (1997) avaliaram a presença de ocratoxina em 633 amostras de café solúvel comercializado em diversos países da Europa. Dessas, 299 (47,23%) apresentaram resultado positivo (04 em níveis entre 10 ng/g e 27,2 ng/g e as demais inferiores a 10 ng/g).

PATEL et al. (1997) pesquisaram a presença de ocratoxina A em 100 amostras de café solúvel comercializado na Inglaterra, reportando que 64 apresentaram níveis de contaminação entre 0,1 ng/g e 8 ng/g.

Segundo VARGAS, SANTOS e PITTET (2003), nem o Brasil (principal consumidor e exportador) nem os países importadores de café dispõem de plano de avaliação da contaminação de lotes de café verdes em grãos por ocratoxina A. Com exceção da Itália, que em 1996 propôs limite de 4 ng/g de ocratoxina A, os demais países não dispõem de padrões legais. A União Européia estabeleceu, em março de 2002, limites de tolerância para essa micotoxina em cereais e passas, estando prevista a padronização para o café em dezembro de 2003.

Países como Espanha, Itália e Holanda vêm avaliando a qualidade de lotes de cafés brasileiros. Em 2002, dois alertas máximos (em março e abril) foram expedidos pela União Européia ao Itamarati - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento sobre a devolução de lotes

de café brasileiro exportados com níveis indesejáveis de ocratoxina A (>10 ng/g) (VARGAS, SANTOS e PITTET, 2003).

Para minimizar o impacto sobre a exportação do café brasileiro torna-se necessário, além de identificar os fatores críticos que contribuem para a contaminação, adequar a metodologia empregada na quantificação da ocratoxina A (a União Européia propõe limite de tolerância de 5 ng/g). Para que limites mais baixos sejam alcançados, vários procedimentos de quantificação da ocratoxina A em café tem sido propostos. O café, matriz especialmente complexa, exige limpeza adequada do extrato para remoção dos interferentes (FURLANI, SOARES e OLIVEIRA, 1999).

Segundo a APHA (2001), os extratos devem ser adequadamente purificados para remover substâncias presentes nos substratos como lipídios e pigmentos que possam interferir nas técnicas analíticas. A quantificação pode ser realizada por cromatografia, cromatografia em camada delgada (TLC), cromatografia a líquido de alta eficiência (HPLC), cromatografia a gas (GC) ou cromatografia a gas acoplada a espectrometria de massa (GCMS) com detecção, dependendo da metodologia, realizada por luz ultravioleta, fluorescência, eletroquímica ou ionização.

CANTAFORA et al. (1983) introduziram a cromatografia a líquido de alta eficiência com detecção por fluorescência para separar a ocratoxina A. Reduziram o limite de detecção em 100 vezes (0,2 ng/g) quando comparado ao do método oficial (de 20 ng/g), descrito primeiramente em 1975 e mantido pelos procedimentos analíticos contidos na AOAC INTERNATIONAL (1997).

Estudo interlaboratorial colaborativo está sendo realizado por vários laboratórios, visando padronizar a metodologia, cujos resultados preliminares demonstraram-se satisfatórios. A metodologia sugerida fundamenta-se na extração da ocratoxina A com metanol e solução aquosa de bicarbonato de sódio 3%, filtração e diluição do extrato com solução tampão de salina fosfatada (PBS-phosphate buffered saline), purificação em coluna de imunoafinidade contendo anticorpos específicos, lavagem, eluição com metanol e quantificação por cromatografia a líquido de alta eficiência com detector de fluorescência (VARGAS, SANTOS E PITTET, 2003).

## 4 CONCLUSÃO

Para assegurar a qualidade e sanidade do café exportado, em longo prazo, é fundamental identificar os fatores críticos que contribuem para a contaminação e a adoção de boas práticas de produção. Entretanto, em curto prazo é imprescindível buscar alternativas que inibam ou impeçam o desenvolvimento do *Aspergillus ochraceus* em grãos contaminados.

### Abstract

#### **ISOLATED MICROBIOT DURING PRE AND POST-HARVEST STAGES OF COFFEE GRAINS ASSOCIATED TO QUALITY AND SANITARY CONDITIONS OF THE BEVERAGE**

The aim of this review was to aggregate data about coffee grains microbiot, aiming to correlate it with the procedures which allows to minimize the microbiological contamination. The cultivation and processing procedures of coffee grains were described, the microorganisms associated in pre and post harvest stages, as well as the contamination by fungi, specifically *Aspergillus ochraceus* (producer of ochratoxin). It was concluded that to maintain the sanitary conditions of the beverage, to long term, good manufacturing practices must be adopted, even so in short term it is necessary to search for alternatives that inhibit or impede the toxin development in stored grains.

**KEY-WORDS:** COFFEE; OCHRATOXIN, *Aspergillus ochraceus*.

### REFERÊNCIAS

- 1 ABD-ALLA, E.A.M.; SAHAB, A.F.; ALY, S.E. Formation of micotoxins by toxigenic fungi isolated from green coffee. **Egyptian Journal of Microbiology**, v. 32, n. 4, p. 481-491, 1997.
- 2 ALVES, E.; CASTRO, H.A. de. Fungos associados ao café (*Coffea arábica* L.) nas fases de pré e pós-colheita em lavouras da região de Lavras. **Summa Phytopathologica**, v. 24, n. 1, p. 4-7, 1998.
- 3 AOAC. **Official methods of analysis of AOAC international**. 16<sup>th</sup> ed. Gaithersburg, MD, 1997. (Method 975.38).
- 4 APHA. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4<sup>th</sup> ed. Washington, 2001.
- 5 AVALLONE, S.; GUYOT, B.; BRILLOUET, J.M. et al. Microbiological and biochemical study of coffee fermentation. **Current Microbiology**, v. 42, p. 252-256, 2001.

- 6 BITANCOURT, A. A. As fermentações e podridões da cereja de café. **Boletim da Superintendência dos Serviços do Café**, v. 32, n. 359, p. 7-14, 1957.
- 7 BLACK, J.G. **Microbiologia**: fundamentos e perspectivas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 829 p.
- 8 BORZANI, W. et al. (Coords.). **Biotecnologia industrial**: fundamentos. São Paulo: E. Blücher, 2001. v.1.
- 9 BURDASPAL, P.A.; LEGARDA, T.M. Ochratoxin A in roasted and soluble coffes marketed in Spain. **Alimentaria**, n.296, p. 31-35, 1998. (Abstract).
- 10 CANTAFORA, A.; GROSSI, M.; MIRAGLIA, M.; BENELLI, L. Determination of ochratoxin A in coffee beans using reverse-phase high performance liquid chromatography. **Riv. Soc. Ital. Alimen.**, v. 12, p. 103-108, 1983.
- 11 CLARKE, R.J.; MACRAE, R. (Ed.). **Coffee**: technology. London: Elsevier, 1987. v.2.
- 12 DAIVASIKAMANI, S.; KANNAN, N. Studies on post-harvest mycoflora of coffee cherry of robusta. **J. Coffee Res.**, v. 16, n. 3-4, p. 102-106, 1986.
- 13 DEMARCHI, M. **Café**: aspectos econômicos. [Curitiba]: SEAB, Dep. De Economia Rural, 2001.
- 14 FORSYTHE, S.J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002. 424 p.
- 15 FURLANI, R.P.Z.; OLIVEIRA, P.L.; SOARES, L.M.V. Incidência de ocratoxina A em café verde proveniente de várias regiões produtoras brasileiras. In: ENCONTRO NACIONAL DE MICOTOXINAS, 9., 1998; SIMPÓSIO EM ARMAZENAGEM QUALITATIVA DE GRÃOS DO MERCOSUL, 1., 1998, Florianópolis. **Livro de resumos...** Florianópolis: UFSC/Dep. Ciência e Tecnologia de Alimentos/Centro de Ciências Agrárias; Sociedade Latino-Americana de Micotoxicologia, 1998. p. 117.
- 16 FURLANI, R.P.Z.; SOARES, L.M.V.; OLIVEIRA, P. L. Avaliação de métodos para determinação de ocratoxina em cafés verdes e torrados. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 58, n. 2, p. 87-98, 1999.
- 17 HERITAGE, J.; EVANS, E G V.; KILLINGTON, R A. **Introductory microbiology**. Cambridge: University of Cambridge, 1996.
- 18 ICMSF. **Microrganismos de los alimentos**. 2.ed. Zaragoza: Acribia, 2000. v. 1.
- 19 LACAZ, C. da S. et al. **Guia de identificação**: fungos actinomicetos

- algas de interesse médico. São Paulo: Sarvier, 1998. 45 p.
- 20 LEITÃO, M.F. de F.; HAGLER, L.C.S.M.; HAGLER, A.N.; MENEZES, T.J.B. de. **Tratado de microbiologia**. [Rio de Janeiro]: Manole, 1988. v.1
  - 21 LOPEZ-GARAY, C. et al. Microflora of the stored coffee and its influence on quality. In: INTERNATIONAL SCIENTIFIC COLLOQUIUM ON COFFEE, 12., 1988. **Abstract...** Paris, France: Association Scientifique International du Café, 1988.
  - 22 LUNA-FILHO, Eury P. **Cafés do Brasil e indicações geográficas**. Disponível em: <<http://www.coffeebreak.com.br/ocafezal.asp?SE=8&ID=99>>. Acesso em 31 jan. 2003.
  - 23 MACHADO, C.M.M. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de hormônio vegetal (ácido giberélico – GA<sub>3</sub>) por fermentação no estado sólido em resíduos agroindustriais brasileiros**: relação da produção de GA<sub>3</sub> em biorreator piloto e bioensaios em mudas de tomateiro (*Lycopersicum esculentum*). Curitiba, 2002. 95 f. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos), Área de Concentração Agroindústria, Departamento de Tecnologia Química, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.
  - 24 MICCO, C. et al. A study of the contamination by ochratoxin A of green and roasted coffee beans. **Food Additives and Contaminants**, v.6, n.3, p.333-339, 1989.
  - 25 MINAMI, P.S. **Micologia**: métodos laboratoriais de diagnósticos das micoses. Barueri, SP: Manole, 2003.
  - 26 MISLIVEC, P.B.; BRUCE, V.R.; GIBSON, R. Incidence of toxigenic and other molds in green coffee beans. **J. Food Protection**, v.46, n.11, p. 969-973, Nov. 1983.
  - 27 MOSS, M. Mode of formation of ochratoxin A. **Food Additives and Contaminants**, v.13, Suplem., p.5-9, 1996.
  - 28 PATEL, S.; HAZEL, C.M.; WINTERTON, A.G.M. et al. Survey of ochratoxin A in UK retail coffees. **Food Additives and Contaminants**, v. 14, n. 3, p. 217-222, 1997.
  - 29 PEE, W. V.; CASTELEIN, J. The yeast flora of fermenting robusta coffee. **East African Agricultural and Forestry Journal**, v. 36, p. 308-310, Jan. 1971.
  - 30 PETTIGREW, Jane. **Café**. São Paulo: Nobel, 1999.
  - 31 PITT, J.I.; HOCKING, A.D. **Fungi and food spoilage**. 2<sup>nd</sup> ed. London: Academic Press, 1997.
  - 32 POHLAND, A.E.; NESHEIM, S.; FRIEDMAN, L. Ochratoxin A: a review.



- Pure & Appl. Chem.**, v. 64, n. 7, p. 1029-1046, 1992.
- 33 PRADO, G. et al. Incidência de ocratoxina A em café torrado e moido e em café solúvel consumido na Cidade de Belo Horizonte, MG. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 20, n.2, p. 192-196, 2000.
- 34 PRADO, G. et al. Ochratoxin A determination in beer by immunoaffinity column clean-up and high-performance liquid chromatography. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, supl., p. 58-61, 2003.
- 35 ROUSSOS, S. et al. Biotechnological management of coffee pulp-isolation, screening, characterization, selection of caffeine-degrading fungi and natural microflora present in coffee pulp and husk. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 42, n. 5, p. 756-762, 1995. (Abstract).
- 36 SCUSSEL, Vildes Maria. **Atualidades em micotoxinas e armazenagem de grãos**. Florianópolis: Ed. da Autora, 2000. 382 p.
- 37 SCUSSEL, Vildes Maria. **Micotoxinas em alimentos**. Florianópolis: Insular, 1998. 144 p.
- 38 SILVA, C.F.; SCHWAN, R.F.; DIAS, E.S.; WHEALS, A.E. Microbial diversity during maturation and natural processing of coffee cherries of Coffee arábica in Brazil. **Int. J. Food Microb.**, v. 60, p. 251-260, 2000.
- 39 SKINNER, F.A. et al. **Biology and activities of yeasts**. London: Academic Press, 1980. 310 p.
- 40 STEGEN, G.V.D.; JÖRISSEN, U.; PITTET, A. et al. Screening of European coffee final products for occurrence of ochratoxin A (OTA). **Food Additives and Contaminants**, v.14, n. 3, p. 211-216, 1997.
- 41 STUDER-ROHR, I.; DIETRICH, D.R.; SCHLATTER, J.; SCHLATTER, C. The occurrence of ochratoxin A in coffee. **Food Chem. Toxic.**, v.33, n.5, p.341-355, 1995.
- 42 TANIWAKI, Marta Hiromi; BANHE, A.A.; IAMANAKA, Beatriz Thie. Fungos produtores de ocratoxina em café. In: ENCONTRO NACIONAL DE MICOTOXINAS, 9., 1998; SIMPÓSIO EM ARMAZENAGEM QUALITATIVA DE GRÃOS DO MERCOSUL, 1., 1998, Florianópolis. **Livro de resumos...** Florianópolis: UFSC/Dep. Ciência e Tecnologia de Alimentos/Centro de Ciências Agrárias; Sociedade Latino-Americana de Micotoxicologia, 1998. p. 107.
- 43 TANIWAKI, Marta Hiromi; IAMANAKA, Beatriz Thie; VICENTINI, Maria Carolina. **Fungos produtores de ocratoxina e ocratoxina A em cafés**. Disponível em: <<http://www.coffeebreak.com.br/ocafezal.asp?SE=8&ID=119>>. Acesso em 31 jan. 2003.
- 44 TORTORA, Gerald et al. **Microbiologia**. 6.ed. Porto Alegre: Artes

Médicas Sul, 2000. 827 p.

- 45 TSUBOUCHI, H.; TERADA, H.; YAMAMOTO, K. et al. Ochratoxin A found in commercial roast coffee. **Proceedings of the Japanese Association of Micotoxicology**, n. 1, Supl., p. 87-88, 1988. (Abstract).
- 46 VARGAS, E.A.; SANTOS, E.A. dos; PITTET, A. **Determination of ochratoxin A in green coffee by imunoaffinity column clean up and LC**. [Belo Horizonte: Ministério da Agricultura e do Abastecimento, Lab. de Controle de Qualidade e Segurança Alimentar], [2002].