



UNICAMP

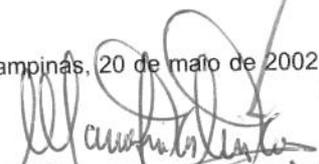
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS  
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

**“Ocorrência e Desenvolvimento de *Aspergillus ochraceus* em Café e Influência da Torração e do Preparo da Infusão nos Níveis de Ocratoxina A”.**

**PARECER**

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **Gisele Ross Urbano**, aprovada pela Comissão Julgadora em 20 de maio de 2002.

Campinas, 20 de maio de 2002

  
Prof. Dr. **Mauro Faber de Freitas Leitão**  
Presidente da Banca

**GISELE ROSS URBANO**

**Bióloga, Msc. Ciência de Alimentos**

Orientador

**f. Dr. Mauro Faber de Freitas Leitão**

Co-orientadora

**Dra. Marta H. Taniwaki**

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Tecnologia de Alimentos.

Campinas, S.P.

Março/2002



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS  
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**“Ocorrência e Desenvolvimento de *Aspergillus  
ochraceus* em Café e Influência da Torração e do  
Preparo da Infusão nos Níveis de Ocratoxian A”.**

**GISELE ROSS URBANO**

Bióloga, Msc. Ciência de Alimentos

Orientador

**Prof. Dr. Mauro Faber de Freitas Leitão**

Co-orientadora

**Dra. Marta H. Taniwaki**

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da  
Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor  
em Tecnologia de Alimentos

Campinas, S.P.  
Maio/2002

**UNICAMP**  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

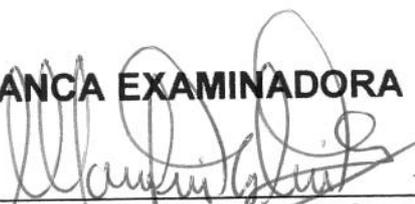
FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

Urbano, Gisele Ross  
Urlo Ocorrência e desenvolvimento de *Aspergillus Ochraceus* em  
café e influência da torração e do preparo da infusão dos níveis  
de ocratoxina A / Gisele Ross Urbano. – Campinas, SP: [s.n.]  
2002.

Orientador: Mauro Faber de Freitas  
Co-orientador: Marta Hiromi Taniwaki  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Café. 2 *Aspergillus ochraceus*. 3.Micotoxinas. I.Leitão,  
Mauro Faber de Freitas Leitão. II. Taniwaki, Marta Hiromi  
III.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia  
de Alimentos. IV.Título.

**BANCA EXAMINADORA**



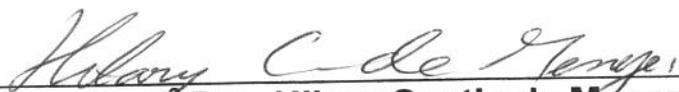
---

**Prof. Dr. Mauro Faber de Freitas Leitão**  
Orientador

Faculdade de Engenharia de Alimentos/DTA/FEA

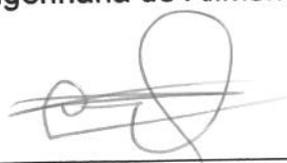
---

**Profª Dra. Lúcia Maria Valente Soares**  
Faculdade de Engenharia de Alimentos/DCA/FEA



---

**Profª Dra. Hilary Castle de Menezes**  
Faculdade de Engenharia de Alimentos/DTA/FEA



---

**Prof Dr. Benedito Correa**  
Universidade de São Paulo/Inst. Ciências Biomédicas

---

**Prof. Dr. Arnaldo Yoshiteru Kuaye**  
Faculdade de Engenharia de Alimentos/DTA/FEA



---

**Dr. Alfredo de Almeida Vitalli**  
Pesquisador do Instituto de Tecnologia de Alimentos/Campinas  
(Suplente)

---

**Dra. Myrna Sabino**  
Instituto Adolpho Lutz/SP  
(Suplente)

07662002

*Acantana*

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

**Aos meus pais, meus irmãos e à minha família de Jaú, pelo apoio incondicional. Obrigada por confiarem em mim, e por serem minha família....**

**Aos meus queridos e especiais amigos, Susana, Ricardo, Maria Paula e Leticia, por serem nossa “família em Campinas”....**

**Ao meu querido Alexandre, por ser parte tão importante e imprescindível em minha vida.**

**“Sonho que se sonha só, é só um sonho que se sonha só, mas sonho que se sonha junto é realidade”.**

**(Raul Seixas).**

## AGRADECIMENTOS

É neste momento que posso expressar minha gratidão àquelas pessoas que efetivamente participaram deste projeto e da minha vida durante os últimos quatro anos...

**Ao prof. Mauro Leitão**, orientador e amigo, pela disponibilidade e confiança, disposição, incentivo, pela mão sempre estendida, e pelo conhecimento transmitido nesses anos de convivência;

**A Dra. Marta H. Taniwaki**, do Itai, pela orientação, e por ter cedido o Lab. de Micologia e Micotoxinas da Seção de Microbiologia do ITAL, para que essa tese pudesse ser desenvolvida com sucesso;

Muito obrigada a **Carol**, pela inestimável ajuda e amizade no desenvolvimento deste trabalho;

Meu “muito obrigada” também ao pesquisador da Nestlé, **Adão Sebastião de Bones**, pela dedicação e competência nas análises de HPLC e sobretudo pela atenção e amizade;

Agradeço sobremaneira aos produtores de café, pela cordialidade com que me receberam e forneceram o produto:

- **José Carlos Gonçalves**, da Fazenda São João do Alto-Cajuru-S.P.;
- **Pedro Favoretto**, da Fazenda Planalto-Bela Vista do Paraíso-Pr.;
- **Alexandre Hüsemann Silva**, da Fazenda São Pedro do Ibiruçu-Esp. Santo do Pinhal-S.P.

Agradeço também à Companhia Cacique de Café Solúvel (Londrina-Pr.), na pessoa do estimado “**Macarrão**”, que tantas vezes me ajudou nas coletas de café;

Meu muito obrigada a estimada **profa. Dra. Hilary C. de Menezes**, por tantas sugestões de extrema importância e pela amizade no decorrer deste trabalho;

Também agradeço ao pesquisador do GEE/ITAL, **Dr. Alfredo Vitalli**, pelas excelentes discussões, opiniões e pela amizade;

Muito obrigada à pesquisadora do LAFISE/ITAL, **Dra. Emília E. M. Mori**, pelas valiosas sugestões;

A **Karina Bonadia**, do FHRUTOTEC/ITAL, pelo apoio na execução de análises imprescindíveis neste trabalho;

A todos os colegas (**Abel, Bia, Taíssa, Andreza, Vermelhinha...**) e funcionários (**Scheilla, Cláudia, Adelaide, Luciara, Rosana, Dionir...**) do Núcleo de Microbiologia do ITAL, “**muito obrigada**” pela amizade e convivência nestes anos;

As pesquisadoras da Microbiologia, **Maria Fernanda, Neliane, Valéria e Neusely**, por terem me recebido sempre de braços abertos;

Aos pesquisadores do Núcleo de Pesticidas e Centro de Química/ITAL, **Jorge José Oliveira e Eduardo Vicente**, pelas explicações e discussões tão importantes;

A todos os funcionários, motoristas (**Araújo e Carlinhos**), pessoal da Planta 2 e pesquisadores de diferentes Centros do ITAL, que ajudaram pra que esse trabalho fosse concretizado;

Ao pessoal do Laboratório de Frutas da UNICAMP, especialmente as colegas **Luciane e Kelly**, na ajuda no uso do torrador;

Meu muito obrigada ao pessoal do **CENA/Piracicaba**, especialmente a **Luís Anselmo e Regina**, que realizaram todas as esterilizações de café necessárias neste projeto;

E, finalmente, **agradeço a FAPESP**, pela Bolsa de Estudos concedida e pela ajuda financeira imprescindível na execução deste trabalho.

## RESUMO GERAL

Este trabalho teve como objetivos principais estudar a presença e identificar fungos produtores de ocratoxina A (OTA) em diferentes fases de maturação do café, assim como quantificar a produção da toxina em cafés de terreiros e tulhas. Através de plaqueamento direto verificou-se elevada contaminação fúngica das sementes de café estudadas (100%), com o gênero *Aspergillus* ocorrendo em níveis de 33,2%, sendo que *A. ochraceus* e *A. niger*, representaram 10,3 e 22,9%, respectivamente, das cepas isoladas das sementes de café. Um total de 155 cepas de *A. ochraceus* e *A. niger* foram avaliados quanto à capacidade de produção de ocratoxina por Ágar Plug e extração com clorofórmio, constatando-se que 88,1% das cepas de *A. ochraceus* e 11,5% das cepas de *A. niger* foram positivas. Na análise de OTA em amostras de cafés de terreiro e tulha, independentemente do cultivar, ano de safra e da região produtora, todas as amostras analisadas, com exceção de uma delas, mostraram níveis de OTA abaixo do limite sugerido pela União Européia (8µg/Kg), indicando, portanto, que a ocorrência do problema parece ser bastante restrita e decorrente de falhas muito grosseiras nas práticas de colheita e armazenamento. Também foi avaliada a influência da atividade de água (Aa) na produção de OTA por cepas de *A. ochraceus* isoladas de frutos de café à 25°C. Primeiramente, desenvolveu-se a isoterma de adsorção de sementes de café, verificando-se a relação entre o teor de umidade no armazenamento e valores correspondentes de Aa. Para verificar a adequabilidade do café como substrato para produção de OTA, foram realizados experimentos inoculando-se 10<sup>8</sup> esporos/ml de *A. ochraceus* e *A. niger* em cafés mantidos em ambiente saturado de água, incubando-se durante 50 dias à 25°C com amostragem e análises de OTA nos intervalos de 10, 20, 30, 40, 45 e 50 dias. Foram constatados níveis de 59, 64, 117, 213, 245 e 194 µg/kg de OTA nos inóculos com *A. ochraceus* e nos experimentos com *A. niger* não foi detectada toxina, mesmo após 50 dias de incubação. Numa segunda etapa, utilizando-se

como referências valores de Aa limitantes para o crescimento fúngico (0,77) e para produção de OTA (0,83), o café verde foi acondicionado em dessecadores (25°C) e mantido em ambiente com umidades relativas de equilíbrio (URE) de 75; 78, 83, 85%, sendo inoculado com suspensão padronizada de esporos de *A. ochraceus*. Análises dos teores de OTA foram efetuadas com 20, 40 e 60 dias de incubação, considerados após ser alcançada uma situação de equilíbrio na Aa dos grãos de café mantidos nos vários ambientes. Em Aa de 0,75 foram detectados teores de OTA de 34,0, 25,5 e 24,2µg/kg após 20, 40 e 60 dias, respectivamente. Na Aa de 0,78 detectaram-se níveis de 30,2; 34,2 e 16,4µg/kg após 20, 40 e 60 dias de incubação, respectivamente, ao passo que na Aa de 0,83 constatou-se 31,5; 24,0 e 118,3µg/kg, após 20, 40 e 60 dias, respectivamente. Já em Aa de 0,85 foram atingidos valores bastante elevados de OTA, de 214,8, 1.600 e 12.600µg/kg com 20, 40 e 60 dias, respectivamente. Os resultados comprovaram a adequacidade dos grãos de café como substrato para o crescimento e produção de OTA por *A. ochraceus*, bem como a importância da Aa na velocidade de crescimento do fungo e na sua capacidade para produzir a toxina. Com o objetivo de estudar-se a estabilidade térmica da OTA em café torrado e moído, assim como no preparo da bebida, amostras de café Arábica, artificialmente contaminadas com *A. ochraceus* e contendo níveis médios de 160µg/kg de OTA, foram testadas quanto à estabilidade térmica da toxina utilizando-se três diferentes temperaturas e dois tempos de torração, a saber: temperaturas de 200°, 210° e 220°C por 10 e 15 minutos. Foi estudado também o efeito da moagem nos níveis de OTA desses cafés torrados. Selecionou-se amostras torradas à 210°C para preparar bebidas e avaliar o efeito deste procedimento na destruição da OTA. Os resultados revelaram que os níveis de redução de OTA nos processos de torração foram de 22 a 48% na temperatura nominal de 200°C, de 39 a 65% à 210°C e de 88 a 93% à 220°C. A moagem aumentou os níveis aparentes de OTA nos cafés torrados devido, provavelmente, à maior homogeneização dos grãos de café. Em relação ao preparo das bebidas, houve retenção de aproximadamente 94,25% da OTA na borra de café retida no filtro, tendo sido constatado níveis próximos a 3,0

$\mu\text{g}/\text{kg}$  (5,75% da OTA inicial) na bebida preparada. Os resultados demonstraram que as etapas de torração, e de preparo da bebida são capazes de reduzir drasticamente os níveis de OTA inicialmente presentes nos grãos de cafés.

## ABSTRACT

The main objectives of this research were to study the presence and to identify, ochratoxin (OTA) producing fungi in the coffee at different stages of maturation, as well as to quantify the toxin in coffee during terrace drying and in that stored in barns. By direct plating, a high level of fungi contamination (100%) was found in the coffee beans studied, with the genus *Aspergillus* representing 33.2%, of which *A. ochraceus* and *A. niger* represented 10.3 and 22.9% respectively of the strains isolated from the coffee beans. The capacity to produce OTA was determined in 155 strains of *A. ochraceus* and *A. niger* using both agar plug methodology and extraction with chloroform, giving positive results for 88.1% of the *A. ochraceus* strains and 11.5% of the *A. niger* strains. The analysis for OTA in the terrace and barn coffee samples studied, showed that, independent of cultivar, year of harvesting or production region, all the samples analyzed, with the exception of one, showed mycotoxin levels below the limit suggested by the European Common Market (8 $\mu$ g/Kg), thus indicating that the problem is quite restricted and due to severe faults in the harvesting and storage practices. The influence of water activity ( $A_w$ ) on the production of OTA at 25°C by strains of *A. ochraceus* isolated from coffee fruits, was also evaluated. The adsorption isotherm of coffee beans was prepared, determining the relation between water content during storage and the corresponding values for water activity. To verify the adequacy of coffee as a substrate to produce OTA, some experiments were realized, by inoculating a standard suspension of *A. ochraceus* spores in dissecators with saturated water at 25°C during 50 days. The analysis of OTA content were done after 10, 20, 30, 40, 45 and 50 days and the results were 59, 64, 117, 213, 245 and 194 $\mu$ g/kg respectively. In cultures of *A. niger* OTA weren't detected. In a second step and using as reference values of  $A_w$  limiting fungal growth (0.77) and the production of OTA (0.83), green coffee was maintained in dissecators at 25°C with Equilibrium Relative Humidity (ERW) of 75, 78, 83 and 85%, being inoculated with spores of

*A. ochraceus*. OTA levels were measured at 20,40 and 60 days, considered after reaching the equilibrium. At  $A_w=0.75$  the levels of OTA detected were 34.0; 25.5 and 24.2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  after 20,40 and 60 days of incubation, respectively, while at  $A_w=0.83$  the levels of OTA were 31.5; 24.0 and 118.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ , after 20, 40 and 60 days, respectively. At  $A_w=0.85$  the levels of OTA were 214.8, 1.600 and 12.600  $\mu\text{g}/\text{kg}$  with 20, 40 and 60 days, respectively. These results proved that coffee beans are an adequate substrate for growth and OTA production by *A. ochraceus*, showing the influence of  $A_w$  on the velocity of fungi growth and its capacity to produce toxin. In order to study the thermal stability of OTA in roasted and ground coffee samples of coffee *Arábica*, artificially contaminated with OTA levels of 160  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , were tested. Different temperatures and roasting times (200, 210 and 220°C for 10 and 15 minutes) were used. At 200°C the reduction levels were 22% (10 min) and 48% (15 min); at 210°C the reduction were 39% (10 min) and 65% (15 min) and at 220°C it reached levels were 88.5 (10 min) and 93% (15 min). It was observed an apparent increase in OTA levels by grounding the coffee beans probably due a better homogenization. The samples roasted at 210°C were used to prepare beverages being noticed that 94.25% of OTA remained in the ground coffee retained on the filter with only 5.75% of OTA being detected in the final beverage. The results showed that the roasting and beverage preparation steps are able to reduce drastically the OTA levels initially present in coffee beans.

## ÍNDICE GERAL

<b>CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>1</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	6
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>7</b>
1.2. Histórico da Cultura e Produção Agrícola.....	7
1.3. Fatores Que Afetam a Qualidade do Café e da sua Bebida.....	10
1.4. Microbiologia do Café.....	12
1.5. Micotoxina, efeitos tóxicos das ocratoxinas e legislação pertinente .....	13
1.6. Incidência de ocratoxina em café verde e torrado .....	16
1.7. Metodologia para a Determinação de Ocratoxina A em café.....	18
1.8. Fatores que afetam o crescimento fúngico e a produção de OTA.....	19
1.9. Efeito das operações da torração e moagem na estabilidade da OTA.....	21
1.10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	24
<b>CAPÍTULO II - “OCCURRENCE OF OCHRATOXIN A – PRODUCING FUNGI IN RAW BRAZILIAN COFFEE.”.....</b>	<b>34</b>
<b>CAPÍTULO III - “INFLUÊNCIA DA ATIVIDADE DE ÁGUA NA PRODUÇÃO DE OCRATOXINA A POR <i>ASPERGILLUS OCHRACEUS</i> EM CAFÉ VERDE”.....</b>	<b>40</b>
<b>CAPÍTULO IV - “EFEITO DA TORRAÇÃO E PREPARO DA BEBIDA NOS TEORES DE OCRATOXINA A EM CAFÉ.”.....</b>	<b>56</b>
<b>CAPÍTULO V - CONCLUSÕES GERAIS .....</b>	<b>70</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: MAPA DAS REGIÕES PRODUTORAS DE CAFÉ NO BRASIL (ABECAFE, 2001).....	3
FIGURA 2: CULTIVARES CATUAÍ VERMELHO, CATUAÍ AMARELO E MUNDO NOVO. ....	8
FIGURA 3: REGIÕES PRODUTORAS DE CAFÉ E LOCAIS ONDE FORAM COLETADAS AMOSTRAS PARA A PRESENTE PESQUISA.....	10
FIGURA 4: ESTRUTURA QUÍMICA DA OCRATOXINA A ( $C_{20}H_{18}O_6NCl$ ).....	14
FIGURA 5: FIGURA ESQUEMÁTICA INTERNA DO TORRADOR PROBAT-WERKE (CLARKE, 1989).....	22

## ÍNDICE DE TABELAS E QUADROS

TABELA 1: SAFRAS BRASILEIRAS DE CAFÉ NOS ÚLTIMOS ANOS.....	2
TABELA 2: COMPOSIÇÃO MÉDIA DE GRÃOS VERDES (% PESO SECO).....	11
TABELA 3: LIMITES DE CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE TOXINA (OTA) POR <i>A. OCHRACEUS</i> . .....	19
QUADRO 1: PRODUÇÃO BRASILEIRA DE CAFÉ POR ESTADO (EM SACAS X 1000) .....	8
QUADRO 2: CARACTERÍSTICAS TÉRMICAS E HÍDRICAS DOS MESES DE COLHEITA DE ALGUMAS REGIÕES DO ESTADO DE SÃO PAULO .....	9

# Capítulo I - Introdução e Revisão Bibliográfica

## 1 Introdução

O cultivo, comercialização e industrialização do café vem representando, ao longo dos últimos 3 séculos, um dos principais sustentáculos do desenvolvimento sócio-econômico brasileiro. Neste contexto, o país vem ocupando, com relativa constância, a posição de maior produtor mundial, não significando, lamentavelmente, que o excelente desempenho em termos quantitativos seja acompanhado no aspecto qualitativo, pela produção de matéria prima capaz de propiciar infusões de qualidade superior. É um fato reconhecido que a qualidade da bebida é decorrente da somatória de inúmeros fatores, incluindo a espécie ou variedade botânica, condições edafoclimáticas de cultivo, técnica de colheita e secagem dos grãos e as condições tecnológicas de preparo, moagem e torrefação dos grãos (Carvalho et al., 1997).

O café é um dos poucos produtos agrícolas que agrega valor comercial não somente pela especulação do mercado, mas também pela qualidade da bebida produzida. Atualmente, o Brasil é o principal país produtor e exportador de café, seguido por países da África, pela Colômbia e por países da América Central. No entanto, o produto brasileiro sofreu uma queda nas exportações, entre 1961 e 1995, devido à crescente demanda por cafés especiais, produtores de bebida superior, por parte dos países importadores (Abecafé, 2001).

Relatando-se um breve histórico da produção nacional de café, pelas estatísticas disponíveis, a safra de 1998/99 foi considerada "record", quando o Brasil produziu cerca de 35,35 milhões de sacas de café. Já no biênio 99/2000, conforme descrito pelo Ministério da Agricultura e Abastecimento, houve uma queda na produção, ficando esta em torno de 28,9 milhões de sacas. Na safra de 2000/01 a produção foi de aproximadamente 26,6 milhões de sacas, um número

inferior ao dos anos anteriores , conforme demonstrado na Tabela 1. A queda na produção nos últimos anos pode ser explicada pela ocorrência de forte estiagem que atingiu a região cafeeira no centro-sul do país, principalmente os Estados de Minas Gerais, São Paulo e Paraná. Houve um acréscimo significativo na produção apenas nos estados do Espírito Santo e Bahia. Outra forte razão para a quebra da safra é o ciclo bianual de café, em que o esforço requerido para produzir uma safra grande tende a exaurir o cafeeiro, levando a uma produtividade menor na safra seguinte (Abecafé, 2001).

**Tabela 1: Safras Brasileiras de café nos últimos anos.**

<i>Safra</i>	<i>Milhões de sacas (60kg)</i>
1993/1994	25,0
1994/1995	26,0
1995/1996	16,8
1996/1997	27,0
1997/1998	22,3
1998/1999	35,3
1999/2000	28,9
2000/2001	26,6

Fonte: FEBEC/USDA/ABECAFE, 2001

No Figura 1 pode-se verificar a localização das regiões do país onde a produção de café se concentra.

Apesar das ligeiras quedas ocorridas na produção, o café é o segundo principal produto agrícola de exportação do Brasil, participando com cerca de 25 % da produção mundial. A América do Sul representa 40,78% da produção mundial de café, sendo o Brasil o país que apresenta as melhores condições para o cultivo (FOLHA DE SÃO PAULO, 1998).



**Figura 1: Mapa das regiões produtoras de café no Brasil (Abecafé, 2001).**

Reconhecendo-se a importância do café no mercado mundial, torna-se extremamente oportuno e prioritário o estudo de componentes (biológicos ou não) que possam afetar sua qualidade e principalmente sua segurança no aspecto de saúde pública.

Dentro de uma enorme diversidade de fatores, sabe-se que o problema da contaminação microbiana do fruto e a intensidade de sua proliferação nas etapas cruciais de secagem em condições naturais ou artificiais são componentes fundamentais na definição da qualidade final da bebida. Esta contaminação dos grãos é bastante complexa, envolvendo a participação de bactérias, bolores e leveduras, com a predominância de um ou outro grupo, dependendo do estágio do processo e das condições ambientais.

Inúmeras pesquisas, conduzidas no Brasil e no exterior, têm comprovado a participação constante e marcante dos fungos como um dos principais componentes da microbiota presente nos frutos de café imediatamente após a

colheita e durante os vários estágios da secagem. Ao lado do potencial deteriorador dos fungos e conseqüente influência na qualidade da bebida a presença dos mesmos vem sendo relacionada nos últimos anos com o aspecto de saúde pública.

É um fato reconhecido que muitas espécies de fungos, principalmente dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* e outros, são capazes de produzir micotoxinas, metabólitos tóxicos com efeitos mutagênicos, teratogênicos e carcinogênicos. Atualmente, são reconhecidas dezenas de diferentes micotoxinas, sendo as aflatoxinas as primeiras descritas e provavelmente as mais estudadas entre elas. Outra micotoxina que vem sendo bastante pesquisada é a ocratoxina, produzida principalmente por *Aspergillus ochraceus*. Esta micotoxina vem sendo detectada em diferentes matérias primas vegetais, no Brasil e no exterior, havendo restrições crescentes com relação à sua presença nos alimentos. Recentemente, pesquisas conduzidas na Inglaterra e outros países europeus comprovaram a presença da ocratoxina em amostras de café brasileiro, em níveis oscilando de 2 à 7,4 µg/kg (STUDER-ROHR et al, 1995), sendo que a comunidade européia tem recomendado limites máximos de 8 µg/kg para esta toxina no café oferecido à comercialização.

É evidente que a constatação da presença da OTA no café brasileiro reveste-se de extrema importância, podendo apresentar reflexos a curto e médio prazos tanto no aspecto econômico quanto de saúde pública. No contexto atual, em que a globalização da economia é uma realidade, aspectos gerais de qualidade e principalmente higiênico-sanitários são fundamentais na definição da aceitação e da recomendação de quaisquer produtos, especialmente os destinados à alimentação humana.

Com base no contexto e problemática acima expostos, desenvolveu-se a presente pesquisa, visando a obtenção de dados para analisar e quantificar a presença de *A. ochraceus* no fruto de café, o estudo do efeito da umidade na produção de ocratoxina, bem como a contribuição do processamento térmico tecnológico na eventual redução dos teores inicialmente presentes.

**Portanto, este trabalho teve como objetivos:**

- Avaliar a presença e identificar fungos produtores de ocratoxina (OTA) em frutos de café, coletados em diferentes regiões do Estado de São Paulo e Paraná, em diversos estágios de maturação;
- Estudar a produção da micotoxina em grãos de café inoculados experimentalmente e mantidos sob condições controladas de atividade de água (Aa) e temperatura;
- Avaliar a estabilidade da ocratoxina A (OTA) nas diversas etapas do processo de torração dos grãos de café;
- Estudar a estabilidade da micotoxina no preparo da infusão, efetuado em diferentes condições.

O presente trabalho está redigido na forma de capítulos, sendo que o **Capítulo I**, Introdução e Revisão Bibliográfica, seguiram as normas de redação da Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA/UNICAMP/Comissão de Pós-graduação), de 09 de setembro de 1996, e visou o embasamento teórico dos trabalhos desenvolvidos, apresentados nos **capítulos II, III e IV**, na forma de artigos. O **capítulo V** apresenta as conclusões do trabalho.

Os artigos seguintes foram redigidos de acordo com as normas das revistas especializadas para onde foram encaminhados, a saber:

**Capítulo II:** "Occurrence of Ochratoxin A-producing Fungi in Raw Brazilian Coffee", **Journal of Food Protection**, vol.64, n. 8, pages 1226-1230, 2001.

**Capítulo III:** “Influência da Atividade de Água na Produção de Ocratoxina A por *A. ochraceus* em café Verde”. A ser encaminhado para a revista “**Brazilian Journal of Food Technology**”.

**Capítulo IV:** “Efeito da Torração e Preparo da Bebida nos Teores de Ocratoxina A em Café.”

Encaminhado para a revista “**Food Additives and Contaminants**”.

## **1.1. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. ABECAFÉ. **Associação Brasileira do Café.** Disponível em: [www.abecafe.com.br](http://www.abecafe.com.br). Acesso em 09/04/2001
2. CARVALHO, V.D.; CHAGAS, S.J.R.; SOUZA, S.M.C. Fatores que afetam a qualidade do café. **Informe Agropecuário**, 18(187),5-20, 1997.
3. **CONHEÇA MAIS SOBRE O CAFÉ-ORIGENS. CIA IGUAÇU DE CAFÉ SOLÚVEL.** DISPONÍVEL EM <http://www.iguacu.com.br/conhe/ptorigen.htm>. Acesso em 18/03/2000.
4. **FOLHA DE SÃO PAULO**, “Indústria fará campanha para conquistar mais consumidores”. São Paulo, 03/05/1998, FOLHA DINHEIRO.
5. STUDER-ROHR, I.; DIETRICH, D. R.; SCHLATTER, J. & SCHLATTER, C. The occurrence of ochratoxin A in coffee. **Fd. Chem. Toxic.**, 33(5):341-355, 1995.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.2. Histórico da Cultura e Produção Agrícola

A palavra café é um termo geral, referindo-se ao fruto, semente e produtos da planta do gênero *Coffea* L, pertencente à família das Rubiáceas. Descrito pela primeira vez por Linnaeus em 1753, inclui mais de 500 gêneros e cerca de 800 espécies. A origem do café se confunde com lendas e não se conhecem documentos que registrem com clareza sua descoberta e aproveitamento. Acredita-se que seja originário da Etiópia e que tenha se tornado popular como bebida à partir do século XVI, quando foi torrado na Pérsia (Conheça mais sobre o café..., 2001). As principais espécies cultivadas são *Coffea arabica*, *Coffea canephora* v. *Conillon* (Robusta) e *Coffea arabusta*, que é um híbrido das anteriores. No Brasil, 85 a 90% da produção é da espécie arábica enquanto 10 a 15% é da espécie robusta (Carvalho et al.,1997).

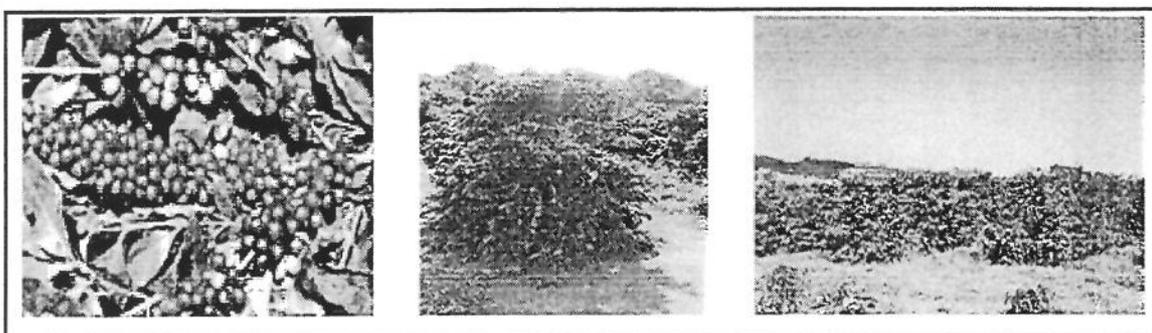
Entre os países produtores da espécie arábica, apenas o Brasil tem o potencial de aumentar sua produção, em até 20% anualmente; além disso, o fim do Imposto sobre Circulação de Mercadorias e Produtos (ICMS), nas exportações brasileiras, também aumentaria a competitividade do café no mercado internacional(Anuário Estatístico, 1997). No Quadro 1 encontram-se os dados referentes à produção brasileira de café no período 1985/1996.

**Quadro 1: Produção Brasileira de Café por Estado (em sacas x 1000)**

Estado/ano	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96
Paraná	5.41	2.01	10.00	2.40	4.60	3.00	3.30	1800	2.10	2.10	250	800
São Paulo	8.92	1.55	12.60	3.50	4.70	5000	4.30	3.50	3.50	3.65	1.30	3.000
Minas Gerais	10.6	4.31	13.20	9.60	9.20	7.30	119.	7.20	10.8	10.6	6.80	15.00
Espírito Santo	5.07	3.64	4.800	5.20	4.50	4.50	5.10	4.40	4.55	3.60	23.0	5.300
Bahia	1.01	783	900	900	1.00	800	700	900	1.10	900	650	1.200
Outros	1.49	1.19	1.400	1.20	1.40	1.30	1.50	1.10	1.95	1.25	1.22	2.200
<b>Total</b>	<b>32.6</b>	<b>13.5</b>	<b>42.90</b>	<b>22.8</b>	<b>25.4</b>	<b>21.9</b>	<b>26.8</b>	<b>18.9</b>	<b>2.40</b>	<b>2240</b>	<b>12.5</b>	<b>27.50</b>

**Fonte: Anuário Estatístico, 1997.**

Alguns cultivares de *C. arabica* são a base da cafeicultura brasileira, como o Catuaí Vermelho e o Catuaí Amarelo. Estes cultivares possuem porte baixo, são rústicos e de alta produtividade. O cultivar Mundo Novo possui porte alto e também é importante para a cafeicultura brasileira. Todos os cultivares citados têm ampla capacidade de adaptação, permitem maior densidade de plantio e produzem muito nos dois primeiros anos de colheita. Quando bem adubados e conduzidos, podem mostrar sensíveis diferenças regionais. Os cultivares Catuaí Vermelho, Amarelo e Mundo Novo produzem sementes de tamanho médio, peneira média em torno de 16 ou 17. Foram os cultivares escolhidos para a realização da primeira fase deste projeto.



**Figura 2: Cultivares Catuaí Vermelho, Catuaí Amarelo e Mundo Novo.**

No Quadro 2 apresentam-se as características térmicas e hídricas dos meses de maturação e colheita de algumas regiões do Estado de São Paulo de onde foram coletadas as amostras de café para realização deste trabalho e na Figura 3 encontra-se o mapa das regiões produtoras de café no Sul e Sudeste do país, incluindo as regiões do norte do Paraná e de São Paulo, de onde foram realizadas coletas de amostras para esta pesquisa.

**Quadro 2: Características térmicas e hídricas dos meses de colheita de algumas regiões do Estado de São Paulo**

Zonas	Alt. (m)	Colheita (meses)	Temp. média (°C)	Def. hídrica	Umidade Relativa	Qualidade bebida
Leste e nordeste (Mogiana)	670 a 1.000	6,7,8	18,7	18 a 30	60,6 a 67,0	Dura p/melhor
Sudoeste	620 a 780	6,7,8	17,4	31 a 6	66,0 a 69,0	Dura p/ riado

Fonte: Ortolani et al., 1997

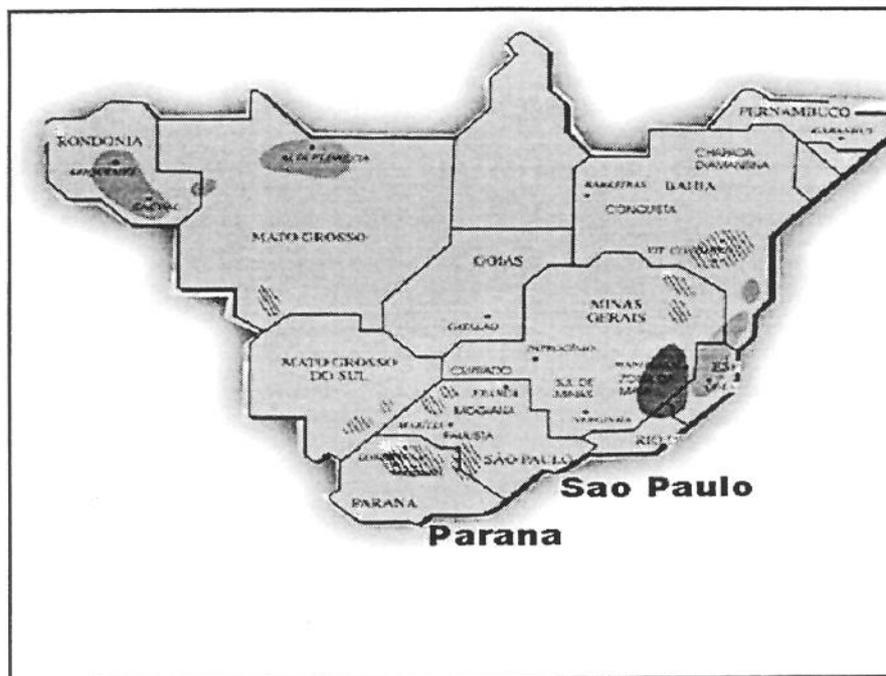


Figura 3: Regiões produtoras de café e locais onde foram coletadas amostras para a presente pesquisa.

### 1.3. Fatores Que Afetam a Qualidade do Café e da sua Bebida.

O café é um produto agrícola cuja qualidade final é resultado da contribuição de vários fatores, tais como, condições climáticas, tipo de colheita, adubação, tratamentos fitossanitários, maturação, cuidados na colheita, secagem, beneficiamento e armazenamento (Vilela, 1997). Além disso, a realização da colheita no ponto ideal, isto é, com uma quantidade máxima de frutos maduros (cerejas) e uma quantidade mínima de frutos verdes é fundamental para melhorar a qualidade (Moricochi, 1998). Os melhores cafés do mundo, como os da Colômbia, Costa Rica e El Salvador, são obtidos mediante colheita manual dos frutos, completamente maduros, os quais são posteriormente submetidos a operação de despulpamento (Rigitano et al., 1967). Sabe-se, também, que a qualidade depende das fases pré e pós colheita, da interação entre fatores que

garantam a expressão final das características de sabor e aroma e ainda dos cuidados nos processos de armazenamento, beneficiamento, torração, moagem e preparo da infusão (Carvalho et al., 1997).

O sabor característico do café deve-se à presença e aos teores de vários constituintes químicos voláteis, destacando-se, entre eles, os ácidos, aldeídos, cetonas, açúcares, proteínas, aminoácidos, ácidos graxos, compostos fenólicos, entre outros. Também a ação de enzimas em alguns destes constituintes irá gerar como produtos de reações, compostos que interferirão no sabor do café (Illy & Viani, 1995). A composição química do grão cru (arábica e robusta) é apresentada na Tabela 2.

A execução adequada do processo de armazenamento, beneficiamento, torração, moagem e preparo da infusão garantem a expressão da qualidade do produto (Carvalho et al., 1997).

**Tabela 2: Composição média de grãos verdes de café nas espécies**

(% peso seco)		
Constituinte	Arábica	Robusta
cafeína	1.2	2.2
trigonelina	1.0	0.7
aminoácidos totais	10.3	10.3
a.a. livres	0.5	0.8
carboidratos	58.9	60.8
ácidos alifáticos	1.7	1.6
ácidos clorogênicos	6.5	10.0
lipídios	16.0	10.0
glicosídeos	0.2	traços
minerais	4.2	4.4
potássio	1.7	1.8

**Fonte: Illy & Viani, 1995**

## 1.4. Microbiologia do Café

A incidência e atividade de microrganismos nas fases pré e pós colheita têm sido considerada como um dos principais fatores que influenciam a qualidade do café, principalmente levando-se em conta o tipo de colheita e preparo comumente adotados no Brasil (Souza & Carvalho, 1997). Os frutos de café estão expostos à uma grande diversidade de fungos e bactérias. Os primeiros trabalhos publicados no Brasil, correlacionando a presença de microrganismos com a qualidade do café, datam de 1936 (Krug, 1940), quando se detectou a presença de micélio do fungo *Fusarium* em uma amostra de grãos classificados como “ardidos”. Ainda com relação à microbiota do café, Leitão (1968), cita vários autores que já pesquisavam a presença de microrganismos na semente do café. Segundo o autor a mesma estava relacionada ao estágio de maturação do fruto, já que o grau de contaminação em frutos secos era maior do que no café cereja (fruto maduro). O mesmo autor cita também, que embora os fatores de natureza biológica não sejam os únicos responsáveis pela qualidade da bebida, é indiscutível que os microrganismos desempenham um papel de destaque na obtenção daquelas de boa qualidade.

Estudos demonstraram que vários bolores, entre eles espécies de *Fusarium*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Aspergillus* e *Gliocladium* incidem sobre os frutos do cafeeiro no terreiro, acelerando o processo de fermentação dos mesmos (Carvalho et al., 1997).

Os principais tipos de injúrias ou danos pré-colheita são devidos à infecção dos frutos, ainda na planta, por microrganismos, ao ataque de insetos no fruto, o que facilita a infecção microbiana e o desenvolvimento de microrganismos do solo, contaminando os grãos derriçados (Carvalho et al., 1997).

Mislivec et al. (1983), estudando a incidência de fungos toxigênicos sobre grãos de café provenientes de 31 países produtores, antes e após a realização de uma desinfecção superficial com NaClO a 5%, observaram ocorrência de fungos variável de 93,4 a 100% em todas as amostras, antes da realização da

desinfecção. Após a sua efetivação, observaram uma diferença nas amostras provenientes de países asiáticos e africanos (80%), em relação às amostras oriundas de países centrais e da América do Sul (49,9%). *Aspergillus* spp. predominou na microbiota de 944 amostras, antes e após a desinfecção. Espécies de *Penicillium* spp. também foram detectadas regularmente, embora em menor intensidade comparativamente as do gênero *Aspergillus*.

Quando se considera os danos causados pelos microrganismos à qualidade do café, pode-se verificar que os esforços no sentido de realizar pesquisas que visem o controle dos mesmos nas fases pré e pós-colheita têm sido pequenos, o que pode ser corroborado pelo histórico dos trabalhos realizados e pela virtual inexistência de medidas adotadas diretamente com este objetivo (Souza & Carvalho, 1997).

### **1.5. Micotoxina, efeitos tóxicos das ocratoxinas e legislação pertinente**

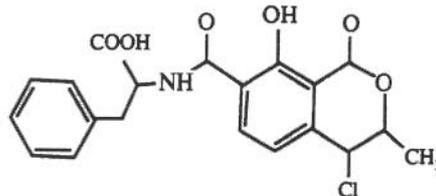
Desde a década de 60, quando iniciou-se a discussão e estudo das micotoxinas, com destaque às aflatoxinas, várias pesquisas foram realizadas, visando a detecção de fungos toxigênicos e suas respectivas toxinas. Até o momento, já foram descritas mais de 400 toxinas diversas, produzidas por cerca de 350 diferentes fungos (Filtenborg et al., 1996).

As micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos filamentosos que podem ocorrer em produtos alimentícios sob determinadas condições de umidade e temperatura e que podem causar sérios danos à saúde humana e de animais (Bullerman et al., 1984; Biancardi & Riberzani, 1996; Stegen et al., 1997). Outra definição, é a que diz que as micotoxinas são metabólitos fúngicos que, quando ingeridos, inalados ou absorvidos através da pele, causam baixa "performance", doenças da pele ou morte em seres humanos e animais,

incluindo pássaros. Tem efeito ao longo do tempo, podem causar câncer, algumas vezes são imunossupressivas e podem ser tóxicas ou teratogênicas.

Entre as micotoxinas, a ocratoxina A (OTA) é produzida por fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, que normalmente contaminam o café e outros cereais (Van der Merwe et al., 1965; Hald, 1988; Micco et al., 1987).

Primeiramente descrita por Shotwell, Hesseltine e Gouden, em 1969, como contaminante de milho, a OTA quimicamente consiste num grupo de sete derivados de isocumarina ligados a uma amida que, por sua vez, está unida a um grupo  $\beta$ -fenilalanina, como mostra a Figura 4 (Pholand et al, 1992).



**Figura 4: Estrutura química da ocratoxina A (C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>O<sub>6</sub>NCI)**

A *ocratoxina A* é um pó branco e cristalino quando seco, com peso molecular de 403,84 e ponto de fusão de 169°C. É pouco solúvel em água (< 1mg/ml) e apresenta solubilidade moderada em clorofórmio e metanol, fluorescendo nas cores verde e azul, quando em soluções ácidas e alcalinas, respectivamente (Van der Merwe et al., 1965; Steyn, 1993; Moss, 1996). É conhecida por suas características carcinogênicas, nefrotóxicas, teratogênicas e imunotóxicas em células animais (Pohland et al., 1992; Steyn, 1993). Sendo um derivado da dihidro-hidroxycumarina, atua como um xenobiótico anti vitamina K, causando síndromes hemorrágicas em animais de laboratório. Os seres humanos são mais sensíveis aos efeitos nefrotóxicos (Pohland et al., 1992; Stormer, 1993). Num estudo conduzido pelo United States Toxicology Program (NTP) em 1989, foi demonstrada a atividade carcinogênica da OTA, sendo considerada a partir de então como um “possível carcinógeno”. Esta pesquisa demonstrou um aumento na incidência de adenomas incomuns e de carcinomas das células tubulares em rins de ratos aos quais a OTA havia sido administrada (Pohland et al., 1992).

Atenção especial tem sido dada a OTA, desde que esta toxina esteve envolvida na etiologia da doença conhecida como “Balkan Endemic Nephropathy” (BEN), uma desordem renal que afetou pessoas de 30 a 50 anos de idade, moradoras de áreas rurais dos Balkans (formada pelos países Bulgária, Romênia e Iugoslávia) e que pode lentamente levar a morte (Plestina, 1992).

Estudos realizados na Suécia e Canadá confirmaram a presença de OTA em soro humano. Isto pode ser atribuído a provável estabilidade da micotoxina no corpo humano (Breitholz et al, 1991; Steyn, 1993).

O efeito tóxico primário da OTA é a inibição da síntese proteica, com inibição competitiva do RNA<sub>t</sub> fenilalanina sintetase, fundamental para os passos de amino acilação na síntese proteica (Kuiper-Goodman & Scott, 1989; Pohland et al., 1992).

A nefropatia suína, estudada na Dinamarca, é um problema para criadores e está associada a frequente exposição à toxina. Em porcos, a ingestão diária durante 3 a 4 meses, de 200µg de OTA/kg de ração foi suficiente para produzir alterações renais nos animais (Plestina, 1996).

Os níveis máximos de OTA são regulamentados ou estão sendo sugeridos em diversos países e variam de 1 a 5 µg/kg para alimentos infantis, 2 a 50 µg/kg para cereais e 5 a 300 µg/kg para rações (van Egmond, 1996). Na União Européia estão sendo sugeridos limites de 4 a 5 µg/kg para café torrado e café verde, respectivamente. Também sugerem um limite geral para cereais de 8 µg/kg.

O “Joint Expert Committee on Food Additives” (JECFA), calculou o nível tolerável provisório de ingestão diária para OTA como 14µg/kg de peso corpóreo/dia (Kuiper-Goodman, 1996; Furlani et al., 1999).

Até recentemente, acreditava-se que a ocratoxina era produzida apenas por *P. verrucosum* e por *A. ochraceus*. No entanto, relatos recentes indicam que esta micotoxina pode ser produzida também por algumas cepas de *A. niger*, *A. carbonarius* e *A. terreus* (Heenan et al., 1998).

## 1.6. Incidência de ocratoxina em café verde e torrado

Em 1974, Levi et al., relataram pela primeira vez, utilizando cromatografia em camada delgada, OTA em grãos de café verde. Das 335 amostras de café verde analisadas com relação à OTA e encontraram 22 amostras com quantidades próximas de 20µg/kg.

Levi (1980), relatou diversos trabalhos confirmando a relação entre a proliferação fúngica em grãos verdes de café e o processo de produção de micotoxinas, destacando a de ocratoxina em particular. O autor concluiu, ainda, que em café coado a incidência de OTA era muito baixa.

Cantáfora et al. (1983), utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), analisaram 40 amostras de café verde e encontraram 9 contaminadas por OTA, em níveis que variaram de 0,5 a 23µg/kg.

Estudos realizados por Micco et al. (1987), levantaram o problema novamente e comprovaram uma alta porcentagem de cafés comerciais contaminados com OTA, em níveis que variaram de 0,2 a 15 µg/Kg. Os autores também constataram, avaliando a porcentagem de destruição da toxina em cafés torrados, constatando a quase completa destruição da mesma em decorrência da torração. Em cafés descascados e torrados, quando a bebida é preparada em máquinas próprias, houve também completa destruição da micotoxina.

Tsubouchi et al. (1988), no Japão, analisaram amostras de café torrado e moído importado de diversas regiões e comercializado na cidade de Nagoya. Cinco amostras, de um total de 68, estavam contaminadas com OTA em níveis que variaram de 3,2 a 17µg/Kg. Foi o primeiro relato da detecção de OTA em café torrado e moído vendido no varejo.

Em 1995, Studer-Rhor et al., analisaram 25 amostras de café verde, das quais 13 estavam contaminadas com OTA (0,9 a 50µg/kg). Os autores também examinaram o café coado, elaborado à partir de 40 amostras de café torrado e

moído, comercializado na Suíça. A OTA foi encontrada em 18 dessas amostras, em níveis que variaram de 0,7 a 7,8 µg/kg de café moído.

Pittet et al. (1996), analisando 101 amostras de café solúvel procedentes de vários países, detectaram OTA em 75% das amostras com níveis de 0,2 a 6,5 µg/kg de OTA. Relataram ainda, que o Ministério da Agricultura do Reino Unido (MAFF-UK) informou, em 1996, que foram analisadas 291 amostras de café verde procedentes de 27 países diferentes e representativas do café em grão que entrava no Reino Unido. Do total de amostras analisadas, 110 amostras estavam contaminadas, sendo que o nível máximo de OTA encontrado foi de 27,3 µg/kg.

Patel et al. (1997), também no Reino Unido, analisaram 80 amostras comerciais de café solúvel e 20 de café torrado e moído. A OTA foi detectada em 64 amostras de café solúvel (0,2 a 8 µg/kg) e 17 de café torrado e moído (0,2 a 2,1 µg/kg).

Stegen et al. (1997) analisando 633 amostras de produtos de café em nove laboratórios diferentes detectaram níveis de 0,2 a 1 µg/kg de ocratoxina A para café solúvel e café torrado. Encontraram 229 amostras contaminadas e o maior nível de OTA encontrado foi de 27,2 µg/kg, em café solúvel.

Nakajima et al. (1997) determinaram OTA e aflatoxina B<sub>1</sub> em 47 amostras de café verde provenientes da Ásia, África e América do Sul. A metodologia utilizada incluía a de limpeza em coluna de imunoafinidade e quantificação em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com detector de fluorescência. A contaminação foi de 30% e os níveis de ocratoxina A variaram de 0,1 a 17,4 µg/kg. Nenhuma amostra proveniente da América do Sul estava contaminada.

Furlani (1998), analisando 84 amostras de café verde proveniente de regiões produtoras brasileiras, detectaram OTA em 18 amostras que continham níveis de 1,7 a 147,5 µg/kg.

Urbano et al. (2001), analisaram cafés verdes, provenientes de terreiros e tulhas de três fazendas brasileiras, durante as safras de 1998 e 1999 e detectaram níveis de OTA entre 0,7 a 17,0 µg/kg.

## **1.7. Metodologia para a Determinação de Ocratoxina A em café.**

Várias metodologias têm sido propostas para a determinação de ocratoxina em café, incluindo desde a cromatografia em camada delgada (CCD), proposta por Levi et al. (1974) até a cromatografia líquida da alta pressão (CLAE), assim como métodos imunoenzimáticos, tipo ELISA (Abramson & Clear, 1996; Biancardi & Riberzani, 1996).

Terada et al. (1986) determinaram OTA por CLAE, utilizando extração com metanol e bicarbonato de sódio, seguida por limpeza em colunas de C<sub>18</sub> obtendo bons resultados.

Tsubouchi et al. (1988), detectaram OTA em café torrado também utilizando CLAE, a exemplo de outros autores, na mesma época, que contribuíram para o aperfeiçoamento da técnica.

Em 1993, a metodologia por CLAE foi consolidada, num estudo colaborativo entre 24 laboratórios europeus, que utilizaram várias fases móveis diferentes e "clean up" (Hald et al., 1993).

Studer-Rohr et al. (1995) utilizaram, para confirmação qualitativa e quantitativa de baixos níveis de ocratoxina, coluna de imunoafinidade antes da aplicação do extrato em CLAE. Em grãos verdes, a ocratoxina foi detectada em 13 das 25 amostras comerciais analisadas, com limite de detecção de 0,5 µg/Kg. Segundo os autores, a coluna de imunoafinidade, aliada a CLAE, é uma ótima metodologia para detecção de baixos níveis desta toxina.

Pittet et al. (1996), estudaram em café verde e torrado, o uso de diferentes colunas de imunoafinidade e tampão fosfato aplicado às colunas, com a eluição das mesmas com metanol. Na análise quantitativa de OTA, o limite de detecção alcançado foi de 0,2 µg/kg.

Também Nakajima et al. (1997), recomendaram e utilizaram colunas de imunoafinidade na determinação de ocratoxina, com a posterior quantificação em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) .

Furlani (1998) testou colunas para extração em fase sólida na detecção de OTA em café, menciona que apenas as colunas de imunoafinidade foram capazes de remover os interferentes existentes nos extratos. O limite de detecção conseguido foi de 0,7 µg/kg.

### 1.8. Fatores que afetam o crescimento fúngico e a produção de OTA

Fatores ambientais como temperatura, atividade de água (Aa) e suas interações são importantes no desenvolvimento de barreiras tecnológicas para prevenção da deterioração fúngica em grãos (Marins et al., 1998; Frank, 1999).

No caso específico de *Aspergillus ochraceus*, produtor de OTA, os limites de temperatura, pH e Aa para o crescimento e produção de toxina encontram-se descritos na Tabela 3.

**Tabela 3: Limites de crescimento e produção de toxina (OTA) por *A. ochraceus*.**

Fatores	Mínimo	ótimo	Máximo
Temperatura de crescimento	8°C	24-31°C	37°C
Temperatura para produção OTA	12°C	31°C	37°C
Limites pH de crescimento	2,2	3-8	13
Aa para crescimento	0,77-0,80	0,95-0,99	>0,99
Aa para produção de OTA	0,83	0,95-0,99	>0,99

**Fonte: ICMSF, 1996**

Vários estudos tem sido feitos para determinar o desenvolvimento de *A. ochraceus* em meios de cultura (Ciegler, 1972; Bullerman et al., 1984; Madhyastha et al., 1993) e em diferentes grãos como cevada (Damaglou et al., 1984), trigo (Madhyastha et al., 1990) e milho (Madhyastha et al., 1990). No entanto, pouca

atenção tem sido dada à influência da temperatura de incubação e da atividade de água no crescimento fúngico e produção de OTA, principalmente utilizando-se o café como substrato.

Bacon et al (1973) isolaram uma cepa de *A. ochraceus* e estudaram o efeito de várias temperaturas e umidades na produção de OTA; os autores constataram que a temperatura ótima para desenvolvimento dos conídios foi de 30°C e a umidade relativa (85%) favoreceu a produção de OTA em meio de cultura.

Northolt et al. (1979) reafirmaram que as condições ambientais influenciavam o crescimento fúngico e a produção de micotoxinas em geral. Os autores confirmaram que fatores como Aa, temperatura, pH e atmosfera podem afetar muito intensamente o crescimento e produção de toxinas e que a manutenção de produtos estocados em baixas temperaturas previne a produção de micotoxinas, sendo que a escolha das medidas de controle dependem do tipo de produto, período de estocagem e técnicas disponíveis.

Beuchat (1983) relatou que os níveis mínimos de Aa para crescimento fúngico são menores que aqueles requeridos para produção de toxinas. Bullerman et al. (1984), afirmaram que a produção de micotoxinas era favorecida por alta umidade e Aa, sendo que, para controlar a formação das mesmas, o conteúdo de umidade deveria ser mantido abaixo do nível crítico para cada produto.

López-Malo et al. (1997) estudaram o efeito de temperaturas de incubação (10-30°C), pH (3,0-7,0) e concentração de vanilina, um antimicrobiano, no crescimento de *A. flavus*, *A. niger*, *A. ochraceus* e *A. parasiticus* em meio de cultura ajustado para Aa 0,98. Os dados demonstraram que os microrganismos estudados eram mesofílicos e que temperaturas de refrigeração podiam controlar o tempo de germinação e a taxa de crescimento fúngico. A vanilina poderia ser usada como um agente antimicrobiano na prevenção de crescimento de fungos, combinada com a Aa reduzida, pH e temperatura de estocagem.

Maríns et al (1998) também compararam o efeito de temperatura, Aa e suas interações na taxa de germinação e crescimento micelial de três linhagens

toxigênicas de *A. ochraceus*, *A. flavus*, *A. niger* e *Penicillium*, em meio de cultura à base de milho. Os autores salientaram a importância do controle de fatores ambientais e suas interações na prevenção de deterioração em produtos agrícolas e alimentos. Ramos et al., (1999), determinaram o efeito da Aa, temperatura, tempo e crescimento de *A. ochraceus* e produção de OTA em meio de cultura à base de cevada. Máximas quantidades de ocratoxina A foram produzidas em Aa>0,98 e após três semanas de incubação à 25-30°C. A concentração de OTA variou de 1,7 a 12,9 ppm, dependendo da Aa e da temperatura de incubação.

Na Tailândia, Bucheli et al. (1998) estudaram café verde estocado em silos por 8 meses sob condições industriais. A redução na umidade e a aeração nos silos de café foram eficientes pois nenhuma OTA foi detectada. Posteriormente, Bucheli et al. (2000) estudando a ocorrência e formação de ocratoxina em cafés cerejas sob secagem, verificaram que a contaminação por ocratoxina dependia do estágio de maturação do fruto; com cerejas verdes a ocorrência é menor e os frutos passa mais susceptíveis. Os defeitos encontrados no café foram a mais importante causa de contaminação por ocratoxina. Os estudos sugeriram que a secagem adequada e procedimentos de escolha dos grãos poderiam efetivamente reduzir a toxina no café verde.

Joosten et al. (2001) analisaram a presença de fungos e de OTA em cafés cerejas antes e após a secagem ao sol em fazendas da Tailândia. Das 14 amostras analisadas, *Aspergillus ochraceus* foi detectado em apenas uma amostra, enquanto *A. carbonarius* foi isolado em 7 amostras.

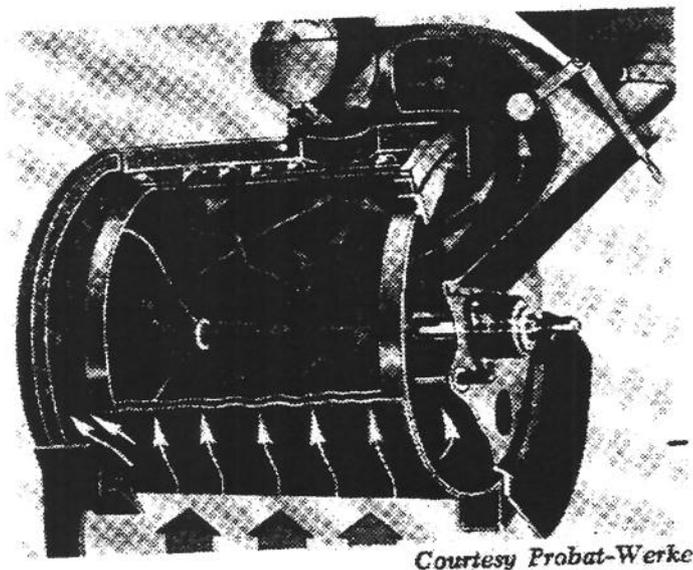
### **1.9. Efeito das operações da torração e moagem na estabilidade da OTA**

Para se obter a bebida característica do café é necessário que os grãos verdes passem por um processo de torração, durante a qual transformações

físicas e químicas serão responsáveis pelo desenvolvimento do sabor e aroma do café torrado.

Durante o processo de torração, o tempo e a temperatura devem ser controlados a fim de evitar que os grãos se queimem. Em média, para torração de café arábica, a temperatura indicada é de 220°C por 10 a 15 minutos (Sivetz & Foote, 1963).

O mecanismo de transferência de calor para o grão pode ocorrer de maneira diferente conforme o tipo de torrador. O torrador constitui-se num cilindro horizontal giratório (Figura 5) contendo o café, que é aquecido por ar quente, por meio de resistência elétrica. A transferência de calor se dá por convecção, em regime laminar, pelo contato do ar com o grão e também por condução. O processo de torração pode ser dividido em 3 etapas: desidratação dos grãos, aumento de volume e reações de pirólise (Clarke, 1989).



**Figura 5:** Figura esquemática interna do torrador Probat-Werke (Clarke, 1989).

A primeira etapa ocorre durante pouco menos da metade do tempo total, numa temperatura entre 100 e 104°C, com o aquecimento dos grãos promovendo

a desidratação. As variações ainda são pequenas, havendo uma diminuição da densidade, uma vez que, com o volume ainda constante, ocorre pequena perda de peso devido a desidrataçãõ. Há um pequeno escurecimento na superfície do grãõ, porém seu interior ainda se mantém claro (Sivetz & Foote, 1963).

Na segunda etapa, a desidrataçãõ continua, havendo também a liberaçãõ de gases (CO<sub>2</sub>) promovendo a expansãõ do grãõ. Com o aumento de volume e perda de peso a densidade diminui ainda mais. O escurecimento superficial indica o início da reaçãõ de caramelizaçãõ (Sivetz & Foote, 1963).

Na terceira etapa, a umidade se mantém constante. Com a umidade fixa, ocorre um sensível incremento nas mudançãõs das característicãõs; o grãõ se torna escuro, a temperatura aumenta devido a reaçãõ pirolítica, que é exotérmica, percebe-se o aroma típico do café e a liberaçãõ da fumaça (Sivetz, 1963).

No término do processo de torraçãõ, é necessário que, na saída do torrador, os grãõs sejam resfriados para que se interrompa a reaçãõ de pirólise, o que normalmente é feito por borrifo de água ou com ar frio (Sivetz, 1963).

O sabor e o aroma característicõs de café sãõ formados pela decomposiçãõ de substâncias durante a pirólise. Um dos requisitos para obtençãõ de uma boa bebida de café é o grau de torraçãõ, que pode ser claro, médio ou escuro. O grau de torraçãõ dependerá do paladar do consumidor. No Brasil, a torraçãõ dos grãõs é do tipo média, a qual acentua o sabor e o aroma e com moagem do tipo fina, permitindo uma maior solubilidade de sólidos, reforçãõdo o sabor do café (Sivetz & Foote, 1963).

Além do grau de torrefaçãõ ideal, os grãõs torrados requerem uma moagem (quebra) para o preparo da bebida (Clarke, 1989). Os graus de moagem a que sãõ submetidos os grãõs de café sãõ definidos como grosso, médio ou fino, de acordo com o tipo de preparo da bebida. A moagem grossa ou média é usada para percoladores caseiros e industriais, enquanto que a moagem fina é usada para filtros e também em máquinas de café expresso (Clarke, 1989).

Como já relatado anteriormente, muitos estudos foram realizados desde 1970 sobre a incidência de OTA em cafés torrados e moídos (Micco et al., 1987; Tsubouchi et al., 1988; Pittet et al., 1996, Patel et al., 1997; Stegen et al., 1997;

Leoni et al., 2000; Prado et al., 2000 e Leoni et al., 2001). Entretanto, estudos sobre a investigação da passagem da OTA durante o preparo da bebida devem ser continuados.

Em 1998, Blanc et al., realizaram experimentos para investigar o comportamento da OTA durante a torração e no processamento de café solúvel. Os autores verificaram que a torração e moagem do café eram responsáveis pela eliminação da OTA, devido a degradação térmica da micotoxina. No processamento de café solúvel também observaram redução de cerca de 80% da OTA presente inicialmente.

Em 2000, Heilmann et al., num programa da Associação Alemã de Café, avaliaram as tecnologias para controle de qualidade, seleção ou tratamento do café verde apropriadas para redução dos níveis de OTA neste produto. As tecnologias usadas na seleção dos grãos pareceram não ser efetivas na descontaminação dos grãos. Apenas a torração, através da destruição térmica ou tratamentos com solventes orgânicos pareceram ser adequados na descontaminação.

Observa-se, portanto, que a maioria das pesquisas mostram o processo de torração como eficiente na redução quase completa da ocratoxina, apesar da existência de dados controvertidos. Assim sendo, pesquisas sobre a estabilidade da ocratoxina no preparo da bebida ainda são particularmente importantes.

## **1.10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO CAFÉ. **Coffee Business**, Belo Horizonte, Ano III, 1997, 107p.
2. ABECAFÉ. Associação Brasileira do Café. Disponível em: [www.abecafe.com.br](http://www.abecafe.com.br). Acesso em 09/04/2001

3. ABRAMSON, D. & CLEAR, R.M. **Journal of Food Protection**, 59(6), 642-644, 1996.
4. ABRAMSON, D. Effects of different cereal and oilseed substrates on the growth and production of toxins by *Aspergillus ochraceus* and *P. verrucosum*. **J. Agric. Food Chem.**, 38:1506-1510, 1990.
5. BACON, C.W.; SWEENEY, J.G.; ROBBINS, J.D. & BWEDICK, D. Production of penicillins acid and ochratoxin A on poultry feed by *Aspergillus ochraceus*: temperature and moisture requirements. **Appl. Microbiol.** 26, 155-160, 1973.
6. BLANC, M.; PITTEI, A.; MUNOZ-BOX, R. & VIANI, R. Behavior of ochratoxin a during green coffee roasting and soluble coffee manufacture. **Journal Agric. Food Chem.**, v.46:673-675, 1998.
7. BEUCHAT, L.R. Influence of water activity on growth, metabolic activities and survival of yeasts and molds. **Journal of Food Protection**, 46(2):135-141, 1983.
8. BIANCARDI, A. & RIBERZANI, A. Determination of ochratoxin A in cereals and feed by SAX-SPE clean up and fluorimetric detection. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, 19(15), 2395-2407, 1996.
9. BREITHOLZ, A.; OLSEN, M. ; DAHLBACH, A. & HULT, K. Plasma ochratoxin A levels in three Swedish populations surveyed using na ion-pair HPLC technique. **Food Additives and Contaminants**, 8(2): 183-192), 1991.

10. BUCHELI, P.; MEYER, I.; PITTET, A.; VUATAZ, G. & VIANI, R. INDUSTRIAL STORAGE OF GREEN ROBUSTA COFFEE UNDER TROPICAL CONDITIONS AND ITS IMPACT ON RAW MATERIAL QUALITY AND OTA CONTENT. **J. AGRIC. FOOD CHEM.** 46: 4507-4511, 1998.
11. BUCHELI, P.; KANCHANOMAI, C.; MEYER, I. & PITTET, A. DEVELOPMENT OF OCHRATOXIN A DURING ROBUSTA (*COFFEA CANEPHORA*) COFFEE CHERRY DRYING. **J. AGRIC. FOOD CHEM.** 48:1358-1362, 2000.
12. BULLERMAN, L.B.; SCHOROEDER, L.L. & PARK, K-Y. Formation and control of mycotoxins in food. **Journal of Food Protection**, 47(8):637-646, 1984.
13. CARVALHO, V.D.; CHAGAS, S.J.R.; SOUZA, S.M.C. Fatores que afetam a qualidade do café. **Informe Agropecuário**, 18(187),5-20, 1997.
14. CANTÁFORA, A. ; GROSS, M.; MIRAGLIA, M. & BENELLBI, L. Determination of ochratoxin in coffee beans using reversed-phase high performance liquid chromatography. **La Revista della Società Italiana di Scienza dell'Alimentazione**, 12 (2), 1983.
15. CLARKE, R.J. **Roasting and Grinding**. In: Coffee, vol.2: Technology. 73-107, 1989.
16. CIEGLER, A. Bioproduction of ochratoxin A and penicillic acid by members of the *Aspergillus ochraceus* group. **Can. Journal Microbiology**, 18:631-639, 1972.
17. **CONHEÇA MAIS SOBRE O CAFÉ-ORIGENS. CIA IGUAÇU DE CAFÉ SOLÚVEL. DISPONÍVEL EM <http://www.iguacu.com.br/conhe/ptorigen.htm>. Acesso em 18/03/2000.**

18. DAMAGLOU, A. P.; DOWNEY, G.A. & SHANNON, W. The production of ochratoxin A and citrinin in barley. **Journal Science Food Agriculture**, 35:395-400, 1984.
19. FILTENBORG, O.; FRISVAD, J.C. & SVENDSEN, A.J. Simple screening method fo molds producing intracellular mycotoxins in pure cultures. **Applied and Environmental Microbiology**, (45):581-585, 1983.
20. FRANK, M. **Mycotoxin Prevention and Decontamination**. Third Joint FAO/WHO/UNEP INTERNATIONAL, Tunis, Tunisia, 3-6 March, 1999.
21. **FOLHA DE SÃO PAULO**, "Indústria fará campanha para conquistar mais consumidores". São Paulo, 03/05/1998, FOLHA DINHEIRO.
22. FURLANI, R.P.Z. Ocratoxina A em café brasileiro. Tese (mestrado em Ciência de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Unicamp, 1998, 61p.
23. FURLANI, R.P.Z. & SOARES, L.M.V. Revisão: Ocratoxina A em café. **Brazilian Journal of Food Technology**, 2 (1, 2);1-6, 1999.
24. HALD, B.; WOOD, G.M.; BOENKES, A. et al. Ochratoxin A in wheat: an intercomparison of procedures. **Food Additives and Contaminants**, 10(2):185-207, 1993.
25. HALD, B. Human exposure to ochratoxin A. In: Natori, S.; Hashimoto, K.; Ueno, Y. Mycotoxins and Phycotoxins'88. **IUPAC Symposium on Mycotoxin and Phycotoxins**. Tokyo, Japan, 16-19 august, 1988.

26. HEENAN, C. N.; SHAW, K. J. & PITT, J. I. Ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* isolates and detection using coconut cream agar. **J. Food Mycology.**, 1(2):67-72, 1998.
27. HEILMANN, W.; REHFELDT, A.G.; ROTZOLL, F. Behaviour and reduction of ochratoxin A in green coffee beans in response to various processing methods. **Eur. Food Res. Technol**, v. 209: 297-300, 2000.
28. ICMSF-INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOOD OF THE INTERNACIONAL UNION OF BIOLOGICAL SOCIETIES-**Microorganisms in Foods 5**, 5<sup>a</sup> edição, London: Editora Blackie Academic & Professional, 1996, cap.19:347-381.
29. ILLY, A. & VIANI, R. **Espresso Coffee: The Chemistry of Quality**, , Academic Press, 1995, 253p.
30. JOOSTEN, H.M.L.J.; GOETZ, J.; PITTET, A.; SCHELLENBERG, M. & BUCHELI, P. Production of ochratoxina A by *A. carbonarius* on coffee cherries. **International Journal of Food Microbiology**, 65(39-44), 2001.
31. KRUG, H.P. Cafés Duros. **Revista do Instituto do Café**. São Paulo, 26 (636-638), 1940.
32. KROGH, P. Role of ochratoxin in disease causation. **Food Chem. Toxicol**, 30, 213-224, 1992.
33. KUIPER-GOODMAN, T. & SCOTT, P.M. Risk assessment of mycotoxin ochratoxin A. **Biomedical and Environmental sciences**, 2 ,179-248, 1989.

34. LEITÃO, M. F. de F. Atividade de água e alterações microbiológicas dos alimentos. Curso no Itai, Campinas, 1968.
35. LEVI, P. C. Mycotoxins in Coffee. **Journal Assoc. Off. Anal. Chem.**, 63(6):1282-1285, 1980.
36. LEVI, P.C.; TRENK, H.L. & MOHR, H.K. Study of the occurrence of ochratoxin A in green coffee beans. **Journal of the AOAC**. 57(4):866-870, 1974.
37. LEONI, L. A. B.; SOARES, L. M. V. & OLIVEIRA, P.L.C. Ochratoxin A in brazilian roasted and instant coffees. **Food Addit. and Contaminantes**, V. 17, 867-870, 2000.
38. LEONI, L.A. B.; FURLANI, R.P.Z.; SOARES, L.M.V. & OLIVEIRA, P.L. Ochratoxin A in Brazilian green coffee. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 21(1):105-107, 2001.
39. LÓPEZ-MALO, A. ; ALZAMORA, S.M. & ARGAIZ, A. Effect of vanillin concentration, pH and incubation temperature on *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus parasiticus* growth. **Food Microbiology**, 14:117-124, 1997.
40. MADHYATSHA, S.M.; MARQUADT, R.R.; FROHLIC, A.A. & PLATFORD, G. Effects of different cereal and oilseed substrates on the growth and production of toxins by *Aspergillus ochraceus* and *P. verrucosum*. **J. Agric. Food Chem.**, 38:1506-1510, 1990.
41. MADHYATSHA, S.M.; MARQUADT, R. R. & ABRAMSON, D. Effect of ochratoxin producing fungi on the chemical composition of wheat and barley. **Journal Food Quality**, 16:287-299, 1993.

42. MANTLE, P. & CHOW, A.M. Ochratoxin formation in *A. ochraceus* with particular reference to spoilage of coffee. **International Journal of Food Microbiology**, 56 (105-109), 2000.
43. MARÍNS, S; SANCHIS, V.;SÁENZ, R.; RAMOS, A.J.; VINAS, I. & MAGAN, N. Ecological determinants for germination and growth of some *Aspergillus* and *Penicillium* spp. from maize grain. **Journal of Applied Microbiology**, 84:25-36, 1998
44. MISLIVEC, P.B.; VERNEAL, R.B. & GIBSON, R. Incidence of toxigenic and other molds in green coffee beans. **Journal of Food Protection**, 46(11):969-973, 1983.
45. MICCO, C.; GROSSI, M.; MIRAGLIA, M. & BRERA, C. **ASIC, 12 Colóquio**, p.392-396, 1987.
46. MORICOCHI, L. Café. **Prognóstico Agrícola**. Instituto de Economia Agrícola. Secretaria do Abastecimento de São Paulo, 2:174-177, 1998.
47. MOSS, O.M. Mode of formation of ochratoxin A. **Food Additives and Contaminants**, Suplemento 13, 5-9, 1996.
48. NAKAJIMA, M.; TSUBOUCHI, H.; MIYABE, M & UENO, Y. Survey of aflatoxin B<sub>1</sub> and ochratoxin A in commercial green coffee beans by high-performance liquid chromatography linked with immunoaffinity chromatography. **Food and Agricultural Immunology**, v.9:77-83, 1997.
49. NORTHOLT, M.D.; VAN EGMOND, H.P.; PAULSCH, W.E. Ochratoxin A production by some fungal species in relation to water activity and temperature. **Journal of Food Protection**, 42:485-490, 1982.

50. ORTOLANI, A.A.; CAMARGO, A.P.; OLIVEIRA, J.B. et al. Regiões Prioritárias para Reorganização da Cafeicultura Paulista. "s.d."
51. PATEL, S.; HAZEL, C.M.; WINTERTON, A.G. & GLEADLE, A.E. **Food Additives and Contaminants**, 14(3):217-222, 1997.
52. PLESTINA, R. Some features of Balkan Endemic Nephropathy. **Food Chem. Toxicol.**, 30:177-181, 1992.
53. PLESTINA, R. Nephrotoxicity of *A. ochraceus*. **Food Additives and Contaminants**, v.13, Suplemento, 49-50, 1996.
54. PHOLAND, A. E. Ochratoxin A: a review. **Pure and Applied Chemistry**, 67:1029-1046, 1992.
55. PITTET, A.; TORNARE, D.; HUGGETT, A. & VIANI, R. Liquid chromatographic determination of ochratoxin A in pure and adulterated soluble coffee using an immunoaffinity column cleanup procedure. **Journal Agricultural Food Chemistry**, 44(11):3564-3569, 1996.
56. PRADO, G.; OLIVEIRA, M.S. & ABRANTES, F.M. Incidência de ocratoxina A em café torrado e moído e em café solúvel consumido na cidade de Belo Horizonte, M.G. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 20(2):192-196, 2000.
57. RAMOS, A.J.; MUÑOZ, J.; MÁRIN, S.; SANCHIS, V.; MAGAN, N. Calorific losses in maize in relation to colonisation by isolates of *Aspergillus ochraceus* under different environmental conditions. **Journal of Cereal Science**, 29:177-183, 1999.

58. RIGITANO, A.; GARRUTI, R.S.; JORGE, J. P. N. influência do tempo decorrido entre a colheita e o despulpamento de café cereja sobre a qualidade da bebida. **Bragantia**, Campinas. 26:31-37, 1967.
59. SHOTWELL, O.L.; HESSELTINE, C. W. & GOULDEN, M. L. Ochratoxin A occurrence as natural contaminant of corn sample. **Appl. Microbiol.**, 17 756-766, 1969.
60. STEYN, P.S. Ochratoxin A: its chemistry, confirmation and biosynthesis. **Human Ochratoxicosis and its Pathologies**, 231:51-58, 1993.
61. STUDER-ROHR, I.; DIETRICH, D. R.; SCHLATTER, J. & SCHLATTER, C. The occurrence of ochratoxin A in coffee. **Fd. Chem. Toxic.**, 33(5):341-355, 1995.
62. SIVETZ, M. & FOOTE, H. E. **Coffee Processing Technology**, vol.1, AVI Publishing Company, 598p, 1963.
63. SOUZA, S.M.C. & CARVALHO, V.L. Efeito de microorganismos na qualidade da bebida do café. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, 18(187):21-26, 1997.
64. STEGEN, G.V.D., U. JORISSEN, A. PITTET, M. SACCON, W. STEINER, et al. Screening of european coffee final products for occurrence of chratoxin A (OTA). **Food Add. Contam.** 14,211-216, 1997.
65. TSUBOUCHI, H.; TERADA, H.; YAMAMOTO, K. et al. Ochratoxin A found in commercial roast coffee. **J. Agric. Food Chem.**, 36(3):540-542, 1988.
66. STORMER, F.C. Ochratoxin A-A mycotoxin of concern. In: **Handbook of Applied Mycotoxins in Ecological Systems**, vol 5, 443p, 1993.

67. STUDER-ROHR, I., DIETRICH, D. R., SCHLATTER, J. & SCHLATTER, C.  
The occurrence of ochratoxin A in coffee. **Food. Chem. Toxic.** 33,341-355, 1995.
68. TERADA, H.; TSUBOUCHI, H.; YAMAMOTO, K.; HISADA, K. G. & SAKABE, Y.  
Liquid chromatographic determination of ochratoxin A in coffee beans and coffee products. **J.AOAC.** 69 (6): 960-964, 1986.
69. TSUBOUCHI, H., H. TERADA, K. YAMAMOTO, K. HISADA, & Y. SAKABE.  
Ochratoxin A found in commercial roast coffee. **J. Agric. Food Chem.** 36,540-542, 1988.
70. URBANO, G. R. ; TANIWAKI, M.H.; LEITÃO, M.F.F. & VICENTINI, M.C.  
Occurrence of ochratoxin A-producing fungi in raw brazilian coffee. **Journal of Food Protection**, 64(8):1226-1230, 2001.
71. VARGA, J.; KEVEI.; RINYU, E.; TÉREN, J. & KOZAKIEWICZ, Z. Ochratoxin Production by *Aspergillus* Species. **Applied and Environmental Microbiology**, 62(12):4461-4464, 1996
72. VILELA, E. R. Secagem e qualidade do café. EPAMIG. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte. 18(187): 55-63, 1997.
73. Van EGMOND, H. P. Analytical methodology and regulations for ochratoxin A. **Food Addit. Contamin.** 18 (suppl.):11-13, 1996.
74. Van der MERWE, K.J.P.; STEYN, P. S. & FOURIE, L. Mycotoxins, part II-The constitution of ochratoxin A, B, C, metabolites of *Aspergillus ochraceus* Wilh. **Nature**, 205:1112-1113, 1965.

## **CAPÍTULO II - “Occurrence of Ochratoxin A – Producing Fungi in Raw Brazilian Coffee.”**

Artigo publicado na revista: “**Journal of Food Protection**”, V. 64, N. 8, 1226-1230, 2001.

## Occurrence of Ochratoxin A–Producing Fungi in Raw Brazilian Coffee

G. R. URBANO,<sup>1</sup> M. H. TANIWAKI,<sup>2\*</sup> M. F. de F. LEITÃO,<sup>1</sup> AND M. C. VICENTINI<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Food Technology, State University of Campinas, Campinas S.P., Brazil; and <sup>2</sup>Institute of Food Technology, P.O. Box 139, Campinas S.P., Brazil 13073-001

MS 00-252: Received 24 July 2000/Accepted 8 November 2000

### ABSTRACT

Ochratoxin A (OA)–producing fungi were identified in coffee at different stages of maturation. The toxin was quantified in coffee during terrace drying and in coffee stored in barns. By direct plating, a high level of contamination (100%) was found in the coffee beans studied, with the genus *Aspergillus* representing 33.2%, of which *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus niger* represented 10.3 and 22.9%, respectively, of the strains isolated from the coffee beans. The capacity to produce ochratoxin was determined in 155 strains of *A. ochraceus* and *A. niger* using both the agar plug method and extraction with chloroform, giving positive results for 88.1% of the *A. ochraceus* strains and 11.5% of the *A. niger* strains. Analysis for OA in the terrace and barn coffee samples showed that, independent of cultivar, year harvested, or production region, all except one of the samples analyzed showed mycotoxin levels below the limit suggested by the European Common Market (8 µg/kg), thus indicating that the problem is restricted and due to severe faults in harvesting and storage practices.

Ochratoxin A (OA) is a mycotoxin produced by fungi of the genera *Aspergillus* and *Penicillium*, which contaminate coffee and other cereals (8, 10). This mycotoxin is known for its carcinogenic, nephrotoxic, and immunotoxic characteristics in animal cells. It has been detected in a great variety of agricultural products in various geographical regions of the world and was originally isolated as a metabolite of *Aspergillus ochraceus*, but other species have since been identified as OA producers, such as *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus alliaceus*, *Aspergillus melleus*, and *Aspergillus niger*. The production of OA by *A. niger* was first reported by Abarca et al (1). In 1998, Heenan et al. (6) examined 33 strains of *A. carbonarius* and 115 strains of *A. niger* in Australia that were isolated from a mixture of dried vine fruits. Using coconut agar, which fluoresces under UV light in the presence of the toxin, they showed that 91% of the *A. carbonarius* and only 2% of the *A. niger* isolates were OA producers. Recently, Taniwaki et al. (19) investigated the presence of OA-producing fungi in several coffee samples from different farms in Brazil. It was concluded that there are two or at most three species involved in the production of OA in coffee: *A. ochraceus*, *A. carbonarius*, and, rarely, *A. niger*. Of the *Penicillium* species, *Penicillium verrucosum* was the major producer of OA in temperate climates. In hot and tropical climates, the *Aspergillus* species have been the most related to the production of OA (19).

The presence of microorganisms in coffee beans has been reported since 1936, and of the fungi, the genera *Fusarium*, *Penicillium*, and *Aspergillus* have been the most frequently detected at the different stages from harvest to storage (9, 10).

Mislivec et al. (10), studying the incidence of toxigenic and nontoxigenic fungi in coffee beans from 31 producer countries, found 93.4 to 100% infected beans from most countries evaluated. *Aspergillus* species predominated in both the internal and external microbial flora of the 944 samples, including various potentially toxigenic species, such as *A. ochraceus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus versicolor*, *A. niger*, *Aspergillus tamarii*, *Aspergillus wentii*, and species of the *Aspergillus glaucus* group. The genus *Penicillium*, including the toxigenic *Penicillium cyclopium*, *Penicillium citrinum*, and *Penicillium expansum*, was regularly detected, but with a much lower frequency.

The first reports of OA in raw coffee beans date from 1974 (8), followed by various other studies. In 1989, Micco et al (9) showed that a high percentage of commercial coffees were contaminated with OA at levels from 0.2 to 15 µg/kg. At the same time, Tsubouchi et al. (20) found OA in ground roasted coffee samples at levels of 3.2 to 17 µg/kg. Since 1995, frequent reports have appeared on the occurrence of OA in raw and roasted coffee samples (12, 13, 15–17), all detecting OA levels above those permitted.

Based on these considerations, the objectives of this research were to identify OA-producing fungi in coffee fruits at different stages of development and also to evaluate the presence of the mycotoxin in the beans during terrace drying and storage in barns.

### MATERIALS AND METHODS

**Sampling.** The study was carried out analyzing coffee samples (*Coffea arabica*) of the Catuai Vermelho (red), Amarelo (yellow), and Mundo Novo cultivars during the 1998 and 1999 harvests. The fruits were collected at different stages of maturation and processing: ripe fruits (cherries) collected directly from the shrubs, overripe fruits from bush and ground, fruits being dried on the terraces, and

\* Author for correspondence. Tel: + 55 19 241-5222 R. 210; Fax: + 55 19 242-4585; E-mail: gross@fea.unicamp.br or mtaniwak@itai.org.br.

TABLE 1. Total yeast and mold count (CFU/g) in coffee beans collected at different stages of maturation and processing during the 1998 and 1999 harvests<sup>a</sup>

Stages of maturation or processing	1998 Harvest		1999 Harvest	
	Range	Mean	Range	Mean
Cherry	$1.4 \times 10^5$ to $4.8 \times 10^6$	$2.4 \times 10^6$	$0.2 \times 10^5$ to $0.1 \times 10^6$	$0.6 \times 10^5$
Overripe	$1.2 \times 10^7$ to $1.7 \times 10^8$	$9.1 \times 10^7$	$0.2 \times 10^5$ to $1.3 \times 10^7$	$6.5 \times 10^6$
Overripe (from the ground)	$0.1 \times 10^7$ to $8.0 \times 10^7$	$4.0 \times 10^7$	$1.0 \times 10^5$ to $1.0 \times 10^7$	$5.0 \times 10^6$
Terrace	$6.8 \times 10^5$ to $8.7 \times 10^8$	$4.3 \times 10^8$	$0.1 \times 10^5$ to $5.2 \times 10^6$	$2.6 \times 10^6$
Barn	$6.2 \times 10^5$ to $1.7 \times 10^9$	$8.5 \times 10^8$	$0.1 \times 10^5$ to $1.87 \times 10^6$	$9.4 \times 10^5$

<sup>a</sup> The mean results refer to two samplings in three different coffee-producing regions.

coffee stored in barns. Sampling was carried out during maturation of the coffee and harvesting. Five samples of 500 g from each stage were taken and 25 samples from each farm were analyzed. The samples were kept inside an icebox during sampling and transport from the farm to the laboratory. The period from sampling to microbiological analysis did not exceed 12 h.

Three different producing regions were selected characterized by the beverage quality produced and the climatic conditions during harvesting: North of Paraná State (low-quality beverage, cold rainy region), Northwest of São Paulo State (good-quality beverage, hot dry region), and North of São Paulo State (average-quality beverage, temperate region, not too dry).

**Total yeast and mold count.** From the fruit samples collected aseptically at the various stages of maturation and processing, 25-g portions were separated and placed in sterile plastic bags and 225 ml of 0.1% peptone water was added. The sample was then homogenized for 2 min in a Seward stomacher (model EQ MB 049-UK) followed by plating on dichloran 18% glycerol agar DG18 (Oxoid-UK, Basingstoke, Hampshire) (13) and incubation at 25°C for 5 to 7 days (14). The results were expressed in CFU/g.

**Direct plating.** The fruits, at different stages of maturation and processing, were externally disinfected by immersion in a 0.4% sodium hypochlorite solution for 1 min. The fruits were then opened aseptically and 10 beans (seeds) transferred to each of 5 petri dishes containing dichloran 18% glycerol agar DG18 (Oxoid-UK) and incubated at 25°C for 5 to 7 days, the results being expressed as percentage of internally infecting beans (14). These assays were repeated using the same procedure at two distinct points in both years of harvest (1998 and 1999). Thus, for each stage of maturation or process, a total of 200 beans were analyzed.

**Identification of fungi.** The strains of the genus *Aspergillus* were isolated in malt extract agar and identified according to the identification key for *Aspergillus* (7).

**Test for OA production by the isolated fungi.** The strains of *A. ochraceus* and *A. niger*, potential producers of OA, were grown on yeast extract 15% sucrose agar at 25°C for 7 days and evaluated for the production of OA by the agar plug method (4). At the same time, the whole medium and colony were extracted with 50 ml of chloroform in a stomacher for 3 min (18). The extract was filtered and concentrated in a water bath at 60°C near to dryness and then dried under a N<sub>2</sub> stream. The toxin was resuspended in chloroform and analyzed by thin layer chromatography plates and observed under UV light at 365 nm, comparing qualitatively with OA standard (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.).

**Method for the analysis of OA in coffees during terrace drying and barn storage.** The coffees from both the terraces and

barns were dried in the sun for 2 days and then hulled and ground in a knife mill using mesh 3.2. This produced an ideal granule size for the analytical method used in the detection of OA (12), using an immunoaffinity column (11, 15).

From each sample, with an average weight of 1.5 kg, three subsamples of 25 g were separated and analyzed for the presence of OA. OA was extracted with a solution of methanol and 3% sodium bicarbonate (50:50). The extract was filtered and diluted with phosphate-buffered saline and applied to an immunoaffinity column (VICAM, Watertown, Mass.) containing the monoclonal antibody specific for OA. The phosphate-buffered saline water solution consisted of the following salts: 0.002 M KCl, 0.13 M NaCl, 0.007 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, and 0.001 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. After washing, the OA was eluted with high-performance liquid chromatography (HPLC) grade methanol and quantified by reverse-phase HPLC using a fluorescence detector. The detection limit of this method was 0.2 µg/kg. The mobile phase used was 4 mM sodium acetate/acetic acid (19:1) in acetonitrile. The equipment used was a Waters HPLC 717 with autosampler (Waters, Milford, Mass.) under the following conditions: 5 µm by 250 by 4.6 mm ODS Spherisorb column, 5 µm by 25 by 4.6 mm ODS Hypersil precolumn, mobile phase of 420 ml of acetonitrile and 580 ml sodium acetate at a flow rate of 1 ml/min. and an injection volume of 50 µl. A fluorescence detector was used with an excitation of 330 nm and emission of 470 nm.

**Moisture (dry weight) and water activity determinations.** During the 1999 harvest, the moisture content was determined in a vacuum oven at 70°C and the water activity (a<sub>w</sub>) using an Aqualab equipment, model CX2 (Decagon, Pullman, Wash.), by the dew point method (2).

## RESULTS

Table 1 shows the yeast and mold counts in the beans collected at different stages of maturation and process during the 1998 and 1999 harvests.

A high level of contamination by yeasts and molds was observed in all stages of maturation in the two harvests, reaching maximum values of  $4.3 \times 10^8$  CFU/g in samples from the terrace and  $8.5 \times 10^8$  CFU/g in coffee stored in barns (Table 1). It was evident that manipulated beans and those in contact with the ground (terrace and barn) had higher total counts than mature fruits and overripe fruits on the bush (cherry and overripe).

Table 2 presents the incidence of *A. ochraceus* and *A. niger* isolated from beans at different stages of maturity during the 1998 and 1999 harvests.

It was shown that 100% of the beans analyzed by direct

TABLE 2. Incidence of *A. ochraceus* and *A. niger* in coffee beans collected from different regions in different stages of maturity or processing during the 1998 and 1999 harvests

Isolations

Sampling region	Cultivar	Maturation stage or processing	<i>A. ochraceus</i>			<i>A. niger</i>			% <sup>b</sup>	No. <sup>a</sup>	% <sup>b</sup>
			1998	1999	No. <sup>a</sup>	1998	1999	No. <sup>a</sup>			
North of Paraná	Cattuaí (red)	Cherry	2	4	6	3	17	20	3.0	10.0	
		Overripe/bush	1	— <sup>c</sup>	1	—	18	18	0.5	9.0	
		Overripe/ground	—	—	—	—	—	—	—	—	
		Terrace	7	24	31	1	12	13	15.5	6.5	
		Barn	15	13	28	7	105	112	14.0	56.0	
Northwest of São Paulo	Cattuaí (yellow)	Cherry	—	14	14	2	3	5	7.0	2.5	
		Overripe/bush	—	—	—	1	—	1	—	0.5	
		Overripe/ground	1	—	1	6	35	41	0.5	20.5	
		Terrace	4	21	25	38	7	45	12.5	22.5	
		Barn	4	27	31	38	6	44	15.5	22.0	
North of São Paulo	Mundo Novo	Cherry	4	1	5	1	15	16	2.5	8.0	
		Overripe/bush	—	—	—	—	—	—	—	—	
		Overripe/ground	5	2	7	—	4	4	3.5	2.0	
		Terrace	1	—	1	7	5	12	0.5	6.0	
		Barn	4	1	5	7	6	13	2.5	6.5	
Total				48	107	155	111	233	344	10.3	22.9

<sup>a</sup> Total number of isolates in 200 beans analyzed.

<sup>b</sup> Percentage of total number in 200 beans analyzed.

<sup>c</sup> No strains were isolated.

TABLE 3. Levels of OA ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) in the coffee samples from the terraces and barns during the 1998 and 1999 harvests<sup>a</sup>

Sampling region	Sample origin			
	Terraces		Barns	
	1998	1999	1998	1999
North of Paraná	0.2 <sup>b</sup>	17.0	0.7	13.0
Northwest of São Paulo	0.2	1.9	ND <sup>c</sup>	0.2
North of São Paulo	ND	1.3	ND	4.5

<sup>a</sup> The results are means of duplicates in each harvesting period.

<sup>b</sup> Detection limit of the method was 0.2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

<sup>c</sup> Not detected by the method.

plating were contaminated with fungi, including *Penicillium*, *Cladosporium*, *Fusarium*, and *Rhizopus* spp. and yeasts, along with the genus *Aspergillus* spp.

These isolations represented the internal contamination of the coffee fruits, much more pronounced in the samples collected from the terrace and barns than that from the mature fruits on the bush. It is probable that intense handling, damage to the external surface, and contact with the soil favor infection of the fruits and fungal penetration into the interior.

The values presented in Table 2 represent the sum of the strains of *A. ochraceus* and *A. niger* isolated in the two samplings each year in each producing region, corresponding to the analysis of 200 beans in each stage of maturity or processing.

Of the 155 strains of *A. ochraceus* detected in 1998 and 1999, 42 were tested for their capacity to produce OA, and of these, 37 (88.1%) were positive. Of the 344 strains of *A. niger* isolated, 87 were tested for the production of OA, only 10 (11.5%) giving positive results.

No strains of *A. carbonarius* were isolated in this study, and all the strains of *A. niger* were confirmed as such by an analysis of their macro and microscopic characteristics, such as size of conidia (between 3 and 6  $\mu\text{m}$ ) and cultivation in differentiated culture media (7).

Table 3 shows the levels of OA ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) detected in the coffee samples from the terraces and barns during the 1998 and 1999 harvests.

The data shown in Table 3 show the levels of OA in coffee from barns and terraces collected in 1998 and 1999. Except for the samples from North of Paraná in 1999, most of samples had levels of OA below the limit suggested by the European Common Market for the exportation of raw coffee, which is 8  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

Figure 1 presents the results of the moisture and  $a_w$  determinations in the coffee beans collected from terraces and barns during the 1999 harvest.

Good storage practices for coffee recommend moisture values of up to 13% for coffee in barns, preferably nearer 11%. As can be seen in Figure 1, all the moisture values were below the suggested limits, despite potentially toxigenic fungi having been isolated, principally from samples stored in barns or being dried on terraces. The high values

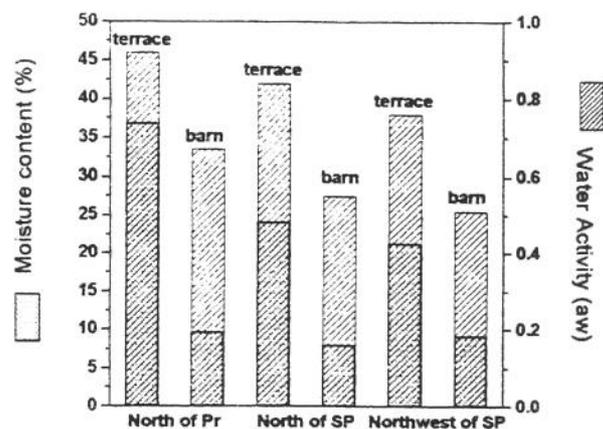


FIGURE 1. Values for moisture and  $a_w$  in coffees from terraces and barns during the 1999 harvest.

found in the terrace samples from the North of Paraná stand out, with moisture values of 36.8% and an  $a_w$  of 0.92, coinciding with the detection of high levels of OA, as shown in Table 3.

## DISCUSSION

Toxigenic fungi are widely distributed in nature, but factors such as the nature of the substrate, the ideal temperature,  $a_w$ , and relative humidity are important with respect to their capacity to produce toxins (3, 5, 10, 13, 15, 18). The presence of OA in beans is normally a result of badly controlled harvesting procedures, precarious drying of the beans, and inadequate storage conditions, allowing for the proliferation of toxigenic fungi.

The results of this study show a high incidence of fungi in raw coffee beans collected in the different producing regions of Brazil, independent of the region and cultivar. It also showed that 100% of the fruits were internally contaminated with fungi and that most toxigenic strains of *A. ochraceus* and *A. niger*, producers of OA, were isolated from the samples coming from the terraces and barns. This suggests that better processing and storage practices should be used at these stages of the process.

In 1999, Frank (5), evaluating the production chain for coffee in six different countries, detected the presence of *A. ochraceus* in the beans, but not all of the samples had detectable levels of OA. These data are important in the distinction between the presence of the toxin and the conditions necessary for its production. *A. ochraceus* was frequently isolated from coffee during the drying phase, but, on the other hand, the isolation of xerophilic species was not common in the ripe fruit (cherry), where nonxerophilic yeasts and molds were more common. These reports agree with the results obtained in this study, that is, that infection by *A. ochraceus* and *A. niger* do not necessarily indicate high OA contamination. No study of the biochemical or genetic differentiation of the different strains of *A. ochraceus* was carried out, but clear differences in the capacities of the various strains tested to produce OA were observed. In the study reported herein, there was considerable increase in OA levels detected in 1999, especially in the North of Paraná. This coincided with a rainy period during

sampling, which could have influenced the greater infection and development of the fungi and consequently the higher levels of OA detected. In addition to the occurrence of *A. ochraceus*, the presence of strains of *A. niger* (22.9%) was also noted in the coffees analyzed, but with only a small percentage (11.5%) being positive for OA production. The production of OA by *A. niger* was first reported by Abarca et al. (1) in animal feeds in Spain. These data, together with those of Heenan et al. (6) and those verified in this research, confirm *A. niger* as being a producer of OA. This fact is extremely important from the public health point of view, since *A. niger* is widely distributed in the environment, being found in diverse substrates such as grains, hay, fruits, and vegetables. *A. carbonarius*, also a potential OA producer (6), was reported for the first time, together with ochratoxigenic *A. niger* in coffee in samples from terraces and barns from a farm in the west of the State of São Paulo, Brazil (19). However, in this study, no strains of *A. carbonarius* were isolated.

In general, the data obtained in this study agree with those of other recent research papers (1, 5, 12, 13, 16, 19, 20) in relating the occurrence of potentially toxigenic strains of *A. ochraceus* and *A. niger* in raw coffee beans. Generally, the levels of OA detected were well below the limits considered as being of major significance from the public health aspect. Nevertheless, good practice procedures must be used in the harvesting and storage of coffee to minimize the problem, emphasizing principally the need for rapid drying after harvesting and adequate storage of the beans in the barns.

#### ACKNOWLEDGMENT

This work was financially supported by FAPESP—Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Proc. 98/03876-2 and Proc. 98/15381-8).

#### REFERENCES

- Abarca, M. L., M. R. Bragulat, G. Castellá, and F. J. Cabañes. 1994. Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:2650–2652.
- AOAC International. 1995. Official methods of analysis of AOAC International, 16th ed., vol. 1. Moisture. AOAC International, Gaithersburg, Md.
- Bucheli, P., I. Meyer, A. Pittet, G. Vuataz, and R. Viani. 1998. Industrial storage of green coffee robusta under tropical conditions and its impact on raw material quality and ochratoxin A content. *J. Agric. Food Chem.* 46:4507–4511.
- Filttenborg, O., J. C. Frisvad, and J. A. Svendsen. 1983. Simple screening method for molds producing intracellular mycotoxins in pure cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 45:581–585.
- Frank, M. 1999. Mycotoxin prevention and decontamination. In Third Joint FAO/WHO/UNEP International Conference Proceedings, Tunisia, 3–6 March. FAO/WHO/UNEP, Tunis.
- Heenan, C. N., K. J. Shaw, and J. I. Pitt. 1998. Ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* isolates and detection using coconut cream agar. *J. Food Mycol.* 1:67–72.
- Klich, M. A., and J. I. Pitt. 1988. A laboratory guide to common *Aspergillus* species and their teleomorphs. CSIRO Division of Food Science and Technology, North Ryde, New South Wales.
- Levi, C. P., H. L. Trenk, and H. K. Mohr. 1974. Study of the occurrence of ochratoxin A in green coffee beans. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 57:866–870.
- Micco, C., M. Grossi, M. Miraglia, and C. Brera. 1989. A study of the contamination by ochratoxin A in green coffee and roasted coffee beans. *Food Addit. Contam.* 6:333–339.
- Mislivec, P. B., V. R. Bruce, and R. Gibson. 1983. Incidence of toxigenic and other molds in green coffee beans. *J. Food Prot.* 46:969–973.
- Nakajima, M., H. Erewda, K. Hisada, H. Tsubouchi, K. Yamamoto, T. Uda, Y. Itoh, O. Kawamura, and Y. Ueno. 1990. Determination of ochratoxin A in coffee beans and coffee products by monoclonal antibody affinity chromatography. *Food Agric. Immunol.* 2:189–195.
- Nakajima, M., H. Tsubouchi, M. Miyabe, and Y. Ueno. 1997. Survey of aflatoxin B<sub>1</sub> and ochratoxin A in commercial green coffee beans by high-performance liquid chromatography linked with immunoaffinity chromatography. *Food Agric. Immunol.* 9:77–83.
- Patel, S., C. M. Hazel, A. G. M. Winterton, and A. E. Gleadle. 1997. Survey of ochratoxin A in UK retail coffees. *Food Addit. Contam.* 14:217–222.
- Pitt, J. I., and A. D. Hocking. 1997. Fungi and food spoilage. Blackie Academic & Professional, London.
- Pittet, A., D. Tornare, A. Huggett, and R. Viani. 1996. Liquid chromatographic determination of ochratoxin A in pure and adulterated soluble coffee using an immunoaffinity column cleanup procedure. *J. Agric. Food Chem.* 44:3564–3569.
- Stegen, G. V. D., U. Jorissen, A. Pittet, M. Saccon, W. Steiner, M. Vincenzi, M. Winkler, J. Zapp, and C. Schlatter. 1997. Screening of European coffee final products for occurrence of ochratoxin A (OTA). *Food Addit. Contam.* 14:211–216.
- Studer-Rhor, I., D. R. Dietrich, J. Schlatter, and C. Schlatter. 1997. The occurrence of ochratoxin A in coffee. *Food Chem. Toxicol.* 35:341–355.
- Taniwaki, M. H. 1995. Growth and mycotoxin production by fungi under modified atmospheres. Ph.D. thesis, University of New South Wales, Australia.
- Taniwaki, M. H., J. I. Pitt, G. R. Urbano, A. A. Teixeira, and M. de F. Leitão. 1999. Fungi producing ochratoxin A in coffee, p. 231–247. In ASIC. 18th Colloque, Association Scientifique Internationale du Café, Helsinki.
- Tsubouchi, H., H. Terada, K. Yamamoto, K. Hisada, and Y. Sakai. 1988. Ochratoxin A found in commercial roast coffee. *J. Agric. Food Chem.* 36:540–542.

## **CAPÍTULO III - “INFLUÊNCIA DA ATIVIDADE DE ÁGUA NA PRODUÇÃO DE OCRATOXINA A POR *Aspergillus ochraceus* EM CAFÉ VERDE”.**

**URBANO, G.R<sup>1</sup>.; LEITÃO, M.F de F<sup>1</sup> ; TANIWAKI, M.H<sup>2</sup>.; VITALI, A. de A<sup>2</sup>. & VICENTINI, M.C<sup>2</sup>.**

1.Faculdade de Engenharia de Alimentos/ Departamento de Tecnologia de Alimentos-Universidade Estadual de Campinas-Campinas-S.P.-Brazil

2.Instituto de Tecnologia de Alimentos, Avenida Brasil, 2880, caixa postal 139, cep 13073-001. Fone/fax + 55 19 37431820-Campinas-S.P.-Brazil

### **RESUMO**

Foi avaliada a influência da atividade de água (Aa) na produção de ocratoxina A (OTA) por cepas de *A. ochraceus* isoladas de frutos de café à 25. Primeiramente, desenvolveu-se a isoterma de adsorção de sementes de café, verificando-se a relação entre o teor de umidade no armazenamento e valores correspondentes de Aa. Para verificar a adequacidade do café como substrato para produção de OTA, foram realizados experimentos inoculando-se 10<sup>8</sup> esporos/ml de *A. ochraceus* e *A. niger* em cafés mantidos em ambiente saturado de água, incubando-se durante 50 dias à 25°C com amostragem e análises de OTA nos intervalos de 10, 20, 30, 40, 45 e 50 dias. Foram constatados níveis de 59, 64, 117, 213, 245 e 194 µg/kg de OTA nos inóculos com *A. ochraceus* e nos experimentos com *A. niger* não foi detectada toxina, mesmo após 50 dias de

incubação. Numa segunda etapa, utilizando-se como referências valores de Aa limitantes para o crescimento fúngico (0,77) e para produção de OTA (0,83), o café verde foi acondicionado em dessecadores (25°C) e mantido em ambiente com umidades relativas de equilíbrio (URE) de 75; 78, 83, 85%, sendo inoculado com suspensão padronizada de esporos de *A. ochraceus*. Análises dos teores de OTA foram efetuadas com 20, 40 e 60 dias de incubação, considerados após ser alcançada uma situação de equilíbrio na Aa dos grãos de café mantidos nos vários ambientes. Em Aa de 0,75 foram detectados teores de OTA de 34,0, 25,5 e 24,2µg/kg após 20, 40 e 60 dias, respectivamente. Na Aa de 0,78 detectaram-se níveis de 30,2; 34,2 e 16,4µg/kg após 20, 40 e 60 dias de incubação, respectivamente, ao passo que na Aa de 0,83 constatou-se 31,5; 24,0 e 118,3µg/kg, após 20, 40 e 60 dias, respectivamente. Já em Aa de 0,85 foram atingidos valores bastante elevados de OTA, de 214,8, 1.600 e 12.600µg/kg com 20, 40 e 60 dias, respectivamente. Os resultados comprovaram a adequacidade dos grãos de café como substrato para o crescimento e produção de OTA por *A. ochraceus*, bem como a importância da Aa na velocidade de crescimento do fungo e na sua capacidade para produzir a toxina.

Keywords: *A. ochraceus*, *A. niger*, water activity, coffee, ochratoxin A.

1. Corresponding authors: [gross@fea.unicamp.br](mailto:gross@fea.unicamp.br) and [mffleitao@uol.com.br](mailto:mffleitao@uol.com.br)

## 1. Introdução

A contaminação fúngica é uma das principais causas de deterioração em grãos armazenados, sendo estes microrganismos capazes de crescer numa grande variedade de substratos, provocando significantes perdas econômicas. Além disso, o problema da contaminação fúngica é importante no aspecto de saúde pública, já que muitas espécies, principalmente nos gêneros *Aspergillus*,

*Penicillium* e *Fusarium* são toxigênicas. Entre estas últimas, destaca-se o *Aspergillus ochraceus*, capaz de produzir ocratoxina A (OTA), que é constatada naturalmente em cereais como o milho, trigo e cevada (Bucheli et al., 1998), e ainda em sementes como café, cacau e também em frutas secas (Frank, 1999). As ocratoxinas foram originariamente detectadas em culturas de *A. ochraceus* (Van der Merwe et al., 1965) mas sabe-se que *Penicillium verrucosum* e várias outras espécies de *Aspergillus* também são capazes de produzi-la. Vários estudos tem demonstrado que as ocratoxinas, principalmente as do tipo A, são nefrotóxicas, hepatotóxicas, teratogênicas e imunossupressivas para diferentes espécies animais (Pohland et al., 1992).

Fatores ambientais como umidade, temperatura, tempo de incubação, bem como a natureza do substrato, tem um importante papel na colonização por *A. ochraceus* e na quantidade de ocratoxina produzida nos diferentes tipos de grãos, sendo que a atividade de água (Aa), temperatura de estocagem e tipo de substrato parecem ser os mais relevantes (Frank, 1999).

Vários estudos tem sido conduzidos para avaliar o desenvolvimento de *A. ochraceus* em meios de cultura (Ciegler, 1972; Bullerman et al., 1984; Madhyastha et al., 1993) e em diferentes grãos, como cevada (Damaglou et al., 1984), trigo e milho (Madhyastha et. al., 1990) e milho (Madyastha et al., 1990). No entanto, são poucos os trabalhos estudando a influência da temperatura de incubação e da Aa destes substratos, no crescimento e produção de OTA.

No que se refere especificamente à presença de OTA em café verde, os primeiros relatos de sua ocorrência foi efetuado por Levi et al. (1974). Em 1987, Micco et al., (1987), comprovaram alta porcentagem de cafés comerciais contaminados com OTA, em níveis variando de 0,2 a 15µg/g, enquanto Tsubouchi et al. (1988), no mesmo período, encontraram OTA em amostras de café torrado e moído em níveis de 3,2 a 17µg/kg. Após 1995, relatos freqüentes sobre ocratoxina A em amostras de café verde ou torrado tem sido descritos (Sthuder-Rhor et al.,1995; Pittet et al.,1996; Patel et al.,1997; Stegen et al., 1997), a maioria

detectando níveis de OTA próximos dos limites sugeridos pela União Européia, de 8µg/kg para café verde e 4µg/kg para café torrado (Frank, 1999).

Com base nestas considerações, esta pesquisa foi conduzida com o objetivo de se obter informações adicionais sobre o comportamento e produção de OTA por *A. ochraceus* quando desenvolveram-se em grãos de café como substrato. De maneira particular, procurou-se avaliar a influência da variação dos teores de Aa e do tempo de incubação na intensidade de produção da toxina.

## **2. Material e métodos**

### **2.1 Isoterma de adsorção do café verde**

O café utilizado na obtenção da isoterma de adsorção foi proveniente de um lote de aproximadamente 10 kg, da safra de 1998, variedade Arábica (*Coffea arabica*) sendo colhido na Fazenda Experimental do Instituto Agrônomo de Campinas-Santa Elisa em Campinas (S.P-Brasil). O café, já beneficiado, foi submetido previamente a um processo de esterilização por irradiação, com fonte radioativa de Cobalto 60, com uma intensidade de feixe de 10 kGy, no Centro de Energia Nuclear na Agricultura -CENA- USP (Piracicaba-S.P). O nível de OTA no café, antes da irradiação, estava abaixo de 1 µg/kg. Após o tratamento, a esterilidade foi confirmada pelo plaqueamento dos grãos de café em meio para contagem total de bolores e leveduras, Ágar Extrato de Malte (MEA), não sendo constatado crescimento fúngico.

O café foi ligeiramente triturado em blender, em condições assépticas, e sua umidade inicial foi determinada em estufa à vácuo à 70°C (AOAC,1995). À seguir, foram preparados 5 dessecadores, contendo cada um deles soluções saturadas de cloreto de sódio (Aa 0,75); sulfato de amônia (Aa 0,80); cloreto de potássio (Aa 0,84); cloreto de bário (Aa 0,90) e sulfato de potássio (Aa 0,97), utilizando-se sais

puros e água deionizada. Três pesa-filtros contendo aproximadamente 5 gramas do café moído foram mantidos à 25°C em cada um dos dessecadores. Pesagens constantes, em balança analítica, foram realizadas até que o peso das amostras se estabilizasse, sendo acompanhado de determinações de Aa utilizando-se o equipamento Aqualab, modelo CX2, (Decagon, USA). Cada determinação foi efetuada em triplicata.

## **2.2. Seleção de cepas de *A. ochraceus* produtoras de OTA**

Foram avaliadas várias cepas de *A. ochraceus*, isoladas originalmente de café verde cultivado em diferentes fazendas na região sudeste do Brasil e previamente confirmadas como potenciais produtoras de OTA. Essas cepas foram cultivadas em placas de Petri contendo Ágar Czapeck Extrato de Levedura (CYA) e incubadas à 25°C por sete dias até crescimento intenso, tendo sido selecionadas como inóculo as cepas produtoras de OTA.

## **2.3 Preparo do Inóculo**

Duas metodologias diferentes foram utilizadas no preparo da suspensão de esporos para uso na inoculação dos grãos de café:

**Metodologia I:** A partir de cepas de *A. ochraceus*, produtoras de OTA, foram preparadas suspensões em 50 ml de solução 0,1% de Tween 80, de forma a garantir um inóculo de aproximadamente  $10^5$  esporos/kg de café verde. A contagem de esporos foi realizada em câmara de Petroff-Hausser (C.A. Hausser & Son, Philadelphia-USA) com o auxílio de um microscópio óptico (Olympus CBA-Germany). Esse tipo de inóculo foi utilizado nos experimentos descritos no item 2.4.

**Metodologia II:** O inóculo de café verde foi feito com solo estéril e seco, contendo aproximadamente  $10^8$  esporos/kg de café verde, para não modificar as umidades relativas de equilíbrio. A contagem de esporos foi realizada em câmara de Petroff-

Hausser (C.A. Hausser & Son, Philadelphia-USA) com o auxílio de um microscópio óptico (Olympus CBA- Germany). Este tipo de inóculo foi utilizado nos experimentos descritos no item 2.5, onde o fungo cresceu em Aa controladas.

#### **2.4 Avaliação da adequacidade do café verde como substrato para o desenvolvimento de *A. ochraceus* e *A. niger*.**

Foram realizados experimentos visando-se obter um intenso crescimento fúngico e produção de OTA, em ambiente com ambiente saturado de água. Para tanto, doze potes de vidro, com capacidade de 3 litros e mais doze frascos menores (250 ml), foram adequadamente esterilizados. No frasco maior, colocou-se 250 ml de água destilada estéril e dentro dos menores pesou-se 25 gramas do café irradiado. À seguir, este café foi inoculado com suspensão de esporos de *A. ochraceus*, ( $10^8$  esporos/kg), preparado como descrito no item 2.3, Metodologia I. O frasco maior foi coberto com grossa camada de gaze, também estéril, sendo que o frasco menor ficou suspenso dentro do maior, contendo água. O conjunto assim preparado foi incubado durante 50 dias à 25°C com análises sendo efetuadas em intervalos de 10 dias. Todos os ensaios foram feitos em duplicata. Este mesmo experimento foi realizado com café do mesmo lote e inoculado com *A. niger* potencialmente produtor de OTA, também isolado de café.

#### **2.5. Avaliação do desenvolvimento e produção de OTA por *A. ochraceus* em café verde mantido em ambiente com diferentes URE.**

Utilizou-se como substrato nos experimentos o mesmo café empregado na elaboração da isoterma do café verde, mas sem triturá-lo.

Dessecadores previamente higienizados, contendo cada um deles soluções saturadas de cloreto de sódio (Aa 0,75); sulfato de amônia (Aa 0,80); cloreto de potássio (Aa 0,83); tartarato de sódio e potássio (Aa 0,85) foram mantidos durante 7 semanas à 25°C, com objetivo de se alcançar a umidade relativa de equilíbrio (URE) desejada. Dentro dos dessecadores, havia nove potes estéreis com cerca

de 25 gramas de café verde sem triturar, em cada um. Quando atingidas as Aa de 0,75; 0,78; 0,83 e 0,85, comprovadas por medidas periódicas no aparelho Aqualab (Decagon-USA), o café verde foi removido e inoculado com esporos de *A. ochraceus* em solo seco e estéril, preparado segundo o ítem 2.3, Metodologia II. Após vigorosa homogeneização do material inoculado com o solo contaminado com esporos, foram pesadas novamente porções de 25 gramas e distribuídas nos frascos estéreis. À seguir, os frascos foram colocados no interior de cada dessecador equilibrado em diferentes umidades relativas e os dessecadores incubados à 25°C. À partir desse momento foram retiradas amostras para análise de OTA após 20, 40 e 60 dias de incubação. Todas as análises foram efetuadas em duplicata.

## 2.5. Análise de Ocratoxina

A metodologia utilizada para análise de OTA foi a proposta por Pittet et al. (1996), baseada no uso da coluna de imunoafinidade de Nakajima et al. (1990) na etapa de limpeza. Uma alíquota de 25 gramas do café inoculado foi extraída com 200 ml de solução de metanol-bicarbonato de sódio 3% (50:50) em "blender" por 2 minutos. À seguir, o extrato foi filtrado sob vácuo, retirando-se 5 ml do filtrado e diluído com tampão fosfato (PBS, pH 7,0) até 100 ml. O tampão fosfato foi composto pelos sais KCl, NaCl, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, diluídos em água, com as respectivas concentrações: 0.002, 0.13, 0.007 e 0.001M e aplicado em coluna de imunoafinidade (VICAM®) contendo anticorpo monoclonal específico para ocratoxina A (deixou-se passar os 100 ml). Após lavagem com 10 ml de água, eliminou-se toda água através de vácuo para secar a coluna. Em seguida, a OTA foi eluída com 4 ml de metanol e quantificada por CLAE fase reversa com detecção de fluorescência. O limite de detecção do método foi de 0.2 µg/kg, sendo que a fase móvel utilizada foi solução 4mM de acetato de sódio/ácido acético (19:1) em acetonitrila.

O CLAE utilizado foi WATERS 717 plus Autosampler (USA) nas seguintes condições: Coluna Spherisorb ODS, 5µm, 250mm x 4,6mm, pré-coluna ODS

Hypersil 5um, 25mm x 4,6 mm, fase móvel 420 ml de acetonitrila-580 ml de acetato de sódio e fluxo de 1 ml por minuto, sendo o volume injetado de 50 µl. O detector de fluorescência utilizou excitação de 330nm e emissão de 470 nm.

### 3. Resultados

#### 3.1 Isoterma de adsorção do café verde à 25°C.

A Figura 1 mostra a isoterma de adsorção do café verde beneficiado à temperatura de 25°C.

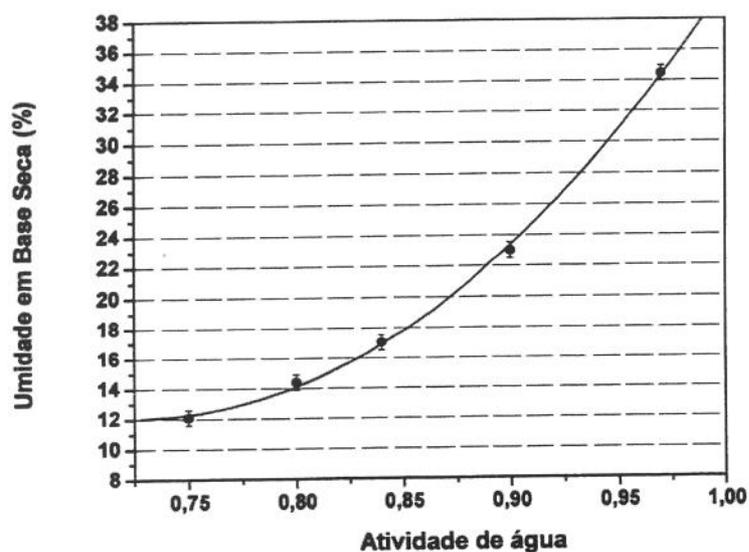


Figura 1: Isoterma de adsorção de café verde à 25°C.

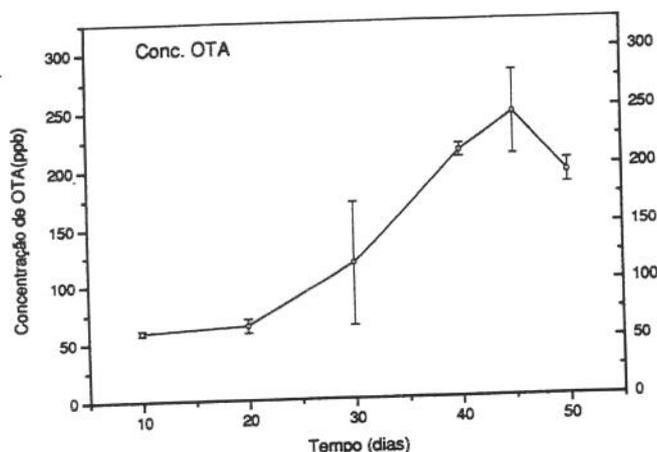
#### 3.2 Avaliação da adequacidade dos grãos de café como substrato para crescimento de *A. ochraceus* e *A. niger* e produção de OTA.

A Figura 2 mostra os níveis de OTA produzidos por *A. ochraceus* ao longo dos 50 dias de incubação dos grãos de café à 25°C, em ambiente saturado e com análises sendo efetuadas em diferentes intervalos de tempo.

Os resultados obtidos confirmaram que o café verde, mantido em ambiente saturado com alta umidade à 25°C se constitui em substrato adequado para o crescimento de *A. ochraceus* e produção de OTA, mesmo após períodos relativamente curtos de incubação.

Já no caso de *A. niger* apenas traços ( $< 0.2\mu\text{g}/\text{kg}$ ) de OTA foram constatados nas amostras inoculadas de café, mesmo após 50 dias de incubação à 25°C, indicando a reduzida atividade da cepa estudada.

Figura 2: Produção de OTA ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )\*\* em café mantido em ambiente de alta umidade relativa e temperatura de 25°C e inoculado com esporos de *A. ochraceus*.



\*\* A barra de erros representa valores máx/min.

### 3.3. Produção de OTA por *Aspergillus ochraceus* em café verde, com diferentes valores de atividade de água e tempos de incubação.

Somente após 7 semanas de incubação dos cafés verdes em ambientes com diferentes valores de umidade relativa é que atingiu-se uma condição de equilíbrio da atividade de água do café e da umidade relativa nos dessecadores (URE). Só então foi feita a inoculação com esporos conforme descrito em 2.4, Metodologia II. Na Tabela 1 podem ser observados os níveis de OTA após 20, 40

e 60 dias de incubação nos diferentes ambientes, e as respectivas Aa atingidas pelos grãos.

Tabela 1: OTA em café inoculado com *A. ochraceus* e mantido em atividades de água controladas.

Período de Incubação (dias)	OTA ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )* em diferentes Aa			
	0.75	0.78	0.83	0.85
20	34,0	30,2	31,5	214,8
40	25,5	34,2	24,0	1.600,0
60	24,2	16,4	118,3	12.600,0

\*Resultados são médias de duplicatas  
Limite de detecção:  $0,2\mu\text{g}/\text{kg}$

Paralelamente aos níveis de OTA detectados, o crescimento fúngico foi acompanhado visualmente. Após 60 dias de incubação, houve crescimento fúngico aparente nas Aa de 0,83 e 0,85, o mesmo não sendo observado nos outros ambientes em que a Aa dos grãos era de 0,83. Nestas últimas condições também constatou-se os maiores valores de OTA, atingindo  $12600,0 \mu\text{g}/\text{kg}$  após 60 dias de incubação em Aa de 0,85.

#### 4. Discussão

Fatores ambientais como temperatura, atividade de água e suas interações são importantes no desenvolvimento de obstáculos para prevenção de deterioração fúngica em grãos (Marins et al., 1998). Os experimentos realizados neste estudo mostraram a marcante influência da atividade de água e do tempo de incubação no crescimento e produção de OTA por *A. ochraceus* em café verde, sugerindo também, que o crescimento fúngico pode ser prevenido com o controle adequado desses fatores ambientais. Por outro lado, estes ensaios confirmaram ser o café verde um substrato adequado para o crescimento e produção de OTA por *A. ochraceus*.

Foi constatado que a combinação de temperatura à 25°C e alta umidade relativa possibilitou a produção de OTA em sementes de café, atingindo níveis de até 194µg/kg após 50 dias de incubação. Este período de tempo pode ser considerado relativamente curto se comparado ao usualmente constatado em silos de armazenagem de grãos. Estes resultados são concordantes com os relatados por Bacon et al. (1973) e Frank (1999), que, inclusive, sugeriram que o teor de umidade poderia ser utilizado como parâmetro importante no controle do crescimento fúngico em grãos armazenados. Este último autor constatou ainda que a etapa crítica para produção de OTA durante o processamento do café é a secagem em terreiro. Ficou comprovada, também, a adequacidade da semente de café como substrato para o crescimento de *A. ochraceus* e produção de OTA desde que mantida em condições ambientais favoráveis, sendo que mesmo após 10 dias de incubação em ambiente com alta umidade relativa já se atingia níveis de OTA de 59µg/kg. É interessante observar-se que após 50 dias de incubação, os níveis de OTA detectados apresentaram uma leve diminuição, o que poderia ser explicado pelo fato da toxina poder ser metabolizada por outras enzimas intracelulares durante a lise celular, ou por enzimas extracelulares, quando o cultivo é prolongado ou há condições de "stress" celular (Damaglou et al., 1985).

Beuchat (1983), relatou que os níveis mínimos de Aa para crescimento fúngico são, normalmente, inferiores aos requeridos para produção de micotoxinas. Já Northolt & Bullerman (1982) constataram que a Aa mínima para crescimento de *A. ochraceus* situava-se entre 0,79 e 0,83. Na presente pesquisa, em valores de Aa=0,75 e 0,78 não houve crescimento aparente do fungo, mas níveis variáveis entre 16,4 a 34,2µg/kg de OTA (Tabela 1) foram constatados após 60 dias de incubação à 25°C. Estes resultados são de difícil explicação, já que a inoculação com esporos foi feita somente após ser atingida uma condição de equilíbrio nas várias Aa; embora os grãos inoculados tenham sido previamente esterilizados por irradiação, existe a possibilidade de eventual contaminação e crescimento incipiente até ser alcançado o equilíbrio, após 50 dias de incubação, o que foi observado no café inoculado. Também poderia ser considerada a possibilidade da presença de traços de OTA no inóculo utilizado, esporos de *A.*

*ochraceus* em solo seco e estéril. Estas hipóteses devem ser consideradas, uma vez que no espaço de tempo entre 20 e 60 dias de incubação não houve qualquer evolução dos teores de OTA em grãos com  $Aa > 0,75$  e  $\leq 0,78$ , o que deveria ocorrer caso houvesse condições mínimas favoráveis para o crescimento fúngico. De qualquer forma, quando comparado com os resultados obtidos nas amostras mantidas em  $Aa$  de 0,83 e 0,85, observa-se que os teores de OTA são muito reduzidos, indicando a inadequação dos valores de  $Aa < 0,78$  para o desenvolvimento de OTA em café. Em  $Aa$  acima de 0,83, relatada por Northolt & Bullerman, (1982) como limite mínimo para produção de OTA, foram constatados altos níveis da toxina, mesmo considerando-se que os cafés inoculados ficaram um longo período incubados à 25°C. Assim sendo, embora com algumas variações, os resultados obtidos são concordantes com os relatados por outros autores (Beuchat, 1983), indicando que as produções acentuadas de OTA são observadas apenas em alimentos com valores de  $Aa$  maiores que 0,83.

Além disso, os altos níveis de OTA encontrados principalmente nos grãos de café mantidos em  $Aa > 0,85$  são realmente alarmantes, devendo-se, no entanto, considerar que o inóculo utilizado para produção de OTA foi muito elevado, ao redor de  $10^8$  esporos/kg de café verde. A isoterma desenvolvida neste trabalho (Figura 1), evidencia que valores de  $Aa$  ao redor de 0,75 corresponderam a teores de umidade de 12%, o que, conforme já mencionado, é recomendado como padrão de segurança na estocagem de grãos de café. Em valores de  $Aa > 0,80$ , os teores de umidade seriam maiores que 14%, não sendo recomendado que o café seja mantido nesta condição por períodos prolongados.

Bucheli et al. (1998), recomendaram que umidade de 13% e  $Aa$  de 0,69 seriam as máximas permitidas para a estocagem segura de grãos de café, de forma a impedir o crescimento e produção de OTA por *A. ochraceus*. Os resultados obtidos neste trabalho (Figura 1), divergem parcialmente dos relatados por estes autores, já que a 13% de umidade correspondeu valores de  $Aa$  mais elevados, próximos de 0,76. Assim sendo, a sugestão da Associação dos Produtores de Café Brasileiros (ABECAFE), que recomenda um limite máximo de

11% de umidade, parece ser totalmente segura no sentido de impedir a produção de OTA durante o armazenamento do café, correspondendo a valores de Aa inferiores a 0,75. Normalmente, no Brasil, o término da secagem é avaliado por determinadores de umidade, sendo que valores entre 11,5 a 12%, são considerados ideais para o armazenamento e boa qualidade do grão. Basicamente, o processo de secagem é realizado naturalmente ao sol ou então pelo uso de secadores mecânicos. Em valores de umidade acima de 13% os grãos sofrem um branqueamento rápido no armazenamento e correm o risco de deterioração, enquanto que abaixo de 11%, o café perde peso e quebra-se facilmente no beneficiamento. Portanto, é fundamental o controle preciso do teor de umidade final dos grãos, contemplando tanto aspectos de qualidade como de segurança (Vilela, 1997).

Em conclusão, fica evidenciado que a presença de níveis elevados de OTA é sempre indicativa de falhas nas boas práticas de colheita e armazenamento dos grãos de café. Desde que sejam assegurados limites máximos de umidade de 11%, correspondendo a Aa de 0,75, o crescimento de *A. ochraceus* será inibido e a produção de OTA no café será restrita, mesmo após períodos relativamente longos de armazenamento.

## 5. Agradecimentos

Esta pesquisa recebeu auxílio financeiro da FAPESP-Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.

## 6. Referências Bibliográficas

1. AOAC.(1995) **Association of Official Analytical Chemists- Methods of Analysis**.(16<sup>th</sup> edition) Moisture, v.1.
2. ABECAFÉ. Associação Brasileira do Café. Disponível em: [www.abecafe.com.br](http://www.abecafe.com.br). Acesso em 09/04/2001

3. Bacon, C.W., Sweeney, J.G., Robbins, J.D. & Burdick, D. 1973. Production of penicillic acid and ochratoxin A on poultry feed by *Aspergillus ochraceus*: temperature and moisture requirements. **J. Appl. Microbiol.** 26,155-160.
4. Beuchat, L. R. Influence of water activity on growth, metabolic activities and survival of yeasts and molds. **J. Food Prot.** 46,135-141, 1983.
5. Bucheli, P., I. Meyer, A. Pittet, G. Vuataz & R. Viani, 1998. Industrial storage of green coffee robusta under tropical conditions and its impact on raw material quality and ochratoxin A content. **J. Agric. Food Chem.** 46,4507-4511
6. Bullerman, L.B., Schoroeder, L.L. & Park, K-Y. Formation and control of mycotoxins in food. **J. Food Prot.** 47,637-646, 1984.
7. Ciegler, A. Bioproduction of ochratoxin A and penicillic acid by members of the *Aspergillus ochraceus* group. **Can. J. Microbiol.** 18,631-639, 1972.
8. Damaglou, A. P., Downey, G.A. & Shannon, W. The production of ochratoxin A and citrinin in barley. **J. Sci. Food Agric.** 35,395-400, 1984.
9. Damaglou, N. F., Campbell, D.S. & Button, J.E. Some factors governing the production of patulin in apples. **Food Microbiol.** 3-10, 1985.
10. Frank, M. **Mycotoxin Prevention and Decontamination.** Third Joint FAO/WHO/UNEP INTERNATIONAL, Tunis, Tunisia. 3-6 March, 1999.
11. Levi, C.P., Trenk H.L. & Mohr H.K. Study of the occurrence of ochratoxin A in green coffee beans. **J. of the AOAC.** 57,866-870, 1974.

12. Madhyastha, S.M., Marquadt, R.R., Frohlic, A. A., Platford, G. & Abramson, D. Effects of different cereal and oilseed substrates on the growth and production of toxins by *Aspergillus ochraceus* and *P. verrucosum*. **J. Agric. Food Chem.** 38,1506-1510, 1990.
13. Madhyastha, S.M., Marquadt, R.R. & Abramson, D. Effect of ochratoxin producing fungi on the chemical composition of wheat and barley. **J. Food Quality.**16,287-299, 1993.
14. Marins, S, Sanchis, V., Saenz, R., Ramos, A.J., Vinas, I. & Magan, N. Ecological determinants for germination and growth of some *Aspergillus* and *Penicillium* spp. from maize grain. **J. Appl. Microbiol.** 84,25-36, 1998.
15. Micco, C., M. Grossi, M. Miraglia & Brera, C. A study on the contamination by ochratoxin A in green coffee and roasted coffee beans. **ASIC, 12° Colloque.** Montreux. 392-396, 1987.
16. Nakajima, M. H., Erewda, K., Hisada, H., Tsubouchi, K., Yamamoto, T., Uda, Y., Itoh, O., Kawamura & Y. Ueno. Determination of ochratoxin A in coffee beans and coffee products by monoclonal antibody affinity chromatography. **Food Agric. Immunol.** 2,189-195, 1990.
17. Northolt, M.D. & Bullerman, L. Prevention of mold growth and toxin production through control of environmental conditions. **J. of Food Prot.** 45,519-526, 1982.
18. Patel, S., Hazel, C.M., Winterton, A.G. & Gleadle A. E. **Food Add. Contam.** 14,217-222, 1997.
19. Pittet, A., Tornare, D., Huggett, A. & Viani, R. Liquid chromatographic determination of ochratoxin A in pure and adulterated soluble coffee using

- an immunoaffinity column cleanup procedure. **J. Agric. Food Chem.** 44,3564-3569, 1996.
20. Pohland, A., Neisheim, S. & Friadman, L. Ochratoxin A: a review. **Pure Appl. Chem.** 64,1029-1046, 1992.
21. Stegen, G.V.D., U. Jorissen, A. Pittet, M. Saccon, W. Steiner, M. Vincenzi, M. Wlinkler, J. Zapp and Chr. Schlatter. Screening of european coffee final products for occurrence of chratoxin A (OTA). **Food Add. Contam.** 14,211-216, 1997.
22. Studer-Rohr, I., Dietrich, D. R., Schlatter, J. & Schlatter, C. The occurrence of ochratoxin A in coffee. **Food. Chem. Toxic.** 33,341-355, 1995.
23. Tsubouchi, H., H. Terada, K. Yamamoto, K. Hisada & Y. Sakabe. Ochratoxin A found in commercial roast coffee. **J. Agric. Food Chem.** 36,540-542, 1995.
24. Van der Merwe, K.J., Steyn, P.S. & Fourie, L. Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. **Nature.** 205,1112-1113, 1965.
25. Vilela, E. R. Secagem e qualidade do café. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, 18,55-63, 1997.

## **CAPÍTULO IV - “EFEITO DA TORRAÇÃO E PREPARO DA BEBIDA NOS TEORES DE OCRATOXINA A EM CAFÉ.”**

URBANO, Gisele Ross<sup>1</sup>; LEITÃO, Mauro Faber de Freitas<sup>1</sup>; TANIWAKI, Marta Hiromi<sup>2</sup>; CASTLE de Menezes, Hilary<sup>1</sup> & VICENTINI, Maria Carolina<sup>2</sup>; IAMANAKA, Beatriz Thie<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Engenharia de Alimentos/ Departamento de Tecnologia de Alimentos-Universidade Estadual de Campinas-Po. Box 6121 -Campinas-S.P.-Brazil

<sup>2</sup>Instituto de Tecnologia de Alimentos, Avenida Brasil, 2880, Po. Box 139, zip code 13073-001. Phone + 55 19 3743 1815, fax:+ 55 19 3743 1822 -Campinas-S.P.-Brazil

### **RESUMO**

Amostras de café Arábica, artificialmente contaminadas com *A. ochraceus* e contendo níveis médios de 160µg/kg de ocratoxina A, foram testadas quanto à estabilidade térmica da toxina utilizando-se três diferentes temperaturas e dois tempos de torração, a saber: temperaturas de 200°, 210° e 220°C por 10 e 15 minutos. As amostras foram avaliadas em relação à porcentagem de sólidos solúveis e foi estudado também o efeito da moagem nos níveis de ocratoxina desses cafés torrados. Selecionou-se amostras torradas à 210°C para preparar bebidas e avaliar o efeito deste procedimento na destruição da OTA. Os resultados revelaram níveis de redução de OTA nos processos de torração de 22 a 48% na temperatura nominal de 200°C, de 39 a 65% a 210°C e de 88 a 93% à 220°C, todos realizados com 10 e 15 minutos de torração. A moagem aumentou os níveis aparentes de OTA nos cafés torrados devido, provavelmente, à maior homogeneização dos grãos de café. Em relação ao preparo das bebidas, houve retenção de aproximadamente 94,25% da OTA na borra de café retida no filtro,

tendo sido constatado níveis próximos a 3,0 µg/kg (5,75%, inicialmente presente nos grãos) na bebida preparada com cafés altamente contaminados. Os resultados demonstraram que as etapas de torração e de preparo da bebida são capazes de reduzir drasticamente os níveis de OTA inicialmente presentes nos grãos de cafés.

**Keywords:** *A. ochraceus*, ochratoxin A and coffee

### **Introdução**

A ocratoxina A (OTA) é uma micotoxina nefrotóxica e carcinogênica, produzida por várias espécies de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. É comumente encontrada em cereais e seus produtos (McDonald et al., 1999; Trucksess, 1999). A ocorrência de OTA em café verde e torrado, tem sido relatada por vários autores (Levi et al., 1974; Cantáfora et al., 1983; Micco et al., 1987; Tsubouchi et al., 1988; Sthuder- Rhor et al., 1995; Pittet et al., 1996; Patel et al., 1997; Stegen et al., 1997; Leoni et al., 2000; Urbano et al., 2001). No entanto, dados conflitantes são encontrados na literatura referentes à influência da torração, moagem e preparo da bebida em relação aos níveis residuais de OTA. Blanc et al. (1998), realizaram experimentos para investigar o comportamento da OTA durante a torração e no processo de café solúvel. Neste trabalho, uma pequena proporção de OTA foi eliminada durante a limpeza do café, pelo descarte de grãos defeituosos e pretos, mas mais significativa redução ocorreu durante o processo de torração. O café torrado e moído continha somente 16% da OTA originalmente presente no café verde. A remoção ou limpeza dos grãos e a degradação térmica foram os fatores mais importantes na eliminação de OTA no café.

Heilmann et al. (2000), estudaram o comportamento e a redução de OTA em grãos de café verde processados pela indústria de torração, sendo que especialmente nos descafeinados com solvente, os níveis de OTA foram significativamente reduzidos.

Leoni et al. (2000), estudaram 34 amostras de café torrado e moído, 14 de café instantâneo e 2 de café descafeinado. Os autores constataram que todas as amostras de café instantâneo continham uma média de 2,2 µg/kg de OTA e em 23 amostras de cafés torrados e moídos foram encontrados valores de OTA entre 0,3 a 6,5 µg/kg. Com as últimas, foram preparadas bebidas, posteriormente analisadas quanto ao teor de ocratoxina A, conseguindo-se recuperar de 74 a 86% da OTA inicialmente presente.

Os dados de literatura evidenciam que o processo de torração é eficiente na redução da OTA, mas faltam pesquisas mais conclusivas sobre os efeitos das etapas de torração, moagem e preparo da infusão na estabilidade da toxina. Portanto, este trabalho teve como objetivo principal a obtenção de informações adicionais relativas à influência destas etapas nos teores de OTA presentes originalmente nos grãos de café.

## **Materiais e métodos**

### **Material**

Foi utilizado como amostra café da espécie arábica (*Coffea arabica*), proveniente da Fazenda Santa Elisa, do Instituto Agronômico de Campinas- São Paulo, Brasil, num total de 7,5 kg de amostra beneficiada, peneira 14, sem escolha e proveniente da safra de 1998.

### **Procedimento Experimental:**

#### **Produção de ocratoxina A no café**

Foram selecionadas para contaminação artificial do café, 5 cepas de *Aspergillus ochraceus* produtoras de OTA, isoladas originalmente de café e reativadas em meio CYA (Czapek Yeast Ágar) à 25°C por 7 dias. As cepas produtoras de OTA foram catalogadas na Fundação André Tosello, Campinas, São Paulo, Brasil, como CCT 7029, CCT 7031, CCT 7036, CCT 7042 e CCT 7045.

Após intenso crescimento, os esporos foram removidos das placas e transferidos para um tubo de ensaio contendo 40 ml de tampão fosfato (pH 7,0). A contagem de esporos foi realizada em câmara de Petroff-Hausser (C.A. Hausser & Son, Philadelphia-USA) com o auxílio de um microscópio óptico (Olympus CBA-Germany), obtendo-se um inóculo de  $10^8$  esporos/ml.

Onze frascos de vidro esterilizados contendo cerca de 600-700g de café cru foram contaminados com a suspensão de esporos com adição de 100ml de água destilada estéril, que foi colocada para aumentar a umidade e promover o melhor crescimento do fungo.

O café foi incubado durante 50 dias à 25°C até ser constatado intenso crescimento fúngico. À seguir, foi transportado para o Centro de Energia Nuclear na Agricultura-CENA-USP, em Piracicaba, S.P., onde foi irradiado com dose de 10kGy em fonte de Cobalto 60, para destruição do fungo.

### **Determinação de *ocratoxina A***

Todas as análises de ocratoxina A realizadas seguiram a metodologia descrita por Pittet et al. (1996) que é baseada na utilização de colunas de imunoafinidade, conforme proposto por Nakajima et al. (1990). O limite de detecção do método foi de 0,2 µg/kg (como descrito no item 2.5, do Capítulo III). No café amostrado após a torração e moagem, analisou-se também 25 g de amostra de pó de café, seguindo-se o mesmo procedimento analítico.

### **Torração do café**

Foram realizados ensaios com três níveis de torração do café e em cada um deles utilizou-se uma temperatura nominal e tempos diversos, conforme mostra a Tabela 1.

Tabela 1: Graus de torração, temperaturas e tempos utilizados.

Grau de torração	Temperatura(°C)	Tempo (min)
Média	200	10 e 15
Média	210	10 e 15
Escura	220	10 e 15

A temperatura de 200°C é considerada torração média, a de 210°C é considerada média escura e a de 220°C é considerada escura. Na execução dos experimentos utilizou-se o torrador piloto marca Probat (WERK tipoRE1-Germany), com capacidade de 200 gramas por teste e as curvas calorimétricas foram baseadas em leituras feitas com um termopar Delta Ohm (HD 9214-Brasil). Foram realizadas três repetições de cada processo, totalizando 18 procedimentos de torração. As amostras utilizadas foram preparadas conforme descrito na determinação de OTA.

### **Preparo da bebida**

Para o preparo da bebida foi escolhida a temperatura de torração de 210°C durante 10 e 15 minutos, por tratar-se do ponto de torra mais apreciado no Brasil. O grau de moagem mais utilizado no Brasil para preparo da bebida em coador de papel (Melitta®) é a moagem fina, que foi escolhida como padrão. Para moer os cafés torrados foi utilizado moinho da marca Tupã (Brasil), seguido de peneiragem até granulometria correspondente a 30 ou 40 (Máquina Vibratória Produtest, modelo T-Brasil).

Foram usados coadores e filtros de papel (marca Melitta), com proporção de água: café sendo de 8g/100ml e 10g/100ml e um tempo de filtração de aproximadamente 2 minutos. A temperatura da água mineral usada foi de  $92\pm 1^{\circ}\text{C}$ , sendo os procedimentos repetidos 5 vezes.

## **Determinação de sólidos solúveis**

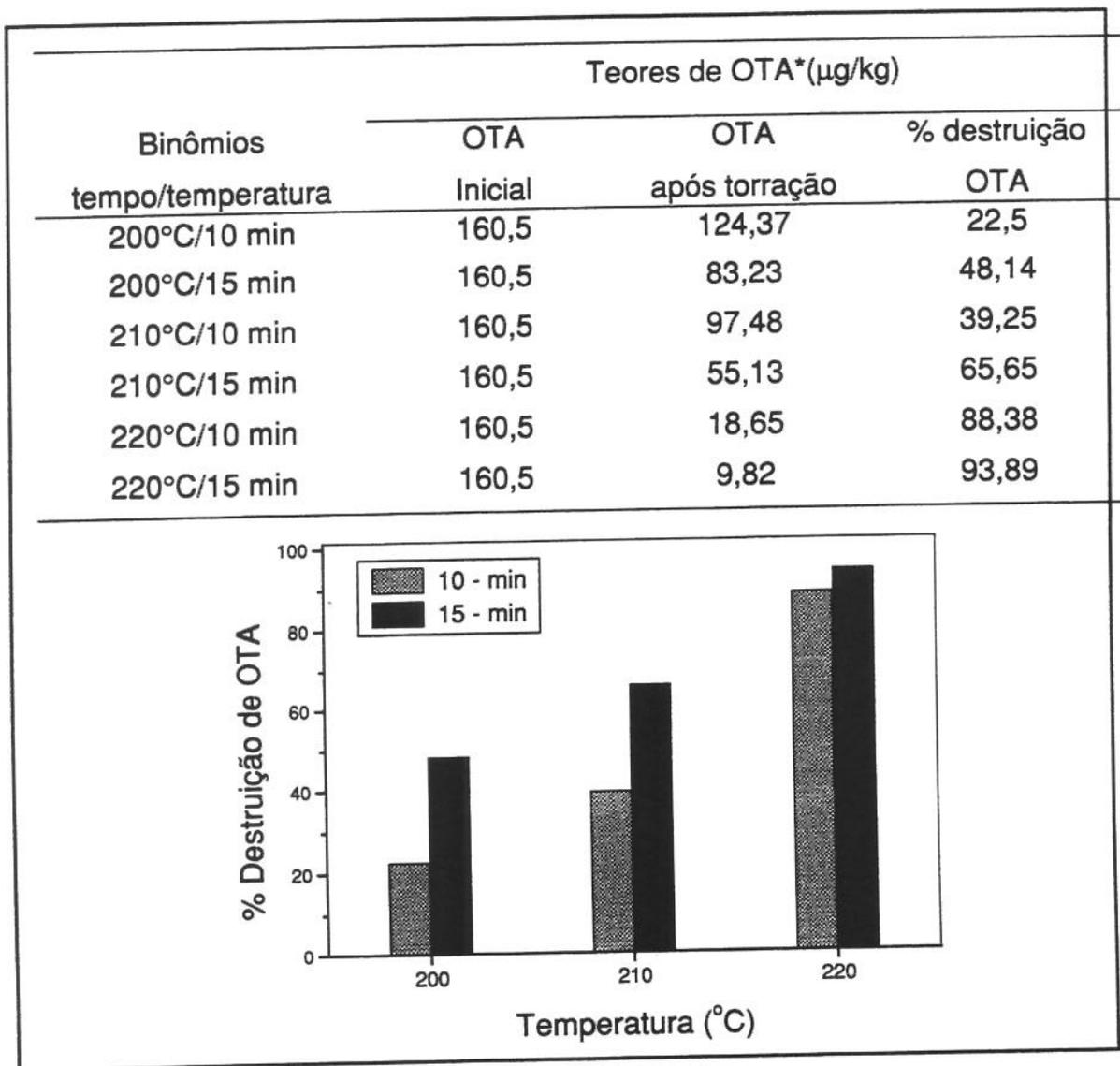
A determinação de sólidos solúveis no café torrado e moído e na bebida, foi feita de acordo com o método da AOAC, nº 973.21(1990).

## **Resultados**

### **Efeito da torração nos teores de OTA presente em grãos de café.**

Os níveis de OTA ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) foram determinados tanto no café controle (grãos inteiros) como no café após inoculação e irradiação (grãos inteiros). No café controle, a média encontrada foi de  $0,49\mu\text{g}/\text{kg}$ , ao passo que no café inoculado e irradiado os teores de OTA alcançaram valores de  $160,5\mu\text{g}/\text{kg}$ . Na Figura 1 são relatados os efeitos do binômio tempo/temperatura nos teores de OTA.

Figura 1: Teores iniciais, após a torração e porcentagem (%) de destruição de OTA durante os processos de torração nos grãos de café.

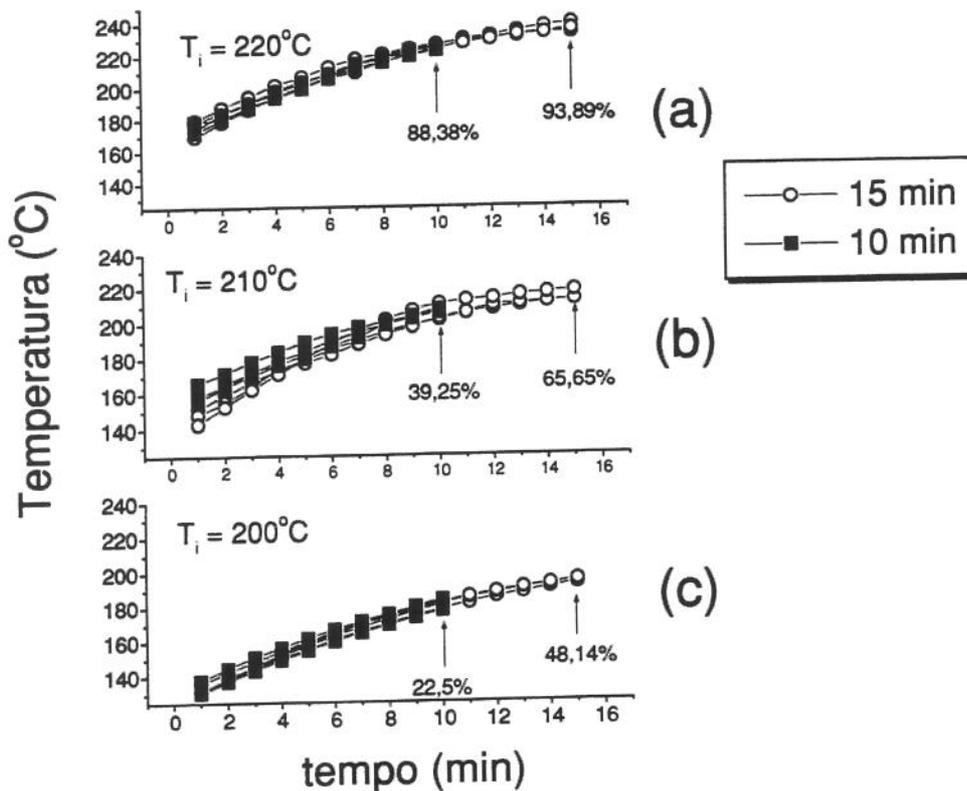


\* Os valores são médias de três repetições em cada temperatura e tempo, totalizando 18 procedimentos de torração.

Os resultados obtidos evidenciaram a baixa estabilidade da OTA ao calor seco, com níveis de destruição da micotoxina variando de 23,5% a 93,89%, no intervalo entre 200° e 220°C. Na Figura 2 estão contidas as curvas calorimétricas obtidas nas condições experimentais utilizadas.

Figura 2: Curvas calorimétricas obtidas durante os processos de torra.

T<sub>i</sub>: temperatura de torração nominal



Escolheu-se a temperatura de torra de 210°C, durante 10 e 15 minutos, para o café utilizado no processo de preparo da bebida, sendo efetuados ensaios utilizando-se 8 e 10 gramas de pó de café, repetindo-se cada processo cinco vezes. Simultaneamente, como mostra a Tabela 2, realizou-se as determinações dos teores de sólidos solúveis presentes tanto no pó de café como na bebida pronta para o consumo.

Tabela 3 : Teores iniciais e redução de OTA e sólidos solúveis em bebidas de café.

Condição de Torração	Condição de preparo infusão	Sólidos solúveis(%)		Teores de OTA ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )		Retenção na borra (%)
		café	bebida	Café		
				original	bebida	
210°C/ 10 min	8/100	23,01	0,73	111,10	5,4 $\pm$ 0,6	95
210°C/ 10 min	10/100	22,40	0,96		4,0 $\pm$ 0,5	96
210°C/ 15 min	8/100	21,61	1,0	62,25	5,2 $\pm$ 0,5	91
210°C/ 15 min	10/100	22,23	1,1		3,0 $\pm$ 1,1	95

Os resultados são médias de cinco repetições.

( $\pm$ ) : valores de desvio padrão.

## Discussão

As curvas calorimétricas mostram os históricos das temperaturas medidas com termopar em intervalos de um minuto (Figura 2). No ensaio em que a temperatura nominal de trabalho registrada no “display” do torrador era de 200°C, a temperatura real de torração do café, registrada com auxílio de termopar, inserido na câmara de torração, não atingiu 200°C (gráfico c), alcançando o valor máximo de 183,9°C após 10 minutos de processo. O mesmo ocorreu para o café torrado por 15 minutos, quando a temperatura máxima atingida foi de 194,9°C. Nos experimentos feitos à 210°C (gráfico b), a variação de temperatura foi menor, atingindo 208°C nos testes feitos com 10 minutos e 218°C nos testes com 15

minutos. Já nos experimentos à 220°C (gráfico a), a temperatura acusou um aumento de 4°C após 10 minutos e maior aumento, de 16°C, após 15 minutos, atingindo 236°C.

Estes resultados evidenciam que fatores como o tipo de equipamento utilizado no processo de torração, que determinam sequências de transferência de calor variáveis, influenciam marcadamente no processo térmico, e que a temperatura nominal de trabalho evidenciada no “display” do equipamento é apenas uma indicação da temperatura final de torração, que pode ser mais baixa ou mais elevada, dependendo de vários fatores, principalmente do grau de torração. No entanto, em todos os ensaios de torração, relatados pelas curvas calorimétricas (Figura 2), objetivou-se atingir o ponto desejado de torra do café, segundo as características desejadas, e, a este respeito, o torrador piloto mostrou-se eficiente no processo.

Embora as condições experimentais não permitam que se estabeleça uma relação definitiva da cinética de destruição da OTA em função da temperatura, fica evidente que o processo de torração em temperaturas entre 200 e 215°C tem um efeito decisivo na destruição da mesma. Isto é confirmado pelos dados experimentais obtidos, evidenciando níveis de destruição oscilando entre 22,5% (200°C/10 min) a 93,89% (215°C/15 min), dependendo portanto, da combinação tempo/temperatura. Estes resultados são similares aos descritos por Heilmann et al. (2000), que verificaram a destruição térmica da OTA durante o processamento do café. Também concordam com os relatados por Blanc et al. (1998), que comprovaram uma redução significativa nos teores de OTA durante o processo industrial de torração, com o café torrado e moído após processamento térmico contendo apenas 16% da OTA originalmente presente no café verde.

Em relação ao conteúdo residual de OTA na bebida final, constatou-se cerca de 91 a 96% de retenção da toxina na borra de café retida no filtro, detectando-se apenas teores entre 3,0 e 5,4µg/kg no filtrado. O método de filtração em coador de papel, utilizado nesta pesquisa, bem como a granulometria das amostras de café são representativos de procedimentos bastante usuais no

Brasil, razão pela qual as condições experimentais simulambem a prática de preparo da infusão em nosso meio.

Algumas hipóteses poderiam ser aventadas na tentativa de explicar os baixos níveis de OTA constatados na bebida; de início, sabe-se que esta micotoxina é uma molécula com baixa solubilidade em água, < 1mg/ml (Furlani & Soares, 1999), o que dificultaria o processo de extração aquosa. Desconhece-se, também, se a temperatura utilizada no preparo da bebida, cerca de 92°C, é adequada para assegurar uma boa extração da micotoxina. Além disso, o tempo de contato da água com o café durante o preparo da infusão foi muito curto, variando de 1 a 2 minutos, o que dificultaria ainda mais o processo de extração. Estes dados discordam dos relatados por Leoni et al. (2000), que prepararam bebidas com níveis de ocratoxina OTA entre 0,3 a 6,5 µg/kg no pó de café inicial, conseguindo recuperar de 74 a 86% da mesma, utilizando temperaturas de ebulição da água no preparo das infusões.

Em conclusão, os resultados obtidos evidenciam claramente que as etapas de torração do café e a de preparo da bebida final para o consumo são de extrema importância na redução dos níveis de OTA presentes inicialmente nos grãos. De acordo com o “Joint Executive Committee on Food Additives” (JECFA), da FAO/WHO, a Ingestão Tolerável Semanal (PTWI) foi estipulada em 100ng/kg de peso corpóreo e portanto, 14 ng/kg/peso corpóreo/dia. Nestas condições, levando-se em consideração os níveis máximos de OTA relatados em grãos de café (Levi et al., 1974; Cantáfora et al., 1983; Micco et al., 1987; Tsubouchi et al.,1988; Sthuder- Rhor et al.,1995; Pittet et al., 1996; Patel et al.,1997; Stegen et al.,1997; Leoni et al., 2000; Urbano et al., 2001) e as reduções ocorrendo nos processos de torração e preparo da bebida, (Blanc et al.1998; Leoni et al., 2000), conclui-se que muito dificilmente um indivíduo adulto atingiria estes valores, considerando-se o consumo médio diário.

Assim sendo, a despeito da eventual comprovação da severidade da toxina ao organismo humano e da relativa frequência na sua ocorrência no café em

grãos, parece que os riscos de intoxicação humana, decorrentes do consumo da bebida, seriam bastante minimizados.

### **Referências Bibliográficas**

1. Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis**, vol.1; n. 973.21, Solids (soluble) in Roasted Coffee, 15 edition, Arlington, Virgínia, USA, 1990.
2. Blanc, M.; Pittet, A.; Munoz-Box, R. & Viani, R. Behavior of ochratoxin a during green coffee roasting and soluble coffee manufacture. **Journal Agric. Food Chem.**, v.46:673-675, 1998.
3. Cantáfora, A.; Grossi, M.; Miraglia, M.; & Benelli, L. Determination of ochratoxin A in coffee beans using reversed phase high performance liquid chromatography. **La Rivista della Società Italiana di Sienza dell'Alimentazione**, 12, 103-108, 1983.
4. Furlani, R. P. Z. and SOARES, L.M.V. Review: Ochratoxin A in Coffee. **Brazilian J. Food Technolgy.**; 2 (1,2) :1-6, 1999.
5. Heilmann, W.; Rehfeldt, A.G.; Rotzoll, F. Behaviour and reduction of ochratoxin A in green coffee beans in response to various processing methods. **Eur. Food Res. Technol**, v. 209: 297-300, 2000.
6. Leoni, L. A. B.; Soares, L. M. V.; Oliveira, P.L.C. Ochratoxin A in brazilian roasted and instant coffees. **Food Addit. and Contaminantes**, V. 17, 867-870, 2000.

7. Levi, C.P., Trenk H.L. and Mohr H.K. Study of the occurrence of ochratoxin A in green coffee beans. **J. of the AOAC**. 57,866-870, 1974.
8. Patel, S.; C. M. Hazel, A. G. M. Winterton, and A.E. Gleadle. Survey of ochratoxin A in UK retail coffees. **Food Add. and Contam.** 14:217-222, 1997.
9. Pittet, A., Tornare, D., Huggett, A. and Viani, R. Liquid chromatographic determination of ochratoxin A in pure and adulterated soluble coffee using an immunoaffinity column cleanup procedure. **J. Agric. Food Chem.** 44,3564-3569, 1996.
10. MacDonald, S.; Wilson, P.; Barnes, K.; Damant, A.; Massey, R.; Mortby, E.; Shepherd, M.J. Ochratoxin A in dried vine fruit: method development and survey. **Food Add. and Contam.** 16 (6): 253-260, 1999.
11. Micco, C., M. Grossi, M. Miraglia, and Brera, C. A study on the contamination by ochratoxin A in green coffee and roasted coffee beans. **ASIC, 12° Colloque**. Montreux. 392-396, 1987.
12. Nakajima, M. H., Erewda, K., Hisada, H., Tsubouchi, K., Yamamoto, T., Uda, Y., Itoh, O., Kawamura, and Y. Ueno. Determination of ochratoxin A in coffee beans and coffee products by monoclonal antibody affinity chromatography. **Food Agric. Immunol.** 2,189-195, 1990.
13. Neishem, S.; Stack, M.E.; Trucksess, M.W. & Eppley, R. M. **Journal AOAC Intern.** 75, 481-487, 1992.
14. Stegen, G.V.D., U. Jorissen, A. Pittet, M. Saccon, W. Steiner, M. Vincenzi, M. Wlinkler, J. Zapp and Chr. Schalter. Screening of european coffee final products for occurrence of chratoxin A (OTA). **Food Add. Contam.** 14,211-216, 1997.

15. Studer-Rohr, I., Dietrich, D. R., Schlatter, J. and Schlatter, C. The occurrence of ochratoxin A in coffee. **Food. Chem. Toxic.** 33,341-355, 1995.
16. The Coffee Brewing Handbook-First Edition by Ted R. Lingle. **A Systematic Guide to Coffee Preparation**, Speciality Coffee Association of America. Long Beach, California, 1996.
17. Tsubouchi, H., H. Terada, K. Yamamoto, K. Hisada, and Y. Sakabe. Ochratoxin A found in commercial roast coffee. **J. Agric. Food Chem.** 36,540-542, 1998.
18. Trucksess, M. W. Determination and survey of Ochratoxin A in wheat, barley and coffee-1997. **Journal of the AOAC**, 82 (1): 85-89, 1999.
19. United States National Toxicology Program-(NTP) Chemical repository (Radian Corporation, august 29, 1991) Ochratoxin A.
20. Urbano, G.R.; Taniwaki, M.H.; Leitão, M.F.de F.; & Vicentini, M.C. Occurrence of Ochratoxin A-Producing Fungi in Raw Brazilian Coffee. **J. of Food Protection** 64 (8): 1226-1230, 2001.

## Capítulo V - Conclusões Gerais

- Os resultados deste trabalho relataram alta incidência de fungos em grãos de café verde, coletados nas diferentes regiões produtoras brasileiras, independente da região e do cultivar estudado;
- Elevada contaminação das sementes de café estudadas (100%) por fungos foi constatada, com o gênero *Aspergillus* ocorrendo em 33,2%, sendo que *A. ochraceus* e *A. niger* representaram 10,3 e 22,9%, respectivamente da contaminação fúngica total;
- A maioria das cepas toxigênicas de *A. ochraceus* e *A. niger*, produtoras de OTA, foram isoladas de amostras provenientes de terreiros e tulhas.
- De um total de 155 cepas de *A. ochraceus* e *A. niger*, constatou-se que 88,1% das cepas de *A. ochraceus* e 11,5% das de *A. niger* foram positivas para produção de OTA;
- Todas as amostras de café verde analisadas quanto à presença de OTA, com exceção de uma, mostraram níveis abaixo do limite sugerido pela União Européia, que é de 8 µg/kg;
- Foi calculada uma isoterma de adsorção de café verde, onde observou-se que valores em torno de 12% de umidade nos grãos, correspondem a uma Aa de 0,75, valor seguro no armazenamento de grãos; inibindo a produção de OTA em grãos de café;

- Experimentos realizados com *A. ochraceus* e *A. niger* inoculados em café verde e mantido em ambiente saturado de água, mostraram produções de OTA de 559, 64, 117, 213, 245 e 194  $\mu\text{g}/\text{kg}$  em intervalos de 10, 20, 30, 40, 45 e 50 dias para *A. ochraceus*, enquanto *A. niger* não produziu OTA em níveis detectáveis nas mesmas condições;
- Cafés mantidos em umidades relativas de equilíbrio (URE) de 75, 78, 83 e 85% e inoculados com esporos de *A. ochraceus*, mostraram ser substratos adequados para o crescimento do fungo e produção de OTA;
- Amostras de café verde contaminado e torrado tiveram redução de OTA de 22 a 48% na temperatura nominal de torração de 200°C; de 39 a 65% a 210°C e de 88 a 93% a 220°C;
- Preparando-se bebidas com o café contaminado, torrado e moído, observou-se retenção de aproximadamente 94,25% da OTA na borra de café remanescente no filtro, tendo sido constatado níveis de 3,0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  na bebida;
- Os resultados comprovaram que as etapas de torração e preparo da bebida são capazes de reduzir drasticamente os níveis de OTA inicialmente presentes nos grãos de café.