

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

**AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA DE GRÃOS DE CAFÉ E DOS
METABÓLITOS FÚNGICOS NA QUALIDADE DA BEBIDA**

Beatriz Thie Iamanaka

Mestre em Tecnologia de Alimentos

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos.

PARER

Prof. Dra. Neura Bragagnolo

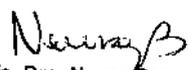
Orientador

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **Beatriz Thie Iamanaka** aprovada pela Comissão Julgadora em 27 de janeiro de 2010.

CAMPINAS,SP

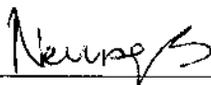
2010

Campinas, 27 de janeiro de 2010.


Profa. Dra. Neura Bragagnolo
Presidente da Banca

Campinas, 02 de Janeiro de 2010.

BANCA EXAMINADORA

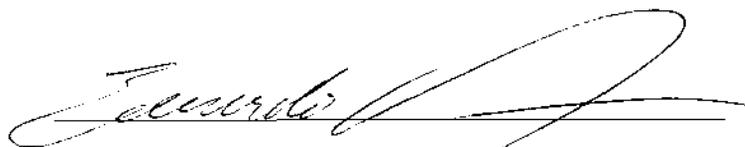


Prof. Dra Neura Braganolo (Orientadora)
Universidade Estadual de Campinas

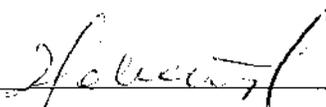
Dr. Aldir Alves Teixeira
Assicafé Assessoria e Consultoria Agrícola



Prof. Dr. Benedito Corrêa
Universidade de São Paulo

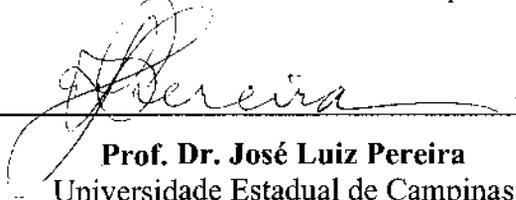


Dr. Eduardo Vicente
Instituto de Tecnologia de Alimentos



Dr. Hector Abel Palacios Cabrera
Instituto de Tecnologia de Alimentos

Prof. Dra. Hilary Castle de Menezes
Universidade Estadual de Campinas



Prof. Dr. José Luiz Pereira
Universidade Estadual de Campinas

Dra. Valéria C. A. Junqueira
Instituto de Tecnologia de Alimentos

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, João e Satiko (*in memoriam*) pelo apoio e incentivo em todos os momentos da minha vida. Pelo esforço e luta por um futuro melhor para seus filhos.

Em especial à minha querida mãe, pela pessoa especial que foi. Alegre, de bondade extrema e tão querida por todos. Pela sua vida dedicada exclusivamente aos filhos.

A eles dedico.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa Dra. Neura Bragagnolo pela oportunidade conferida para a realização do doutorado. Pela orientação e apoio durante o desenvolvimento do trabalho, além da sua confiança e amizade.

À Dra. Marta Hiromi Taniwaki pela confiança plena para o desenvolvimento do projeto. Agradeço os ensinamentos durante estes 13 anos de convivência e o incentivo para que eu seguisse a carreira da pesquisa científica. Agradeço o apoio, a amizade e o otimismo constante, que nos tem levado a enfrentar juntas, novos e grandes desafios.

A minha querida amiga, agora Profa. Dra. Marina Venturini Copetti, pelo auxílio nos trabalhos (de toda a natureza!) do laboratório, permitindo o desenvolvimento de meu projeto de doutorado. Agradeço sua amizade sincera, principalmente nos momentos difíceis. Sua capacidade de ouvir e ajudar o próximo e principalmente seu bom humor e otimismo permanente, que contagiam as pessoas e as fazem ficar sempre bem. Obrigada por estar sempre ao meu lado D. Marina e pelo apoio, atualmente mesmo que de longe.

Ao Dr. Eduardo Vicente do Departamento de Química do ITAL, pelos ensinamentos na área analítica. Pela paciência e disposição em ajudar, em todos os momentos que foram necessários. E pela sua amizade.

À Ana Regina R. Teixeira e Dr. Aldir A. Teixeira da Assicafé-Assessoria e Consultoria Agrícola, pela realização das análises sensoriais e por apoiarem sempre as nossas pesquisas.

Ao Dr. John I. Pitt (New South Wales University, Department of Food Science and Technology) e Dr. Jens C. Frisvad (Technical University of Denmark, Department of Systems Biology-Center for Microbial Biotechnology) pelo auxílio na identificação dos fungos e pelos ensinamentos na área de micologia de alimentos.

Aos ex-estagiários do laboratório de micologia e micotoxinas do ITAL, em especial ao Felipe Nakano por auxiliar nos experimentos do projeto e ao Daniel P. Lemes, pela

amizade, auxílio nas atividades do laboratório e pelos bons momentos convividos.

As atuais estagiárias do laboratório Larissa, Thaiane, Carolina e Veridiana, pelo trabalho e dedicação nas atividades do laboratório, além da sincera amizade.

As minhas queridas amigas e amigos Maristela, Margarete, Hector Abel, Thais, Dionir, Fabiana, Silvia, Cirene, Adriane (Dori), Larissa Bertan, Luciana, Juliana, Mariana, Tati, Nilo, Dani, Paulinha e Patrícia, pela amizade, apoio e pelos bons momentos juntos.

Aos demais pesquisadores, Valéria, Neusely e Neliane, do Laboratório de Microbiologia do ITAL, pelo aprendizado e amizade ao longo destes anos. As funcionárias, Adelaide e Luciara e estagiários da microbiologia do ITAL pela disposição em ajudar e amizade.

Ao Sr. Valdomiro, proprietário da fazenda Santa Maria por apoiar nosso projeto de pesquisa desde o início, fornecendo as amostras. E ao Sr. Walter, gerente da fazenda, que tão amavelmente nos recebeu em todas as nossas visitas. Também ao funcionário da Procead, Marcos, pela boa vontade e auxílio na logística da coleta das amostras.

Em especial agradeço aos meus irmãos André, Fábio e Livia, minhas cunhadas Camila e Daiana e cunhado Yassu, que sempre estiveram do meu lado e me apoiaram nas minhas escolhas. Agradeço aos mais recentes membros da minha família, meus “fofinhos”, João e Antônio, por propiciarem à família tantas alegrias. São vocês os principais responsáveis por esta conquista.

Ao Julio, meu amor. Apesar de pouco tempo juntos já é tão importante em minha vida. Obrigada pelo carinho, pela paciência e por estar ao meu lado, pra sempre.

À minha “grande” família, que sempre torceu pelo meu sucesso pessoal e profissional. Em especial à tia Nobuko, tia Tomoko, tio Takasan, tio Pepe, tio Matian, tia Kazuko, tia Sussu, tia Nono, tio Takeshi, tio Yoshiuki e tia Rute, e também todos os meus primos e primas, que estiveram do meu lado nos momentos mais difíceis e tanto me ajudaram direta ou indiretamente na conclusão deste trabalho.

Ao tio Sérgio, pessoa tão importante para a minha formação profissional, que me proporcionou a descoberta e o interesse pela área da Engenharia de Alimentos e tem me apoiado desde o início da minha carreira.

Agradeço à Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio e bolsa concedidos.

RESUMO

O café passa por vários processos até chegar a ser consumido como bebida e vários fatores contribuem para a sua qualidade final, dentre eles a população microbiana presente. A contaminação dos grãos pelos micrororganismos é diversificada, envolvendo a participação de bactérias, bolores e leveduras, com a predominância de um ou outro grupo, dependendo da etapa de processamento dos grãos. Existem evidências, ainda não conclusivas de que vários fungos presentes no café podem produzir uma série de compostos que podem vir a prejudicar a qualidade da bebida. Esta pesquisa teve como objetivos analisar a microbiota dos grãos obtidos em diferentes etapas da cadeia produtiva do café; investigar a produção dos compostos voláteis produzidos pelos isolados e o impacto dos mesmos na qualidade da bebida e; avaliar sensorialmente a bebida, correlacionando com os fungos presentes. A microbiota de 41 amostras de grãos de café cru, de duas regiões produtoras do Brasil, Cerrado Mineiro/MG e Piraju/SP foram analisadas. As amostras foram coletados do pé (cereja), do solo (varreção), do terreiro (maduro, seco e passas no pé e verde) e da tulha (estocagem) e comparados dois tipos de preparo dos grãos: secagem natural e cereja descascado. As amostras de Minas Gerais apresentaram baixa infecção fúngica, as principais espécies isoladas foram *Eurotium* spp. e *Fusarium* spp. Em relação aos cafés da região de Piraju, houve uma grande diversidade de espécies isoladas, dentre àquelas mais predominantes foram *Penicillium brevicompactum*, *Aspergillus foetidus*, *Penicillium crustosum* e *Fusarium* spp. Cafés varreção e bóia (seco e passas no pé) caracterizaram-se pela alta incidência de *Aspergillus foetidus*, apresentando infecção superior a 16% por esta espécie e avaliação sensorial negativa. *A foetidus* produziu compostos voláteis, como 2-butenal, dimetilbisulfeto no meio de cultura e 1-octen 3-ol quando inoculado no café cru. Estes metabólitos são caracterizados pelo aroma desagradável de terra, mofo, estragado e pungente e foram relacionados como alguns dos compostos responsáveis pelas características negativas na análise sensorial da bebida. Foi constatado também que a presença de algumas espécies fúngicas nos grãos, mesmo em alta percentagem de infecção, não implicou necessariamente na redução da qualidade sensorial da bebida. Amostras com alta frequência de *Penicillium brevicompactum* apresentaram avaliação final positiva. Esta espécie destacou-se pela produção de vários compostos

voláteis com características positivas como aldeídos (2-octenal, decanal e undecanal) com aroma cítrico e herbal, e cetonas (2-nonanona, 3-nonen-2 ona, 2-undecanona e 2 pentadecanona) de aroma frutal e floral. Portanto, metabólitos produzidos durante o desenvolvimento de espécies fúngicas podem estar relacionados à introdução de características sensoriais de sabor ao café, tanto desejáveis quanto indesejáveis.

ABSTRACT

Coffee goes through several processes until consumed as a beverage and many factors contribute to its final quality, including the presence of the microbial population. The coffee beans contamination by microorganisms is diversity involving bacteria, moulds and yeast, with predominance of one or another and is dependent of the coffee beans processing stages. There is inconclusive evidence that many fungi present in coffee can produce several volatile metabolites that can damage beverage quality. This research had the objectives to analyze the mycobiota of the coffee beans obtained on the different stages of coffee production chain; investigate the production of volatile compounds produced by the isolates and the impact of them on the beverage quality and carry out sensory evaluation of beverage in relation to the fungal species. The mycobiota of forty-one samples of raw coffee beans from two Brazilian production areas, Cerrado Mineiro/MG and Piraju/SP were analyzed. Samples were collected from the tree (cherry beans), from the soil (“varreção”), from the drying yard (ripe, dry, over-ripe and immature) and drying storage (“tulha”) and two kinds of bean separation were compared: natural and pulped. The Minas Gerais samples had low fungal infection with the main species being *Eurotium* spp and *Fusarium* spp. In relation to the Piraju samples there was a considerable diversity of isolated species and the following were among the most predominant: *Penicillium brevicompactum*, *Aspergillus foetidus*, *Penicillium crustosum* and *Fusarium* spp. Coffee beans collected from the soil along with the over-ripe ones were a highly incidence of *Aspergillus foetidus* with a percent infection above 16% and a negative sensorial evaluation. *Aspergillus foetidus* produced volatile compounds such as 2-butenal, dimethyl disulfite in the culture medium and 1-octen-3-ol when inoculated on the raw coffee. These metabolites were characterized by as unpleasant aroma of soil, musty, rotten and pungency and they were related as one of the responsible compounds for the negative characteristics of the sensorial analyses. In this work the presence of some fungal species were found in the beans with even at high levels of infection, did not necessarily result in a decrease of the sensorial evaluation. Samples with a high percentage of *Penicillium brevicompactum* infection had a positive final evaluation. This specie stood out from the rest due to the production of many volatile compounds with positive characteristics such as aldehydes (2-octenal, decanal and undecanal) showing citric and herbal aromas and cetones (2-nonanone,

3-nonen-2-one, 2-undecanone and 2-pentadecanone) showing frutal and floral aroma. Therefore, metabolites produced during fungal growth can be related to the insertion of sensorial properties of flavour on coffee, both positive or negative.

ÍNDICE GERAL

INTRODUÇÃO.....	1
1.REVISÃO DA LITERATURA.....	3
1.1 O Café	3
1.1.1 Origem e Expansão.....	3
1.1.2 Café no Brasil – Importância Econômica e Aspectos Atuais.....	3
1.2 Composição química do café cru e precursores de aroma.....	6
1.3 Café: Planta, Beneficiamento e Comercialização.....	9
1.3.1 Planta	9
1.3.2 Colheita	10
1.3.3 Processamento pós-colheita.....	11
1.3.3.1 Lavagem	11
1.3.3.2 Secagem	11
1.3.3.3 Beneficiamento	14
1.3.3.4 Estocagem e transporte	16
1.4 Microrganismos no café e influência na qualidade da bebida.....	16
1.4.1 Interação microbiana e os fungos no café cru	16
1.4.2 Compostos voláteis dos fungos	19
1.5 Análise dos compostos voláteis de fungos	23
1.6 Compostos voláteis fúngicos em relação à bebida.....	25
2. OBJETIVOS.....	28
3.MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
3.1 Café	29
3.2 Análise Micológica.....	29
3.2.1 Isolamento dos fungos do café	29
3.2.2 Identificação dos fungos.....	29
3.3 Atividade de água e umidade.....	30

3.4 Análise sensorial da bebida	31
3.4.1 Preparo da bebida	31
3.4.2 Avaliação sensorial.....	31
3.5 Análise dos compostos voláteis.....	32
3.5.1 Extração dos voláteis.....	32
3.5.2 Análise qualitativa e identificação dos compostos voláteis	33
3.6 Avaliação da influência dos fungos na bebida	33
3.6.1 Inoculação dos fungos nos grão de café	34
3.6.1.1 <i>Cepas testadas</i>	34
3.6.1.2 <i>Teste de produção de toxinas</i>	34
3.6.1.3 <i>Café- Esterilização</i>	35
3.6.1.4 <i>Inoculação dos fungos no café</i>	36
3.6.1.5 <i>Análise sensorial</i>	36
3.6.1.6 <i>Análise dos metabólitos voláteis</i>	36
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1 Análises micológicas e avaliação sensorial.....	37
4.2 Avaliação dos metabólitos produzidos pelas cepas estudadas	49
4.3 Esterilização e inoculação dos grãos	50
4.4 Avaliação sensorial do café com os fungos.....	51
4.5 Análise dos compostos voláteis.....	53
4.5.1 Parâmetros testados	53
4.5.2 Compostos voláteis dos fungos no meio de cultura	53
4.5.3 Compostos voláteis do café inoculado com os fungos	57
5. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	61
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

INDICE DE TABELAS

Tabela 1- Produção brasileira de café cru beneficiado em 2008.....	5
Tabela 2 - Produção mundial de café beneficiado em 2008.....	6
Tabela 3- Composição média de grãos de café cru (% peso seco).....	7
Tabela 4- Classificação por peneira	14
Tabela 5- Classificação por tipo de defeitos e possíveis causas.....	15
Tabela 6 - Classificação da bebida	15
Tabela 7 - Fungos isolados de amostras de café cru da região de patrocínio no estado de Minas Gerais.....	39
Tabela 8 - Fungos isolados de café cru de café da região de Piraju, São Paulo.....	42
Tabela 09 - Valores de atividade de água (média de três repetições).....	49
Tabela 10 - Resultados da análise sensorial dos cafés inoculados com <i>Aspergillus foetidus</i> , <i>Penicillium crustosum</i> e <i>Penicillium brevicompactum</i>	52
Tabela 11 - Compostos voláteis produzidos pelos fungos em meio de cultura CYA (Ágar Czapek Extrato de Levedura) mantidos a 25°C por 7 dias.....	54
Tabela 12 - Compostos voláteis identificados no café cru inoculado com os fungos.	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 01 – Pés de café (Fazenda Santa Maria, Piraju/SP)	10
Figura 2: Árvore do café: A) Floração e B) Cereja no pé	10
Figura 3 – Secagem natural em terreiro (Fazenda Tijuco Preto, Piraju/SP).....	12
Figura 4 – Secagem utilizando o preparo cereja descascado em terreiro suspenso (Fazenda Santa Maria, Piraju/SP)	13
Figura 5 - Vias metabólicas envolvidas na produção de diferentes metabólitos secundários (Fonte: Magan & Evans, 2000).	20
Figura 6 - Esquema da técnica Headspace-SPME (Wang, 1997)	24
Figura 7 - Análise sensorial realizada pela equipe da Assicafé, utilizado o método do <i>espresso</i>	32
Figura 8- Contaminação fúngica em café varreção (Piraju, Amostra 9).....	46
Figura 9 – Contaminação fúngica em café da tulha (Piraju, Amostra 8).	46
Figura 10 - Café com presença de <i>P. brevicompactum</i> (B), <i>P. crustosum</i> (P) e <i>A. foetidus</i> (fungo negro).	51
Figura 11 - Perfil HS/SPME-GC/MS de <i>Penicillium brevicompactum</i> em Ágar Czapek Extrato de Levedura (a) e comparação entre os espectros de massa do composto 3-nonen 2-one (b) e (c).....	57

INTRODUÇÃO

O cultivo, a comercialização e a industrialização do café vêm representando, ao longo dos últimos três séculos, um dos principais sustentáculos do desenvolvimento sócio-econômico brasileiro. Neste contexto, o país vem ocupando, com relativa constância, a posição de maior produtor e exportador mundial, não significando que o excelente desempenho em termos quantitativos seja sempre acompanhado no aspecto qualitativo. Na verdade, é um fato reconhecido que a qualidade da bebida é decorrente da somatória de inúmeros fatores, incluindo a espécie ou variedade botânica, condições de cultivo, técnica de colheita e secagem dos grãos e as condições tecnológicas de preparo, moagem, torrefação dos grãos e preparação da bebida.

No entanto, dentro dessa 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 utilizando secadores rotativos, são componentes fundamentais na definição da qualidade final da bebida. Esta contaminação dos grãos é bastante diversificada e complexa, envolvendo a participação de bactérias, bolores e leveduras, com a predominância de um ou outro grupo, dependendo da etapa do processo e das condições ambientais. Inúmeras pesquisas, conduzidas no Brasil ou no exterior, têm comprovado a participação constante e marcante dos bolores como um dos principais componentes da microbiota presente nos frutos imediatamente após a colheita e durante a secagem.

O sabor característico do café deve-se à presença e aos teores de vários constituintes químicos, destacando-se, entre eles, os ácidos, aldeídos, cetonas, açúcares, proteínas, aminoácidos, ácidos graxos e compostos fenólicos, alguns destes resultantes também da ação de enzimas.

Os fungos são conhecidos como produtores de uma larga quantidade de metabólitos voláteis. Vários metabólitos voláteis como ácido tricloroanisol (TCA), geosmina e terpenos têm sido encontrados na bebida do café, e estes metabólitos dão um sabor indesejável conhecido como “off-flavours”.

Existem evidências, ainda não conclusivas, de que vários fungos presentes no café podem produzir metabólitos voláteis que causam “off-flavours”, prejudicando a qualidade da bebida. Até o momento poucos estudos têm relacionado à contaminação fúngica com as características da bebida, existindo assim a real necessidade de um estudo mais aprofundado, a fim de conhecer e identificar os fungos presentes em várias etapas da produção do café, avaliar os compostos químicos produzidos por estas espécies e correlacionar com as características sensoriais da bebida.

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1 O Café

1.1.1 Origem e Expansão

A planta do café, segundo relatos e lendas, é originária da África, na região da Etiópia nos anos de 575 a 850. Seu nome vem da palavra árabe “qahwa” (significa vinho) (ABIC, 2009). Foram os árabes os responsáveis pela difusão da planta pelo mundo e até o século XVI somente eles tinham o completo controle sobre o cultivo e preparo da bebida, sendo considerada uma bebida sagrada para os muçulmanos e consumida nas mesquitas durante as cerimônias.

Devido ao bem estar proporcionado pela ingestão da bebida, o café era comumente receitado pelos médicos da época, e no século XVI, já era comum a existência de Casas de Café, na Pérsia e Turquia.

Foi no final do século XVI que a bebida chegou à Europa, trazido por viajantes franceses, alemães, italianos e holandeses, em suas freqüentes viagens ao oriente. Neste momento os grãos e os procedimentos para a fabricação da bebida eram muito cobiçados. Os holandeses foram os primeiros a obter as primeiras mudas e cultivar a planta em Amsterdã. A partir desse momento, os holandeses, juntamente com os franceses, foram os responsáveis pela inicial disseminação do café pelo mundo através de suas colônias na África, América Central e do Sul no século XVII e XVIII (Banks *et al.*, 1999).

1.1.2 Café no Brasil – Importância Econômica e Aspectos Atuais

O café entrou no Brasil por Belém/PA, trazido da Guiana Francesa em 1727 e devido às condições climáticas favoráveis, o cultivo se espalhou rapidamente ao longo do país. As primeiras plantações se deram no Pará, passando em seguida para o Maranhão e atingindo a Bahia no século XVIII. Alguns anos depois chegou até o Rio de Janeiro, expandindo pela Serra do Mar e atingindo o Vale do Paraíba. No início do século XIX já havia se espalhado por São Paulo e Minas Gerais e chegou ao Paraná no século XX. Neste

espaço de tempo relativamente curto, o café passou de uma posição relativamente secundária para a de produto-base da economia brasileira.

No século XIX, o café já respondia por cerca de 40% do valor total das exportações do país e nesta época o Brasil já havia se tornado o maior produtor mundial.

Foram vários os fatores políticos e sociais que favoreceram a expansão da cultura cafeeira ao longo deste período. O deslocamento do eixo econômico do Nordeste para o Sudeste, devido o agravamento da crise do açúcar e algodão e a abolição da escravatura, impulsionando a imigração dos trabalhadores europeus para as grandes fazendas e centros urbanos, influenciaram positivamente a expansão da cafeicultura no país (Szmrecsányi, 1990). A cultura do café ocupou vales e montanhas, possibilitando o surgimento de cidades e dinamização de importantes centros urbanos por todo o interior do Estado de São Paulo, sul de Minas Gerais e norte do Paraná. Para o escoamento da produção, foram construídas ferrovias que impulsionaram o comércio de outras mercadorias importantes (ABIC, 2009).

No entanto a economia cafeeira passou por alguns períodos críticos decorrente da instabilidade da economia mundial e de fatores climáticos. Os principais deles foram a crise de 1930, com a queda da bolsa de Nova Iorque, ocasionando um excedente de produto no mercado e a queima de mais de 78 milhões de sacas. Na década de 70, a região do Oeste Paulista e Paraná foi atingida por uma forte geada que dizimou quase a totalidade das plantações de café desta região. Foi nesse momento, a partir da década de 80, que Minas Gerais começou a se destacar como maior produtor brasileiro, sustentando até hoje esta posição.

Várias medidas foram adotadas visando à recuperação da economia cafeeira no país. O controle da política cafeeira passou para o Conselho Nacional do Café que tinha a responsabilidade de ajustar a capacidade produtiva à demanda. Em 1952 foi criado o Instituto Brasileiro do Café (IBC) com a função de exercer a política econômica do produto. Houve uma reorganização da cafeicultura nacional e os produtores, industriais e exportadores se uniram e conseguiram se recuperar (Gonçalves, 1997). A busca pela região ideal para a cultura do café se estendeu por todo o país, e atualmente tem se firmado em regiões do Estado de São Paulo, Minas Gerais, Paraná, Espírito Santo, Bahia e Rondônia. O café continua a ser um dos produtos mais importantes para o Brasil. Atualmente o país é o maior produtor e exportador, respondendo por 34% da produção e 30% da exportação mundial

As Tabelas 1 e 2 apresentam a produção de café beneficiado no Brasil em 2008 e os estados produtores; os principais países produtores e sua produção total, respectivamente.

Tabela 1 – Produção brasileira de café cru beneficiado em 2008.

Estados	Produção em mil de sacas de 60 quilos		
	Arábica	Robusta	Total
Minas Gerais	23.545	36	23.581
Espírito Santo	2.867	7.363	10.230
São Paulo	4.420	-	4.420
Paraná	2.608	-	2.608
Bahia	1.566	576	2.142
Rondônia	-	1.876	1.876
Mato Grosso	12	126	138
Pará	-	233	233
Rio de Janeiro	253	13	266
Outros	213	285	498
Total	35.484	10.508	45.992

Fonte: Conab, janeiro 2008

Tabela 2 – Produção mundial de café beneficiado em 2008.

País	Produção em mil de sacas de 60 quilos
Brasil	45.992
Vietnã	16.000
Colômbia	10.500
Etiópia	6.133
Indonésia	5.833
México	4.650
Índia	4.610
Peru	4.102
Honduras	3.833
Uganda	3.500
Guatemala	3.370
Costa do marfim	2.500

Fonte: OIC, 2009

O Brasil é o segundo maior consumidor mundial do produto, somente atrás dos Estados Unidos. Segundo pesquisa realizada pela Associação Brasileira da Indústria do Café (ABIC), houve um aumento de 3,21% no consumo interno de café em 2008 em relação ao ano passado, correspondendo a um total de 17,66 milhões de sacas (ABIC, 2009).

As principais espécies de café cultivadas são *Coffea arabica* e *Coffea canephora* (robusta). No Brasil, 77% da produção é arábica enquanto que 23% é robusta. A estimativa de produção brasileira de café para 2008/2009, segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2008) encontra-se em torno de 36,9 e 38,8 milhões de sacas de 60 quilos.

1.2 Composição química do café cru e precursores de aroma

A composição química de café cru varia de acordo com o a espécie e tipo de cultivar e tais diferenças são importantes para a obtenção das características de sabor obtidos após a etapa da torração.

Hoje são conhecidos mais de 1000 compostos voláteis e não voláteis na bebida do café. Após a torração alguns compostos do café permanecem, mas a maioria sofre modificações, dando origem a outros novos. A composição química do grão cru das espécies arábica e robusta é apresentada na Tabela 3.

Tabela 3: Composição média de grãos de café cru (% peso seco).

Composto	Arábica	Robusta
Cafeína	1,2	2,2
Trigonelina	1,0	0,7
Proteína total	10,3	10,3
Aminoácidos livres	0,5	0,8
Carboidratos	58,9	60,8
Ácidos alifáticos	1,7	1,6
Ácidos clorogênicos	6,5	10,0
Lipídios totais	16,0	10,0
Minerais	4,2	4,4
Potássio	1,7	1,8

Fonte: Illy & Viani (2005) e Speer & Kolling-Speer (2001)

De acordo com Illy & Viani (2005) a mistura de cerca de 25 compostos são os responsáveis pelo aroma característico do café torrado e estes se concentram na fase oleosa. A diferença entre o aroma e o gosto está no fato de que o gosto detecta apenas os componentes não voláteis como o amargo, doce, salgado e azedo; enquanto o aroma vem dos compostos voláteis e a percepção do sabor quando a bebida está na boca. Este é também reconhecido pelo odor, porque os metabólitos voláteis da superfície do líquido na língua vão para os mesmos receptores sensoriais nos bulbos olfatórios do nariz e retornam para a boca.

O café arábica caracteriza-se pelo maior teor de lipídios e trigonelina enquanto que o robusta contém mais cafeína e ácidos clorogênicos. O café robusta apresenta maior teor de sólidos e este fato tem contribuído no aumento da utilização desta espécie pela indústria de café solúvel (Clifford, 1985).

Os carboidratos correspondem a 50% do total de matéria seca do grão e são compostos principalmente de polissacarídeos (45%), dentre eles, a manose, galactose, glucose e arabinose; a sacarose (6%) e os monossacarídeos (0,5%) (Lullmann & Silwar, 1989).

Após a torração, os carboidratos são degradados e/ou sofrem o processo de caramelização formando os aldeídos e ácidos voláteis que vão conferir características de

cor e aroma da bebida (Yeretzian *et al.*, 2002). Além disso, estão relacionados com a formação das melanoidinas, pigmento marrom obtido da reação entre alguns carboidratos e aminoácidos livres após tratamento térmico, resultantes da Reação de Maillard. O conteúdo de glicose tem tido uma correlação negativa com o nível de aroma e positiva com a doçura e a frutose negativa com a doçura (Illy & Viani, 2005).

Os lipídios, segundo componente mais abundante no grão de café, atingindo até 16% do peso seco do grão, são compostos basicamente de triglicerídeos formados pelos ácidos linoleico (47%), palmítico (41%), oleico (6,4%) e esteárico (6%) (Fonseca & Gutierrez, 1971). A matéria insaponificável é composta de diterpenos, principalmente cafestol, kahweol, em arábica e 16-O-methylcafestol em robusta. Compondo o restante da fração lipídica dos grãos de café cru encontram-se os esteróis, principalmente desmetilesteróis, dentre eles β -sitosterol, stigmasterol e campesterol; e os tocoferóis (Mariani & Fedeli, 1991; Folstar *et al.*, 1977).

Os ácidos clorogênicos são compostos fenólicos encontrados na forma de mono e diéster com álcoois alifáticos do ácido quínico (Farah *et al.*, 2005, Shahrzad, & Bitsch, 1996, Clifford, 1999). Os principais grupos são os ácidos cafeloilquínico, dicafeoilquínico, feruloilquínico e coumaroilquínico (Clifford, 2000 e 2003). Cerca de 32-52% dos ácidos clorogênicos são degradados durante a torração e os produtos formados são encontrados no aroma do café (Clifford, 1999). O teor de polifenóis livres é pequeno no café verde, aumentando durante a torração desse grão. Este aumento, segundo Trugo & Macrae (1989), está relacionado com a degradação dos ácidos clorogênicos. Com a torração, os polifenóis contribuem de maneira significativa para o aroma e sabor do produto final, sendo considerados responsáveis pela característica de adstringência (Ramirez, 1987). Uma parte dos ácidos clorogênicos se liga as melanoidinas, outra parte sofre hidrólise, isomerização e lactonização, formando as lactonas de ácidos clorogênicos, sendo as principais 3-cafeoilquinico-1,5-lactona e 4-cafeoilquinico-1,5-lactona, alguns dos compostos responsáveis pelo sabor adstringente do café torrado (Farah *et al.*, 2005, Ginz & Enhelhardt, 1995, Illy & Viani, 2005).

O potássio corresponde a 40% do total de minerais presentes no café cru. Os demais encontrados são cálcio, magnésio, fosfato e sulfato (Illy & Viani, 2005).

O teor protéico de grãos de café cru é decorrente dos aminoácidos livres (ácido aspártico, glutâmico, fenilalanina, leucina, isoleucina), peptídeos, albumina e enzimas (α -

galactosidase, malato desidrogenase, fosfatase ácida, peroxidase e polifenoloxidase (Illy & Viani, 2005). Após a torração quase toda a proteína é desnaturada, alguns aminoácidos e peptídeos são comprometidos na Reação de Maillard e participam da formação de melanoidinas, alguns aminoácidos livres como a cisteína e arginina são totalmente destruídas e outros como o ácido glutâmico permanece intacto (Macrae, 1985).

A trigonelina e a cafeína são alcalóides presentes no café cru e apresentam importância para a determinação da característica sensorial final da bebida. A trigonelina é parcialmente degradada com a torração e os principais produtos formados são o ácido nicotínico e compostos voláteis nitrogenados como as piridinas e pirroles (Viani & Horman, 1974) e sua presença está relacionada com características desejáveis para a bebida (Farah *et al.*, 2006). A cafeína é estável ao processo de torração e permanece na bebida. Ela é considerada um estimulante do sistema nervoso central e confere adstringência à bebida.

Os compostos não voláteis presentes no café cru são importantes precursores de aroma e os responsáveis pelas características sensoriais da bebida após a torração.

1.3 Café: Planta, Colheita, Preparo, Beneficiamento e Comercialização

1.3.1 Planta

A planta do café pertence à família *Rubiaceae*, apresenta porte arbustivo, atingindo de 4-6 m de altura para café arábica (Figura 1) e 8-12 m para café robusta. No final da estação de chuva se inicia a formação de brotos que darão origem às flores (Figura 2a), geralmente brancas e perfumadas e autoférteis no caso de café arábica (Carvalho *et al.*, 1988). O café robusta apresenta um sistema de incompatibilidade que previne a autopolinização (Leshermes *et al.*, 1996a). O amadurecimento dos frutos ocorre após 7-8 meses para arábica e 9-11 meses para robusta após a floração. O fruto é denominado cereja (Figura 2b), contém duas sementes envolvidas pelo pericarpo e uma camada doce de mucilagem (Illy & Viani, 2005).



Figura 01 – Pés de café (Fazenda Santa Maria, Piraju/SP)



Figura 2: Árvore do café: a) Floração e b) Cereja no pé

1.3.2 Colheita

A colheita dos frutos pode ser realizada de três maneiras: derriça no chão ou em pano, colheita seletiva a dedo ou colheita mecânica. A colheita de preferência, deve ser realizada quando a maior parte dos frutos já atingiu a maturidade, evitando o mínimo de frutos imaturos (5%), pois estes conferem à bebida final características indesejáveis (Illy & Viani, 2005).

Na colheita por derriça todos os frutos do mesmo galho são colhidos ao mesmo tempo e estes caem em panos localizados nos pés da árvore. A prática de não usar pano e os frutos caírem no chão não é aconselhada, pois o contato com o solo facilita a contaminação com microrganismos que poderão deteriorar os mesmos (Carvalho *et al.*, 1972). A infecção dos frutos por fungos toxigênicos e consequente produção de micotoxinas (compostos tóxicos produzidos por algumas espécies de fungos), devido a sua longa permanência no solo também foi um problema reportado por alguns autores quando

esta prática foi adotada (Taniwaki *et al.*, 2003). Os autores relataram a alta maior infecção do café por espécies toxigênicas em amostras do solo, do terreiro e da estocagem.

Na colheita manual e seletiva, apenas os frutos maduros são colhidos. Esta é uma prática recomendada para aquelas regiões com muita chuva onde a floração é heterogênea. Os frutos colhidos são transportados em cestas e levados para as etapas de secagem. Nas práticas de derriça e colheita seletiva, há uma demanda maior de mão de obra (Illy & Viani, 2005). A maioria das propriedades cafeeiras no Brasil utiliza a técnica da derriça no pano, sem seleção dos frutos.

Na colheita mecânica, técnica utilizada nas grandes propriedades e pelos principais países produtores, como o Brasil, são utilizadas diferentes máquinas para a colheita dos frutos. Pela morfologia da planta, somente há possibilidade da colheita por essa técnica para o café arábica que é considerado monocaule. Para café robusta, que é multicaule, este tipo de colheita não é aplicável.

1.3.3 Pós-colheita

1.3.3.1 Lavagem

Depois de colhido o café deve seguir para as etapas de pós-colheita o mais rápido possível para que não permaneça por muito tempo nas condições de alta umidade, pois como os frutos são ricos em nutrientes encontram-se susceptíveis à contaminação e deterioração por microrganismos.

Os cafés são lavados retirando as impurezas como terra, galhos pedras e, por diferença de densidade são separados de acordo com o grau de maturação. Os cafés mais leves (bóia, passas ou secos) são separados dos mais pesados (cereja e verdes), facilitando a secagem e garantindo a homogeneidade futura do lote.

1.3.3.2 Secagem

Os cafés podem ser preparados de três maneiras: natural, via úmida ou cereja descascado.

No preparo natural, os frutos inteiros com a casca, polpa e mucilagem depois de lavados, são conduzidos para secar diretamente em terreiros ou secadores. No terreiro, o café é espalhado em camadas de 3 a 4 cm de espessura e seca-se ao sol (Figura 3). Durante

esse processo o café deve ser revolvido com frequência para garantir a secagem homogênea e evitar pontos com alta umidade. O tempo de secagem neste caso é diretamente dependente das condições ambientais e pode durar alguns dias (8-10 dias). No final da secagem os grãos devem atingir teores de umidade que não ultrapasse 11 a 12% (b.u) para que possam ser estocados, pois acima destes valores são observadas mudanças na cor dos grãos e sabor da bebida, além de propiciar o crescimento de microrganismos (Rigitano *et al.*, 1964, Godino *et al.*, 2000, Vilela *et al.*, 2000, Illy & Viani, 2005). Para acelerar o processo de secagem é recomendado o uso de secadores mecânicos, podendo ser de três tipos: a) Cilindros rotativos horizontais, insuflados com ar aquecido vindo de uma fomalha. Neste caso a temperatura da massa de café não deve ultrapassar 45°C para evitar o aparecimento dos defeitos preto-verde (Teixeira *et al.*, 1982); b) Secadores verticais com câmaras de repouso, que já exigem uma pré-secagem. Consistem de um grande depósito metálico, tendo na parte superior a câmara de repouso e o café fluindo para baixo onde sencontra a câmara de secagem e circulação de ar quente vindo da fomalha. O café desce até a base do elevador que o leva novamente para o alto até a câmara de repouso, e assim sucessivamente até completar a secagem. Neste caso deve ser realizado o controle da temperatura do ar de secagem. c) Secadores de barcaças de leito fixo: construídos em alvenaria e composto de na parte superior por uma chapa metálica perfurada e na parte de baixo uma fomalha que insufla ar quente com o auxílio de um ventilador. Neste caso a camada de café não deve ultrapassar 50 cm de altura, a temperatura da massa não deve ultrapassar 50°C e há a necessidade do revolvimento constante do café (Nunes *et al.*, 2005).



Figura 3 – Secagem natural em terreiro (Fazenda Tijuco Preto, Piraju/SP)

Na via úmida, após a lavagem, o café passa por um despoldador onde por pressão, os frutos verdes são separados dos maduros. Estes últimos são levados para o segundo elemento despoldador, que consiste de dois cilindros que pressionam as cerejas maduras, separando a polpa dos grãos envolvidos com o pergaminho. Para a retirada da mucilagem (camada fina de 0,5-2 mm de espessura, composta de pectina e açúcar), o café passa pelo processo denominado de degomagem. Nesta etapa o café permanece por 12 a 36 horas em tanques à temperatura ambiente sob a ação dos microrganismos que vão ser os responsáveis pela degradação da mucilagem. Este processo deve ser cuidadosamente controlado para evitar a formação de odor e sabor desagradáveis, como alcoólicos e fermentados. O café é então lavado novamente e segue para a etapa de secagem em terreiro ou secador (Toledo & Barboza, 1998, Illy & Viani, 2005).

Outro processo de preparo de café, intermediário aos dois descritos anteriormente, é denominado cereja descascado (Figura 4). Neste, somente a polpa dos frutos maduros é retirada sem passar pelo processo de fermentação. O café é seco com a mucilagem. Este processo apresenta algumas vantagens em relação aos outros, como a economia de energia durante a secagem, pois os grãos sem a casca são menores, ocupam menos espaço no terreiro e/ou no secador; há menor gasto de água e eliminação de matéria orgânica ao meio ambiente, pois a etapa de fermentação é eliminada e confere características sensoriais desejáveis à bebida (Toledo & Barboza, 1998; Silva, *et al.*, 2004, Illy & Viani, 2005).



Figura 4 – Secagem utilizando o preparo cereja descascado em terreiro suspenso (Fazenda Santa Maria, Piraju/SP)

1.3.3.3 Beneficiamento

O café seco é estocado em tulhas ou silos em ambiente seco para evitar a reumidificação dos grãos, onde permanecerão até sua comercialização. Nesta etapa o café pode estar na forma de coco (via seca) ou em pergaminho (via úmida) e deverão ser beneficiados antes da comercialização, que é um processo de retirada da casca, mucilagem, pergaminho e da película prateada. Este processo é realizado em descascador, com rotores cilíndricos ajustados para a retirada completa da casca sem danos nos grãos. Estes são então classificados por tamanho e presença de defeitos, utilizando diferentes peneiras com diferentes formas e tamanhos. Em alguns casos é realizada a seleção eletrônica prévia em equipamentos com fotossensores que separam os grãos defeituosos.

Os grãos nesta fase encontram-se prontos para serem comercializados e são então submetidos a uma última avaliação para a definição do seu valor final.

No Brasil é seguida a Classificação por Peneiras, que separa os grãos pelo tamanho e forma, de acordo com a utilização de peneiras padrão; por Tipo, que leva em conta a presença de defeitos em uma amostra de 300 g; e por Bebida, ao qual é avaliada a qualidade sensorial da bebida por profissionais treinados, através da prova de xícara.

As Tabelas 4, 5 e 6 apresentam os diferentes parâmetros avaliados na classificação geral dos grãos de café, por tamanho, presença de defeitos e características sensoriais da bebida respectivamente.

Tabela 4 – Classificação por peneira

Classificação	Peneiras
Chato grosso	17 a 20
Chato médio	15 e 16
Chato miúdo (chatinho)	12 e 14
Moca graúdo	11 a 13
Moca médio	10
Moca miúdo (moquinha)	8 e 9

(Fonte: Teixeira, 1970)

Tabela 5 – Classificação por tipo de defeitos e possíveis causas

Defeitos	Pontuação	Causas
Preto	1 preto = 1 defeito	Ataque de fungos devido á colheita atrasada e permanência no solo
Ardido	2 ardidos = 1 defeito	Bolores em frutos colhido verdes ou devido á permanência no solo
Verde	5 verdes = 1 defeito	Colheita de frutos verdes
Concha	3 conchas = 1 defeito	Fatores genéticos e climáticos
Chocho	5 chochos = 1 defeito	Fatores genéticos, climáticos e carência nutricional
Malgranado	5 malgranados = 1 defeito	Fatores fisiológicos, climáticos e carência nutricional
Brocado	2 a 5 brocados = 1 defeito	Ataque da broca do café
Quebrado	5 quebrados = 1 defeito	Seca inadequada e má regulagem do descascador
Coco	1 coco = 1 defeito	Má regulagem do descascador
Marinheiro	2 marinheiros = 1 defeito	Má regulagem do descascador
Paus, pedras, torrões e cascas	1 pedra, pau ou torrão = 1 a 5 defeitos	Colheita por derriça no chão e abanação mal feita

(Fonte: Teixeira, 1970)

Tabela 6 – Classificação da bebida

Classificação	Características
Estritamente mole	Todos os requisitos da bebida mole mais acentuados
Mole	Sabor agradável, brando e doce
Apenas mole	Inferior aos anteriores, mas sem adstringência
Dura	Sabor adstringente e áspero, mas sem sabores estranhos
Riado	Sabor químico, iodofórmio
Rio	Aroma e sabor iodofórmio mais acentuado que riado
Rio Zona	Aroma e sabor iodofórmio, mas acentuado que rio

(Fonte: Teixeira, 1970)

Atualmente não existe uma padronização internacional para a avaliação sensorial da bebida e cada país utiliza o seu método. Críticas existem quanto a este procedimento principalmente devido às diferenças existentes entre as condições de preparo da bebida do país exportador daqueles realizados pelos consumidores finais. Desta maneira outras técnicas foram desenvolvidas com a finalidade de estabelecer uma terminologia sensorial descritiva padrão com terminologias mais próximas à dos consumidores, como a Análise Descritiva Quantitativa (ADQ), utilizando painéis treinados (Meilgaard *et al.*, 1987; Stone & Sidel, 1985) e que foram recomendados pela Organização Internacional de Café. Neste método vários atributos relacionados com o aroma (borracha, caramelo, chocolate, floral, queimado, tabaco, dentre outros), gosto (amargo, azedo, doce e salgado) e a sensação bucal (adstringência e corpo) são avaliados pela equipe.

1.3.3.4 Estocagem e transporte

Durante a estocagem é necessário que as condições de armazenamento sejam adequadas para garantir as características originais do café e principalmente evitar a reabsorção de umidade pelos grãos. Os parâmetros críticos neste caso são temperatura e umidade relativa do ambiente. O local deve ser bem ventilado, em temperatura próxima de 20°C, umidade relativa não superior a 60%, limpo e organizado (Illy & Viani, 2005).

1.4 Microrganismos no café e influência na qualidade da bebida

1.4.1 Interação microbiana e os fungos no café cru

O café é um produto agrícola cuja qualidade final é resultado da contribuição de vários fatores, tais como, a genética da planta, as condições climáticas, tipo de colheita, adubação, maturação, cuidados na colheita, secagem, beneficiamento, armazenamento, transporte e torração. Dentre estes a população microbiana presente e as condições de que fizeram uma ou outra espécie prevalecer estão entre os fatores que afetam a qualidade dos grãos e da bebida.

Ao longo da cadeia produtiva do café ocorre uma variação dos microrganismos presentes, em função principalmente do teor de umidade dos grãos, que sofre um decréscimo desde a etapa do campo, colheita, secagem, beneficiamento até o

armazenamento. Os microrganismos presentes constituem basicamente de patógenos de plantas, contaminantes da superfície do fruto, no solo e no suco da polpa. Considerando os vários substratos que o grão de café apresenta (casca, polpa e semente) é possível o desenvolvimento de uma microbiota diversificada e complexa, envolvendo, fungos filamentosos, principalmente espécies de *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, leveduras, bactérias lácticas (*Leuconostoc* e *Lactobacillus*) e bactérias pectolíticas (*Erwinia*, *Bacillus*). Estes microrganismos sofrem tipos de interações, que podem ser tanto benéficas quanto prejudiciais. Em muitos casos, as populações interagem e podem cooperar entre si, otimizando suas capacidades nutricionais, em que os produtos metabólicos finais podem servir como nutrientes para outras (Gonçalves, 2008). Em outros casos a produção de metabólitos secundários pode vir a apresentar, além de um risco à saúde do consumidor, no caso por exemplo da produção de micotoxinas, um fator de inibição das demais espécies de microrganismos presentes, impedindo ou retardando o seu crescimento.

Os primeiros trabalhos publicados correlacionando a presença de microrganismos com a qualidade do café produzido no Brasil datam de 1936 (Krug, 1940), quando se detectou a presença de micélio do fungo *Fusarium* sp. numa amostra de grãos classificados como “ardidos”.

Estudos realizados posteriormente demonstraram que vários bolores, entre eles espécies de *Fusarium*, *Cladosporium*, *Colletotrichium*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Aspergillus* e *Gliocladium* incidem sobre os frutos do cafeeiro no terreiro, acelerando o processo de fermentação dos frutos. As principais injúrias ou danos pré-colheita são: infecção dos frutos, ainda na planta, por microrganismos, ataque de insetos no fruto, o que facilita a infecção microbiana e o desenvolvimento de microrganismos do solo nos grãos caídos (Carvalho *et al.*, 1997).

A presença dos defeitos preto, ardido, stinker e “rio” em um lote de grãos de café está diretamente relacionada com a contaminação fúngica conseqüente de más práticas agrícolas como a permanência por tempo prolongado dos grãos no pé (chamados grãos passas) e em contato com o solo (café de varrição, derriça no solo), causando a contaminação dos grãos por espécies de *Aspergillus*, *Penicillium* e outros. É pelo excesso de fermentação, resultando na alta concentração de compostos sulfurados, ésteres e ácidos de cadeia curta produzidos por bactérias e leveduras (Illy & Viani, 2005).

Taniwaki *et al.* (2006) compararam a micobiota de grãos defeituosos (preto, preto-verde, ardido e verde) e sadios de cafés arábica e robusta. Neste trabalho verificou-se uma correlação positiva entre a presença de defeitos e o nível de infecção fúngica. Amostras com grãos defeituosos apresentaram um aumento no nível de infecção fúngica de 18 para 33% no café arábica e de 92 para 98% no café robusta. Analisando os defeitos separadamente, as maiores porcentagens de infecção foram obtidas nos defeitos ardido (94%), preto (96%), preto-verde (80%) e verde (72%) e as principais espécies fúngicas isoladas foram: *Aspergillus niger*, *Aspergillus westerdjikiae* e *Eurotium chevalieri*.

A demora no processamento após a colheita também é um fator que compromete a qualidade dos grãos. As cerejas recém colhidas, ricas em nutrientes e umidade, devem ser encaminhadas para o processamento o mais rápido possível, de preferência no mesmo dia da colheita, para evitar a fermentação dos grãos e risco de contaminação por bolores (Illy & Viani, 2005).

Durante a secagem dos grãos no terreiro, o revolvimento freqüente deve ser adotado para com a finalidade de garantir a secagem homogênea dos grãos até teores seguros de umidade de 11-12%. Dentro destes limites não haverá crescimento de bolores e a qualidade dos grãos estará garantida. Durante a estocagem dos grãos os parâmetros críticos são temperatura, tempo e o mais importante, a umidade relativa do ambiente. Valores próximos de 20°C e umidade relativa não superior a 60% são recomendadas para evitar o crescimento fúngico (Illy & Viani, 2005).

A presença de algumas espécies de fungos filamentosos além de comprometer a qualidade sensorial da bebida final, assunto discutido mais em detalhes nos próximos itens, vem sendo relacionada nos últimos anos também com o aspecto de saúde pública. Algumas espécies são produtoras de micotoxinas, metabólitos secundários 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 domésticos (Bullerman *et al.*, 1984; Biancardi & Riberzani, 1996). As micotoxinas, ao contrário dos microrganismos que as produzem, são termorresistentes e podem permanecer nos grãos e na bebida mesmo após a torração e preparo. A ocratoxina A (OTA) é uma micotoxina produzida por fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, que normalmente contaminam o café e outros cereais (Levi *et al.*, 1974; Micco *et al.*, 1989; Van der Stegen *et al.*, 1997). Dentre os fungos ocratoxigênicos, *A. ochraceus* (atualmente identificado como *A. westerdjikiae*), *A.*

carbonarius e *A niger* foram encontrados em amostras de cafés em várias partes do mundo (Urbano *et al.*, 2001; Joosten *et al.*, 2001; Taniwaki *et al.*, 2003; Suárez-Quiroz *et al.*, 2004).

1.4.2 Compostos voláteis dos fungos

Os fungos são conhecidos como produtores de uma larga quantidade de metabólitos voláteis (Larsen & Frisvad, 1995a) formados durante o seu metabolismo primário e secundário a partir de uma grande variedade de compostos como por exemplos acetatos, aminoácidos, ácidos carboxílicos e acetoácidos (Jelen & Wasowicz, 1998). A via metabólica para a produção dos compostos voláteis é bastante complexa e está inter-relacionada com as vias de produção de compostos não voláteis e micotoxinas. A Figura 5 apresenta de forma esquemática as vias metabólicas para a produção de compostos voláteis, não voláteis e a produção de micotoxinas.

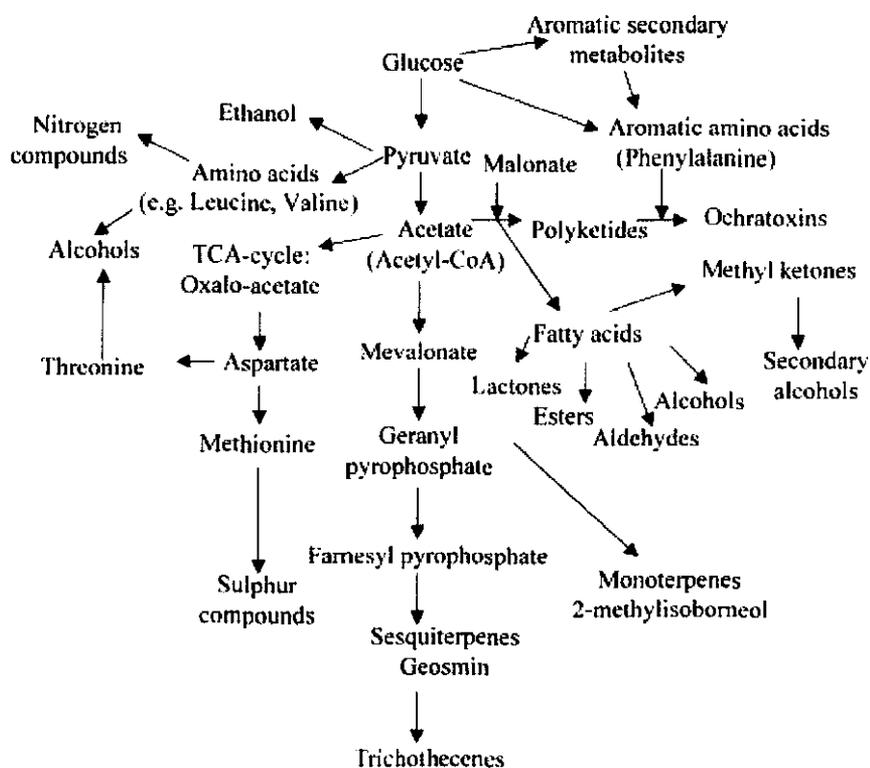


Figura 5 - Vias metabólicas envolvidas na produção de diferentes metabólitos secundários (Fonte: Magan & Evans, 2000).

Compostos voláteis importantes são formados a partir da quebra de lipídios pelas lipases e oxidação de ácidos graxos, como as metilcetonas, obtidas através da descarboxilação de acetoácidos, e álcoois e ésteres. A via do ácido mevalônico resulta em uma variedade de terpenos como a geosmina e 2-metilisoborneol. O dimetilssulfeto é produzido através da metionina (Magan & Evans, 2000).

Estes metabólitos têm sido estudados para alguns propósitos, dentre eles, como indicadores de deterioração fúngica em alimentos e rações animais através da identificação de “off-flavours” (Karahadian *et al.*, 1985; Borjesson 1993; Hocking *et al.*, 1998); para detecção da presença de espécies fúngicas em cereais e materiais de construção (Kaminski *et al.*, 1974; Borjesson *et al.*, 1989); para a detecção de fungos que são prejudiciais à saúde, presentes em ambientes fechados, obras e construções e (Samson, 1985; Flannigan *et al.*, 1991); para avaliação dos efeitos dos metabólitos voláteis em fungos sobre outros microrganismos e insetos (Barr, 1976; Lanciotti & Guerzoni, 1993); para a produção de

sabores naturais para uso como aditivos de alimentos e rações (Guichard *et al.*, 1991; Janssens, 1992) e finalmente como ferramenta para identificação entre espécies de fungos (Larsen, 1998).

Em termos quantitativos vários são os métodos utilizados para a avaliação da qualidade microbiológica e a presença de fungos nos alimentos, dentre eles destacam-se a contagem padrão em placas e a quantificação da biomassa fúngica (ergosterol e quitina) (Pitt & Hocking, 1997), procedimentos que demandam certo trabalho e tempo. Contudo, para uma avaliação qualitativa, a identificação dos metabólitos fúngicos presentes pode ser uma ferramenta bastante útil para avaliar o grau de contaminação de alimentos por fungos. Vários países utilizam a detecção de off-odors em cereais e grãos, pela avaliação sensorial de pessoas treinadas ou por técnicas mais sofisticadas como o nariz eletrônico (Borjesson *et al.*, 1996; Keshri *et al.*, 2002), como ferramenta para avaliar a qualidade desses alimentos. Borjesson *et al.* (1996) analisando amostras de trigo, cevada e aveia, obtiveram boa correlação na identificação de aromas bons e ruins através da técnica do nariz eletrônico, distinguindo 4 classes de odores: terra/mofado; ácido/azedo; queimado e normal.

Há um grande interesse na substituição do homem para a avaliação de odores de grãos por equipamentos para a detecção de metabólitos voláteis de fungos, pois há o conhecimento de que a inalação de esporos fúngicos é prejudicial à saúde e pode causar danos aos órgãos respiratórios de humanos (Larsen *et al.*, 1998). Diversos compostos voláteis orgânicos (MVOC) produzidos por fungos já foram identificados em ambientes internos e foram considerados prejudiciais à saúde, causando problemas como irritação dos olhos, do nariz e garganta, letargia e dores de cabeça (Bornehag *et al.*, 2001; Husman, 1996).

A produção de metabólitos voláteis de fungos em diferentes meios tem sido estudada por vários autores. Os compostos comumente identificados pertencem ao grupo dos álcoois (2-metil-1-propanol, 3-metil-1-butanol, 1-octeno-3-ol), cetonas (3-octanona), ésters (etil acetato), furanos (3-metil-furano), monoterpenos (2-metil-isoborneol) e sesquiterpenos (geosmina) (Jacobsen & Hinrichsen, 1997; Borjesson *et al.*, 1992; Jelen *et al.*, 1997a; Larsen & Frisvad 1995b).

Borjesson *et al.* (1993) identificaram voláteis de espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* com odor desagradável de mofo quando cultivados em ágar de aveia, dentre eles o dimetil sulfito, 1-octen-3-ol, 2-metilisoborneol com odor de terra e a geosmina e o 1-

metox-3metilbenzeno e metilfenol com odor desagradável. A descoberta de que várias espécies de *Penicillium* são capazes de produzir metabólitos que causam aromas desagradáveis, como estireno, 2-metil-isoborneol e geosmina, mostra a potencialidade destas espécies como um deteriorador da qualidade dos alimentos, do ponto de vista sensorial. Por outro lado, as espécies de *Penicillium* podem ser usadas para a produção de aromas naturais, como por exemplo *Penicillium griseofulvum* na produção de aromas de frutas (Larsen, 1998; Larsen & Frisvad, 1995b).

Numa pesquisa realizada por Larsen & Frisvad (1995b,c), foi verificado que, em meio ágar extrato de levedura-sacarose (YES), a geosmina foi produzida por: *Penicillium aethiopicum*, *Penicillium clavigerum*, *Penicillium echinulatum*, *Penicillium formosanum* e *Penicillium roqueforti* var. *carneum*; o 2-metil-isoborneol foi produzida por: *Penicillium camembertii* e *Penicillium commune*. Geosmina e 2-metil-isoborneol foram produzidos por *Penicillium crustosum* e *Penicillium discolor*. De acordo com estes autores, geosmina produziu um odor de terra enquanto 2-metil-isoborneol produziu um odor de mofo. *Penicillium aethiopicum* e *Penicillium clavigerum* apresentaram um odor de fruta devido a produção de ésteres, além de um odor de terra. Da mesma forma *P. roqueforti* var. *carneum* produziu uma quantidade extrema de odor de álcool como isopentanol. *P. crustosum* produziu um odor de podridão como dimetilbisulfeto que, junto com o estireno, encobriu os outros odores produzidos por esta espécie. Os resultados do olfatômetro demonstraram que na maioria das vezes, é a combinação de diferentes tipos de odores que originam o aroma final.

Em termos mais específicos, vários autores têm utilizado a presença destes compostos voláteis fúngicos como uma ferramenta para a identificação entre espécies de fungos, considerando que alguns voláteis são exclusivos para algumas espécies. Como por exemplo, o thujopseno que até o momento foi relatado apenas para espécies de *Aspergillus*. *Aspergillus candidus* produz um monoterpeneo que não foi detectado em nenhuma outra espécie (Magan & Evans, 2000). Larsen & Frisvad (1995b,c) estudando espécies de *Penicillium* terveticiliados, avaliaram o perfil de metabólitos voláteis fúngicos comparando com a identificação quimiotaxonômica realizada pelos mesmos autores previamente e obtiveram boa correlação. Keshri *et al.* (1998) estudando espécies de fungos xerofílicos, foram capazes de diferenciar três espécies de *Eurotium* sp., *Penicillium* sp. e *Wallemia sebi* através do perfil dos metabólitos voláteis produzidos em meio de cultura.

A produção de metabólitos voláteis pode variar de acordo com o substrato, temperatura e tempo de incubação. Vários estudos *in vitro* foram realizados utilizando o substrato à base de cereais, principalmente, trigo, milho e cevada e meio de cultura. Wurzenberger & Grosch (1982) observaram que a produção de 1-octeno-3-ol foi maior durante a quebra de lipídeos e a produção deste metabólito variou de acordo com o conteúdo de lipídeos no substrato. Sunesson *et al.* (1995) avaliando os compostos voláteis de 5 espécies fúngicas (*Aspergillus versicolor*, *Penicillium commune*, *Cladosporium cladosporioides*, *Paecilomyces variotii* e *Phialophora fastigiata*) em Ágar Extrato de Malte e Ágar Dicloran 18% Glicerol (DG18), detectaram a produção de diferentes compostos nos dois meios de cultura. Os autores citam a alta produção de etilacetato e compostos derivados em Ágar Extrato de Malte (MEA) por *Penicillium commune* e a ausência dos mesmos em DG18 e a predominância de mono e sesquiterpenos neste meio. E sugerem a causa destas diferenças principalmente devido aos seus diferentes teores de atividade de água. A geosmina foi produzida nos dois meios testados. Contudo Borjesson *et al.* (1992) avaliando os voláteis produzidos por espécies de *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp. em meios contendo trigo e aveia não detectaram diferenças nos compostos produzidos.

Além das espécies fúngicas e da composição do substrato, a produção dos metabólitos voláteis pode ser influenciada pelo crescimento fúngico. Hubbal & Collins (1978) encontraram que os voláteis terpenos foram produzidos em diferentes proporções, dependendo do estágio de crescimento de *Ceratocystis variispora* e esta variação foi devido à queda metabólica dos terpenos.

1.5 Análise dos compostos voláteis de fungos

Vários são os métodos utilizados para a captura dos voláteis produzidos por fungos, dentre estes a técnica de “headspace” utilizando a seringa “gas tight” e injetando diretamente no cromatógrafo gasoso (Keshri *et al.*, 1996 e 2002); a utilização de polímeros (Tenax ou Chromosorb) que capturam os voláteis (Larsen & Frisvad, 1994, 1995; Borjesson *et al.*, 1990; Sunesson *et al.*, 1995) e estes são posteriormente dessorvidos termicamente ou por solventes; ou a extração por destilação de vapor seguido da extração líquido-líquido e concentração do extrato (Larsen & Frisvad, 1995); e finalmente a microextração em fase sólida (SPME), na qual são utilizadas microfibras revestidas com

material a base de poliacrilato e polimetilsiloxano para a captura dos voláteis, associada à dessorção térmica em cromatógrafo gasoso (Nilsson *et al.*, 1996; Schnurer *et al.*, 1999; Jelen, 2003).

A técnica do “Headspace” associada à Microextração em Fase Sólida tem sido largamente utilizada para a identificação de aromas e “off-flavours” em alimentos, bebidas, indústria farmacêutica e para a captura de voláteis de diferentes materiais. É uma técnica simples, não existe a necessidade de uso de solventes e é possível a obtenção do analito praticamente puro, pois ele é concentrado na fibra e, além disso, apresenta alta sensibilidade. Nesta técnica a amostra sólida é inserida no frasco e selada. O recipiente com a amostra é aquecido para o auxílio na liberação dos voláteis. Após o equilíbrio ser estabelecido entre a amostra e o vapor do espaço livre, a fibra é inserida e exposta ao vapor, sem entrar em contato com a amostra e assim os voláteis são absorvidos no revestimento da fibra (Wang, 1997). A Figura 6 apresenta de forma esquemática a técnica Headspace-SPME.

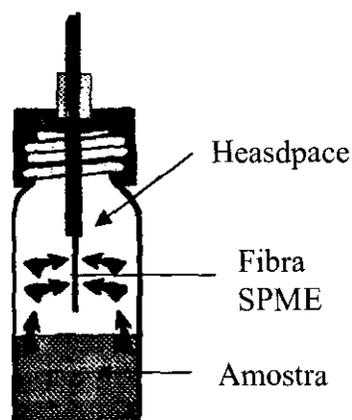


Figura 6 - Esquema da técnica Headspace-SPME (Wang, 1997)

A técnica de Headspace-SPME tem sido utilizada para a análise de compostos orgânicos voláteis produzidos por fungos, outros tipos de materiais como a madeira, ambientes internos (Fiedler *et al.*, 2001; Wady *et al.*, 2003), alimentos e bebidas, como vinho, frutas e café (De Maria *et al.*, 1996; Amstalden *et al.*, 2001; Sanz *et al.*, 2001; Sanz, *et al.*, 2002; Akiyama *et al.*, 2003; Bicchi *et al.*, 2002; Alves & Franco, 2003; Ryan *et al.*, 2004; Zambonin *et al.*, 2005; Riu *et al.*, 2002; Penton 2004).

Para a identificação de compostos voláteis não conhecidos em uma amostra é recomendada a utilização do Índice de Retenção de Kovats, calculado com os dados do tempo de retenção do composto de interesse e os tempos de retenção conhecidos de uma sequência de alcanos de cadeia normal. Este índice é dependente das condições de teste utilizado, principalmente o tipo da coluna cromatográfica e é calculado da seguinte forma (Harris, 1987):

$$I = 100 \left[n + (N - n) \frac{\log t'_r(x) - \log t'_r(n)}{\log t'_r(N) - \log t'_r(n)} \right]$$

n = número de átomos de carbono do menor alcano

N = número de átomos de carbono do maior alcano

$t'_r(n)$ = tempo de retenção do menor alcano

$t'_r(N)$ = tempo de retenção do maior alcano

1.6 Compostos voláteis fúngicos em relação à bebida

A presença dos fungos nos grãos é resultante da adoção de uma série de práticas agrícolas não adequadas, como a utilização de grãos que permaneceram tempo prolongado em contato com solo ou uma secagem ineficiente, e este fato interfere negativamente na qualidade sensorial da bebida.

Poucos trabalhos relacionando diretamente à presença dos fungos nos grãos com a qualidade sensorial da bebida já foram relatados.

Carvalho *et al.* (1989) estudando a relação entre a microbiota e as características sensoriais da bebida concluíram que as amostras de café classificadas como bebida mole e dura apresentaram baixa infecção pelas espécies *Fusarium roseum*, *Aspergillus ochraceus* e *Aspergillus flavus* e os cafés classificados como de bebida riada e rio, apresentaram índices elevados por espécies de *Fusarium* spp. e *Penicillium* spp. Segundo Alves & Castro (1993) os fungos pertencentes aos gêneros *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus* e *Cladosporium* são comumente isolados de grãos, independente da qualidade da bebida. De acordo com os mesmos autores, *Fusarium* foi o gênero mais frequente no café cereja, *Apergillus* em cafés classificados como rio e riado, *Aspergillus glaucus* em cafés de bebida muito ruim e *Cladosporium* em cafés classificados como de melhor bebida.

O termo “riado” foi primeiramente usado nos cafés provenientes do Estado do Rio de Janeiro. A análise sensorial descreve este aroma como medicinal, fenólico e como

iodina (Spadone *et al.*, 1990). Cafés de outras regiões do Brasil bem como de outras partes do mundo também podem apresentar esta característica. Os compostos responsáveis pelo aroma “riado” foram caracterizados por diversos autores (Spadone *et al.*, 1990; Spadone & Liardon, 1988) e o ácido tricloroanisol (TCA) foi um importante contribuidor do aroma “riado”. Embora o café “riado” seja conhecido por gerações, o conhecimento da origem e a causa do aroma ainda são limitados. Amorim *et al.* (1979) relataram este aroma como consequência da ação de polifenol oxidase liberada nas trocas estruturais da membrana celular do grão. Mais tarde investigações microscópicas e microbiológicas revelaram que os grãos “riado” estavam bem infectados com fungos do gênero *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Rhizopus* e com bactérias lácticas, resultando numa degradação da estrutura celular (Dentan, 1988; Vanos, 1988).

De acordo com Spadone *et al.* (1990) cerca de 20% da produção de café do Brasil apresenta o aroma “riado”. TCA foi encontrado em todas as amostras “riadas”, em concentrações de 1 a 100 µg/kg. Após a torração, mais de 50% do TCA ainda estava presente no café.

Vários outros alimentos como: ovos, carne resfriada, farinha, arroz empacotado, cacau em pó, vinho e outros podem apresentar o TCA (Spadone *et al.*, 1990). A ocorrência de TCA parece estar relacionada a alguma forma de contaminação industrial ex.: cloração da água e uso de pesticida ou fungicida clorado. Estes contaminantes primários passariam por vários processos de degradações químicas e microbiológicas, levando à formação de 2,4,6-triclorofenol (TCP). Foi demonstrado por Curtis *et al.* (1974) e Gee & Peel (1974) que inúmeros isolados fúngicos são capazes de realizar esta conversão. No café “riado”, TCP provavelmente é o precursor direto de TCA. Esta hipótese é devido à ocorrência simultânea dos dois compostos em todas as amostras investigadas e pelo fato dos bolores isolados dos grãos de café “riado” serem capazes de converter clorofenóis em cloroanisóis correspondentes. Alternativamente, o TCP pode ser um metabólito produzido naturalmente por fungos que infectam o café. De fato, alguns fungos são reconhecidos como capazes de produzir metabólitos clorados (Spadone *et al.*, 1990).

Cantergiani *et al.*, (2001) estudando compostos voláteis de cafés do México através da técnica de olfatométrica e CG-MS, identificaram 6 compostos causadores de “off-flavour”, geosmina, 2-metilisoborneol, 2,4,6 tricloroanisole e 3 derivados das metoxipirazinas. Todos eles contribuíram para o odor de terra. Os autores não relacionaram

diretamente os defeitos com a presença dos fungos, mas sugeriram que a causa do problema poderia estar relacionado com falhas na secagem dos grãos.

Outros “off-flavours” como o 2-metilbutirato, etil-3-metilbutirato e o ácido etil éster ciclohexanoico, têm sido relacionados com a fermentação não controlada dos grãos de café (Bade-Wegner *et al.*, 1997).

2. OBJETIVOS

Os objetivos do presente trabalho foram:

- Avaliar a presença de fungos em grãos de café cru de duas regiões produtoras do Brasil, Cerrado Mineiro/MG e Piraju/SP, comparando a microbiota presente;

- Identificar as espécies fúngicas presentes nas diferentes etapas de processamento do café: colheita, preparo, secagem e estocagem. Foram avaliados os frutos (cereja), grãos do solo (varreção), bóia (secos e passas do pé) e verde (imaturos);

- Avaliar os compostos voláteis das principais espécies fúngicas isoladas dos grãos em estudo, cultivadas em meio de cultura e em grãos inoculados;

- Realizar análise sensorial da bebida em todas as amostras de grãos coletadas, bem como dos grãos inoculados com os fungos;

- Correlacionar os resultados dos compostos voláteis produzidos pelos fungos no meio de cultura e no café inoculado, comparando com os resultados da análise sensorial da bebida.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Café

Um total de 41 amostras de café cru foi coletado de duas regiões produtoras do Brasil: Patrocínio no Cerrado Mineiro (19) e Piraju (22) em São Paulo. Aproximadamente 2 Kg de cada amostra foram coletados para as análises. Grãos obtidos a partir das diferentes etapas do processamento foram avaliados: cereja (fruto) e varreção (frutos, secos e passas do chão), bóia e verde (do lavador) e grãos do terreiro e da estocagem. Foram avaliados também dois tipos de preparo do café: natural e cereja descascado.

3.2 Análise Micológica

As análises micológicas foram realizadas no Laboratório de Microbiologia do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL) situado em Campinas/SP em parcerias com a New South Wales University (Department of Food Science and Technology) na Austrália e Technical University of Denmark (Department of Systems Biology-Center for Microbial Biotechnology) na Dinamarca.

3.2.1 Isolamento dos fungos do café

A superfície dos grãos de cafés foi desinfetada através da imersão em solução de hipoclorito de sódio 0,4% durante 1 minuto. Em seguida 10 grãos foram plaqueados em 5 placas de Petri contendo Ágar Dicloran Glicerol 18% (DG18) com cloranfenicol, totalizando 50 grãos. As placas foram incubadas à 25°C por 5 a 7 dias. Os resultados foram expressos em percentagem de grãos infectados internamente, conforme a metodologia de Pitt & Hocking (1997).

3.2.2 Identificação dos fungos

Após a avaliação global da infecção fúngica, cada cepa foi isolada em meio Ágar Extrato de Malte (MEA) e mantida a 25°C por 5 dias. Para a identificação de espécies de *Penicillium* spp., os isolados foram inoculados em três pontos no meio Ágar Czapek

Extrato de Levedura (CYA) nas temperaturas de 5, 25 e 37°C e também em MEA à 25°C por 7 dias, conforme a chave de identificação de Pitt (1988). Para a identificação das espécies de *Aspergillus* spp. os isolados foram também inoculados nos meios CYA, nas temperaturas de 25, 37 e 42°C e MEA a 25°C por 7 dias. Neste caso a identificação foi realizada de acordo com a chave de Klich & Pitt (1988). As demais espécies foram identificadas de acordo com Pitt & Hocking (1997), Samsom *et al.* (2006) e outras chaves de identificação. Para a identificação das espécies foram levadas em consideração a presença ou ausência de crescimento, o diâmetro das colônias e as características macro e microscopias presentes após o tempo de incubação.

A confirmação da identidade dos isolados de *Penicillium* spp. e *Aspergillus* spp., utilizadas para os estudos dos metabólitos fúngicos, foram realizadas pelos pesquisadores John I. Pitt (Food Science And Technology-University of New South Wales) e Jens C. Frisvad (Department of Systems Biology-Center for Microbial Biotechnology, Technical University of Denmark) em visita ao Laboratório de Microbiologia do ITAL, no período de desenvolvimento do projeto e posteriormente em seus próprios laboratórios. A confirmação da identidade foi realizada utilizando a taxonomia clássica (Pitt, 1988) seguindo as chaves de classificação para *Aspergillus* e *Penicillium* e a análise de metabólitos secundários (compostos químicos produzidos por fungos, incluindo antibióticos e micotoxinas, utilizados como para a identificação entre as espécies). A metodologia utilizada encontra-se descrita no item 3.6.1.2.

3.3 Atividade de água e umidade

A atividade de água e o teor de umidade foram determinadas diretamente nos equipamentos Aqualab 3TE (Decagon-EUA) e Medidor de Umidade Digital Gehaka G600 (Gehaka, Brasil), respectivamente. As análises foram realizadas em triplicata.

3.4 Análise sensorial da bebida

3.4.1 Preparo da bebida

O café cru foi torrado a 220°C por 5 a 6 minutos em torrador marca Probat tipo BRZ4, e submetido a três testes de degustação: infuso, diluído de *espresso* e *espresso*, conforme metodologia descrita em Illy&Viani (2005). Para o teste de infuso, 10 g de pó foi adicionado de 100 mL de água à 90°C e para o teste de *espresso* e diluído de *espresso*, a bebida foi preparada com 13 g do pó e 50 mL água a 90°C sob pressão (9bar), com tempo de percolação de 30 segundos e diluição do *espresso* (1:2) com água a temperatura 80°C respectivamente, seguido da avaliação sensorial. A máquina para o preparo do *espresso* foi a La Marzocco com 2 grupos (modelo 2G-EE).

3.4.2 Avaliação sensorial

A bebida foi avaliada pela equipe treinada da Assicafé, empresa responsável pela avaliação dos cafés exportados para a empresa italiana Illycaffè. A equipe treinada foi composta de 5 provadores. Os atributos avaliados na prova de *espresso* foram: corpo, aroma, acidez, amargor, doçura e adstringência. A avaliação final da bebida foi descrita como positiva ou negativa, após a decisão consensual da equipe. As amostras foram degustadas sem os defeitos visíveis. Em adição, foi também avaliada a presença de sabores e aromas positivos como caramelo, chocolate, frutado e floral; e caracteres negativos incluindo imaturo, fermentado, madeira, ranço, mofado, riado, rio, fumaça entre outros.

A Figura 7 apresenta a equipe de provadores treinados da Assicafé durante a análise sensorial.



Figura 7 - Análise sensorial realizada pela equipe da Assicafé, utilizando o método do espresso.

3.5 Análise dos compostos voláteis

Para a análise dos compostos voláteis, tanto dos grãos inoculados quanto dos fungos no meio de cultura, foi otimizada a metodologia de extração e identificação descrita nos itens a seguir:

3.5.1 Extração dos voláteis

Para a captura dos voláteis foi utilizada a fibra SPME DVB/Carboxen™/PDMS da Supelco.

Nesta etapa, foram avaliadas: a quantidade de amostra (0,5; 1,0 e 2,0 g), a temperatura de extração (50, 65 e 70°C) e o tempo de extração (15, 30 e 60min). A amostra foi pesada em frasco de 50 mL lacrada com septo de silicone e mantida em banho nas diferentes temperaturas e tempos testados. A exposição da fibra aos voláteis foi realizada com o auxílio de um “holder”. Após a introdução da agulha através do septo de silicone, a fibra foi exposta ao “headspace” pelo tempo previamente definido para cada experimento.

Após a adsorção nos tempos testados, a fibra foi recolhida, removida do frasco e inserida diretamente no injetor do cromatógrafo gasoso para a análise cromatográfica.

3.5.2 Análise qualitativa e identificação dos compostos voláteis

Para separação e identificação dos compostos voláteis foi utilizado o cromatógrafo gasoso (6890 Agilent) com detector de massas (5973 Agilent). As análises foram realizadas no Departamento de Bromatologia do Laboratório de Química do ITAL.

Os voláteis foram dessorvidos da fibra diretamente no injetor de temperatura programável (PTV) a 270°C, com tempo de “splitless” de 0,7min. As demais condições cromatográficas foram: coluna Supelcowax 60m x 0,25mm x 0,25µm (polar), com programação de temperatura no forno de 40°C (3 min) a 250°C e aquecimento de 5°C/min.

O detector de massas foi acondicionado para trabalhar com energia de ionização de 70 eV em modo varredura (SCAN). As temperaturas foram fixadas em 230°C para a fonte de íons e 150°C no quadrupolo. Para a identificação dos voláteis foi realizada a comparação dos espectros de massas obtidos para cada composto com aqueles disponíveis na biblioteca Nist 98 e altas similaridades (> 90%) foram consideradas. Para a confirmação da identidade dos compostos, foi calculado o Índice de Retenção de Kovats experimental obtido após a injeção e análise da sequência de alcanos, e comparado com os índices reportados na literatura e obtidos utilizando as mesmas condições deste ensaio. A sequência de alcanos foi cedida pelo Laboratório de Química de Alimentos da FEA/UNICAMP.

Para os compostos cujo Índice de Kovats não foi encontrado na literatura, a identificação foi realizada apenas pela comparação dos espectros de massas e estes compostos foram considerados “tentativamente identificados”.

3.6 Avaliação da influência dos fungos na bebida

Considerando a diversidade das espécies fúngicas isoladas nas amostras da região de Piraju e os resultados da análise sensorial, com a identificação de vários atributos diferenciais e interessantes nas bebidas desta região, a análise dos compostos voláteis foi realizada com os cafés e com os fungos isolados desta região.

Inicialmente foram analisados os compostos voláteis dos grãos inoculados com os fungos e posteriormente dos fungos no meio de cultura. Foi otimizada a metodologia para a detecção dos compostos voláteis utilizando a técnica de Microextração em Fase Sólida (SPME) e detecção por cromatografia gasosa e espectrometria de massas (GC-MS).

Com o objetivo de avaliar os metabólitos voláteis fúngicos e a influência destes na qualidade final da bebida, foram selecionadas as principais espécies isoladas dos cafés anteriormente analisados, em termos quantitativos e qualitativos, isto é, que apresentaram maior frequência e que mostraram alguma correlação com a análise sensorial realizada, para serem avaliadas. Essas espécies foram inoculadas no café, seguido da avaliação sensorial. Além disso, os metabólitos voláteis desses fungos no meio de cultura também foram identificados.

3.6.1 Inoculação dos fungos nos grãos de café

3.6.1.1 Isolados testados

Para a inoculação nos grãos de café, foram selecionados três isolados da região de Piraju: *Aspergillus foetidus*, *Penicillium crustosum* e *Penicillium brevicompactum*. Os fungos foram inoculados em ágar Czapek Extrato de Levedura e incubados a 25°C por 7 dias em tubos com septo de silicone.

3.6.1.2 Teste de produção de toxinas

Antes de serem inoculadas no café, os isolados foram testados quanto à produção de metabólitos tóxicos relacionados com as espécies estudadas, como a ocratoxina A para *Aspergillus* e penitrem para *Penicillium*. A cepa de *Aspergillus* section *Nigri*, posteriormente identificada como *Aspergillus foetidus* foi testada quanto à produção de ocratoxina A através da técnica do ágar plug (Filtenborg *et al.*, 1983) no próprio Laboratório de Microbiologia do Instituto de Tecnologia de Alimentos. A cepa foi inoculada no meio ágar Sacarose Extrato de Levedura (YESA) e cultivadas durante 7 dias à 25°C. Após este período, um “plug” da colônia foi retirado com o auxílio de um estilete e aplicado na placa de cromatografia de camada delgada. Seus metabólitos foram extraídos com solução metanol:clorofórmio (1:1, v/v). A análise cromatográfica foi desenvolvida em tolueno:acetato de etila: ácido fórmico 90%: clorofórmio (7:5:2:5, v/v/v/v). O resultado

positivo/negativo foi obtido através da comparação qualitativa da coloração e do fator de retenção dos metabólitos secundários produzidos, com o padrão de ocratoxina A desenvolvido paralelamente, e observados sob luz ultravioleta de 365 e 254nm.

As espécies de *Penicillium* (*P. brevicompactum* e *P. crustosum*) e o *Aspergillus foetidus* foram encaminhadas a Technical University of Denmark (DTU) para a análise de extrólitos. Os isolados foram inoculados em CYA e YESA, cultivados durante 7 dias à 25°C. Após esse período 5 plugs de aproximadamente 3mm foram cortados das placas, transferidos para um tubo de 1,5mL e a extração foi realizada pela adição de 800µL de uma solução de acetato de etila:diclorometano:metanol (3:2:1, v/v/v) com 1% de ácido fórmico e submetendo o conjunto à ultrassonicação durante 55min conforme descrito por Smedsgaard (1997). Os solventes foram evaporados “overnight” em capela de fluxo laminar e o extrato seco foi ressuscitado em 500µL de metanol e filtrado através de filtro Milex PFTE (politetrafluoroetileno) de 0,45µm. Um volume de 3µL do extrato foi injetado em cromatógrafo líquido Agilent 1100 (Waldbron, Alemanha), com detectores de arranjo de diodos (faixa de 210 a 280nm a cada 0,7segundos) e fluorescência (230nm excitação e 450nm emissão) em sequência. Para separação dos compostos foi utilizada a coluna C18 Luna (II) (50mm×2 mm) e sistema gradiente: água contendo 0,05% de ácido trifluoracético (TFA) e acetonitrila contendo 0,05% do mesmo ácido, partindo de 15% de acetonitrila e alcançando 100% de acetonitrila em 20min, mantendo a proporção do gradiente final durante 5 min antes de retornar as condições iniciais.

Os metabólitos encontrados em cada isolado foram identificados com base nos índices de retenção relativos às alquifenonas e os espectros dos compostos foram comparados com banco de dados interno (Frisvad & Thrane, 1989).

3.6.1.3 Café- Esterilização

Para garantir somente o crescimento das espécies fúngicas em estudo, grãos de café arábica, cedidos pela Assicafé Consultoria Científica, foram esterilizados utilizando radiação ionizante (raios gama – Co-60) na empresa CBE (Companhia Brasileira de Esterilização). Foram testadas as doses de 1, 3 e 10 kGy. O plaqueamento dos grãos em meio de cultura e a análise sensorial da bebida, antes e após os tratamentos, foram realizados para se avaliar a eficiência da esterilização e as características sensoriais da bebida, respectivamente.

3.6.1.4 Inoculação dos fungos no café

As cepas testadas foram inoculadas no MEA e incubadas à 25°C durante 5 dias. Para o preparo do inóculo, foi realizada uma raspagem de todo o micélio fúngico da placa e o mesmo foi transferido para um frasco com 100mL de água peptonada 0,1% adicionada de 0,1% de tween 80 e pérolas de vidro. Para a obtenção da concentração da suspensão utilizada para a contaminação dos grãos, a solução inicial foi filtrada em gaze estéril e diluições decimais seriadas em solução de água peptonada 0,1%, foram realizadas.

Para a contaminação dos grãos foram adicionados 2mL da suspensão inicial em 150g de café cru, seguida da adição de 3mL de água estéril, visando o aumento da atividade de água da amostra e a possibilidade do crescimento fúngico. Foram realizadas as análises de atividade de água e umidade antes e após a inoculação conforme descrito no item 4.3. As amostras foram encaminhadas para a análise sensorial após 7 dias, mantidas a 25°C.

3.6.1.5 Análise sensorial

A análise sensorial da bebida preparada com os grãos inoculados com os fungos foi realizada de acordo com o método descrito no item 3.4. Paralelamente às amostras inoculadas com os fungos, foi realizada também a análise sensorial do controle (sem contaminação).

3.6.1.6 Análise dos metabólitos voláteis

Os compostos voláteis dos grãos inoculados com os fungos e dos controles (sem contaminação) foram extraídos e identificados de acordo com o método descrito em 3.5.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análises micológicas e avaliação sensorial

A Tabela 7 apresenta o total de fungos e as principais espécies isoladas dos cafés do Cerrado Mineiro/MG e os resultados da análise sensorial, realizadas apenas para as amostras secas.

Em geral, as amostras de Minas Gerais não apresentaram elevada contaminação fúngica (inferior a 20%) e as principais gêneros isolados foram *Eurotium* e *Fusarium*., fungos comumente encontrados em grãos de café cru. A baixa contaminação fúngica em amostras provenientes de Minas Gerais foi também verificada em estudo realizado por Taniwaki *et al.* (2003). Os autores estudando a incidência de isolados de *Aspergillus* spp. potencialmente ocratoxigênicos em diferentes regiões produtoras no Brasil (Alta Paulista, Sorocabana, Alta Mogiana e Cerrado Mineiro), encontraram baixos valores de infecção fúngica (< 4%) para os cafés do Cerrado Mineiro e apenas em café seco e estocado na tulha (9 amostras) no total de 36 amostras analisadas. Com o processo de secagem, os fungos xerofílicos, àqueles capazes de crescer em baixos valores de atividade de água (< 0,85), são favorecidos e sobrevivem, sendo os responsáveis pela contaminação posterior dos grãos, como por exemplo, as espécies do gênero *Eurotium* sp.

Apesar da baixa infecção, foi possível verificar que os cafés preparados naturalmente apresentaram contaminação fúngica ligeiramente maior do que os descascados. As médias de infecção para os cafés descascados foram de 6,0% enquanto que para o café seco com a casca foi de 11,2%. Em relação às espécies isoladas, não houve diferença entre os dois tipos de preparo. A secagem do café pela via natural apresenta algumas características que podem propiciar um aumento na contaminação microbiana. Os grãos seguem para o terreiro ou secador com a casca, polpa e mucilagem, frações no fruto que são ricas em açúcar e que podem ser utilizados pelos microrganismos para o seu crescimento e multiplicação. Estudos mostraram que espécies de *Fusarium* sp., *Cladosporium* sp., *Colletotrichum* sp., *Penicillium* sp., *Trichoderma* sp., *Aspergillus* sp. e *Gliocladium* sp. estão presentes nos frutos e que no terreiro podem acelerar o processo de fermentação (Carvalho *et al.*, 1997). Desta maneira é preciso que o tempo entre a colheita e

a secagem dos grãos seja o menor possível, de preferência no mesmo dia, para que o processo de fermentação dos grãos não se inicie.

Analisando os resultados da avaliação sensorial, verificou-se que em todas as amostras preparadas pela via natural, a avaliação final apresentou alguma característica negativa como imaturo, fermentado, mofo, adstringente e amargo. A falta de homogeneidade no grau de maturação dos grãos, o tempo mais prolongado para a secagem do café em coco e as fermentações indesejáveis, fruto de uma secagem não controlada, são fatores que podem comprometer a qualidade dos grãos e da bebida quando é utilizada a secagem natural (Toledo & Barbosa, 1988, Illy & Viani, 2005).

Por outro lado o café seco pela via natural, quando preparado de maneira adequada, é responsável por conferir características sensoriais importantes para a bebida, principalmente de corpo e aroma, que em alguns casos são características desejadas, como no café *espresso*, por exemplo (Illy & Viani, 2005).

Para os cafés descascados do Cerrado Mineiro, em geral as amostras apresentaram características positivas (78%) na avaliação sensorial, como doce, aromático e caramelo. Apenas 2 amostras apresentaram avaliação sensorial negativa e não houve correlação com a infecção fúngica. É possível que durante o processo tenha ocorrido alguma falha, responsável pelo aparecimento das características indesejáveis, descritas nestas amostras como “stinker”, imaturo, mofo, como por exemplo, uma fermentação excessiva dos grãos ou secagem inadequada. Ou até mesmo a utilização de grãos imaturos.

Tabela 7- Fungos isolados de amostras de café cru da região de Patrocínio no estado de Minas Gerais.

Nº	Tipo preparo	Total isolados] (% infecção total)	Nº isolados (% de grãos infectados)										Avaliação Sensorial
			<i>E. rubrum</i>	<i>E. repens</i>	<i>E. amstelodami</i>	<i>E. chevalieri</i>	<i>Fusarium sp</i>	<i>F. semitectum</i>	<i>F. lateritium</i>	<i>Cladosporium sp.</i>	<i>A. westerdijkiae</i>	<i>P. brevicompactum</i>	
1	Descascado	4 (8)	3(6)				1(2)						stinker forte em infuso e <i>espresso</i>
2	Descascado	3(6)				1(2)	2(4)						doce e caramélico
3	Descascado	2(4)	1(2)				1(2)						doce, aromático, caramelo forte e fruta seca
4	Descascado	4(8)	3(6)			1(2)							doce, aromático, caramelo forte e fruta seca mas com gosto de fumaça
5	Descascado	3(6)	1(2)			1(2)	1(2)						doce, aromático, caramelo forte e fruta seca
6	Descascado	1(2)					1(2)						doce e caramélico mas com gosto de madeira
7	Descascado	3(6)	2(4)							1(2)			particular, um pouco amargo
8	Descascado	2(4)	2(4)										particular, um pouco amargo
9	Natural	5(10)	4(8)								1(2)		fermentado forte, com ligeiro ranço
10	Natural	9(18)	2(4)				6(12)					1(2)	fermentado, adstringente
11	Descascado	5(10)	5(10)										imaturo, mofo, muito adstringente, amargo
12	Natural	10(20)	1(2)						9(18)				imaturo, fermentado
13	Natural	2(4)	1(2)	1(2)									imaturo, fermentado
14	Natural	1(2)							1(2)				fermentado, stinker e muito adstringente
15	Natural	6(12)	4(8)	1(2)					1(2)				ranço e fermentado
16	Natural	10(20)	3(6)		2(4)	1(2)		1(2)	3(6)				stinker, imaturo, nem doce nem ácido
17	Natural	1(2)							1(2)				leve adstringência e amargor
18	Natural	4(8)							3(6)			1(2)	leve adstringência e amargor
19	Natural	3(6)							3(6)				fermentado leve

A Tabela 8 apresenta o total de fungos e as principais espécies isoladas dos grãos de Piraju e os resultados da análise sensorial.

Em relação às amostras de Piraju constatou-se uma maior incidência e diversidade de fungos comparativamente aos cafés de Minas Gerais. Cerca de 45% das amostras apresentaram infecção fúngica maior que 70%, mesmo aquelas cujo resultado da avaliação sensorial no *espresso* foi positivo. As principais espécies isoladas foram *Penicillium brevicompactum*, *Penicillium crustosum*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus westerdijkiae* e *Fusarium lateritium*.

Verificou-se principalmente nas amostras da Fazenda Santa Maria, uma alta incidência de espécies de *Penicillium brevicompactum* e *Penicillium crustosum* em todas as etapas do processamento, inclusive na cereja, indicando que estas espécies encontram-se presentes naturalmente no pé de café desta região.

Do total de amostras da região de Piraju analisadas, 50% apresentaram avaliação sensorial negativa, dentre estas todos os cafés bóia (5 amostras) e varreção (2 amostras), três amostras de cafés verde (imaturos) e um café da estocagem (tulha). Todas as amostras de café bóia avaliadas apresentaram características negativas como fermentado, “stinker” (fermentado acentuado), mofo e imaturo e todas apresentaram infecção fúngica total maior que 30%. O café bóia é definido como os grãos que atingem a maturação completa ainda no pé. Após a colheita é segregado do cereja e do verde nos lavadores por densidade e normalmente é levado para o terreiro para a secagem natural. Dentre as espécies fúngicas isoladas nestas amostras, foi possível verificar a alta incidência de *Aspergillus foetidus*, variando a porcentagem de infecção de 0 a 34% e média de 15,2%.

Assim como o café bóia, a bebida preparada com o café varreção (aqueles que mantiveram contato com o solo e sujidades) também apresentaram os mesmos resultados, acrescentando as descrições riado e sujo. Nestas amostras, além da presença de *Penicillium* spp, foi possível verificar a alta infecção por *Aspergillus foetidus* (16 a 64%) e *Aspergillus westerdijkiae* (0 a 30%). Nesses cafés a bebida apresentou avaliação final negativa e as características descritas foram mofo, riado, fermentado, amargo e imaturo.

Estas espécies isoladas dos cafés varreção e bóia são capazes de crescer e se desenvolver em condições de baixa atividade de água e acabam sobrevivendo e prevalecendo nestas amostras. A sobrevivência e desenvolvimento destas espécies são favorecidos já que não há competição com outros microrganismos. Em contato com o solo

a carga microbiana tende a aumentar, como foi possível verificar nos resultados do plaqueamento das amostras varreção.

A alta infecção por *Aspergillus niger* (espécie pertencente à seção *Nigri*, assim como *Aspergillus foetidus*) e *Aspergillus westerdijkiae* em grãos com defeitos foi relatada também por outros autores. Taniwaki *et al.*, (2006) estudando a micobiota de grãos defeituosos (preto, preto-verde, ardido e verde), verificaram a alta contaminação por *Aspergillus niger*, *Aspergillus westerdijkiae* e *Eurotium chevalieri* nestes grãos. As seguintes porcentagens de infecção total foram relatadas nos defeitos estudados: ardido (94%), preto (96%), preto-verde (80%) e verde (72%). As possíveis causas para os defeitos preto e ardido estão relacionadas com grãos maduros ou secos no pé que passaram por condições inadequadas, como contato com o solo e/ou fermentação por microrganismos seguida da secagem (Teixeira, 1970, Illy & Viani, 2005). Sendo assim, os defeitos preto e ardido estão relacionados com os cafés bóia e varreção.

A Figura 8 apresenta o plaqueamento da amostra varreção (amostra 9) e os principais fungos presentes.

Tabela 8 – Fungos isolados de café cru de café da região de Piraju, São Paulo.

Nº	Origem	Total isolados (% infecção total)	Nº isolados (% de grãos infectados)														Avaliação Sensorial	
			<i>P. crustosum</i>	<i>P. brevicompactum</i>	<i>A. westerdijkiae</i>	<i>A. foetidus</i>	<i>A. carbonarius</i>	<i>F. lateritium</i>	<i>F. oxysporium</i>	<i>F. semitectum</i>	<i>Cladosporium sp.</i>	<i>Eurotium sp.</i>	<i>Fusarium sp.</i>	<i>Penicillium sp.</i>	Fungos dematiáceos	<i>Mucor sp.</i>		<i>Aspergillus sp.</i>
Fazenda Santa Maria																		
5	Cereja	32 (64)	4 (8)	25 (50)		2 (4)		1 (2)										2
22	Cereja	18 (36)	1 (2)	9 (18)						2 (4)		3 (6)		3 (6)				2
4	Bóia	15 (30)		4 (8)	2 (4)	9 (18)												Infuso- leve fermentado <i>Espresso</i> : leve, fermentado, imaturo acentuado, adstringente forte
10	Bóia	28 (56)	5 (10)	7 (14)		11 (22)		5 (10)										Infuso-fermentado, mofo <i>Espresso</i> : stinker
11	Verde	38 (76)		9 (18)	2 (4)	20 (40)		5 (10)	1 (2)	1 (2)								Infuso-fermentado forte <i>Espresso</i> : fermentado forte
14	Verde	29 (58)	5 (10)	9 (18)							6 (12)	6 (12)	4 (8)					Infuso – Regular <i>Espresso</i> : Madeira forte, mofo, fermentado <u>Avaliação final</u> : negativa
1	Tuiha ¹	51 (100)	4 (8)	13 (26)	2 (4)	3 (6)		14 (28)	13 (26)	2 (4)								Infuso-regular <i>Espresso</i> : aroma chocolate, bom corpo, adstringente

¹ Cereja descascado

² Não realizado devido a alta umidade

Tabela 08 – continuação

Nº	Origem	Total isolados (% infecção total)	Nº isolados (% de grãos infectados)															Avaliação Sensorial	
			<i>P. crustosum</i>	<i>P. brevicompactum</i>	<i>A. Westerdijkiae</i>	<i>A. foetidus</i>	<i>A. carbonarius</i>	<i>F. lateritium</i>	<i>F. oxysporium</i>	<i>F. semitectum</i>	<i>Cladosporium sp.</i>	<i>Eurotium sp.</i>	<i>Fusarium sp.</i>	<i>Penicillium sp.</i>	<i>Fungos dematiáceos</i>	<i>Mucor sp.</i>	<i>Aspergillus sp.</i>		<i>Leveduras</i>
2	Tulha ¹	67(100)		35 (70)	1(2)	3(6)		19 (38)	6(12)		3(6)								Infuso-regular <i>Espresso</i> : aroma caramelo, suave, leve adstringente
7	Tulha ¹	15(30)		5 (10)		8 (16)		2(4)											Infuso- limpo <i>Espresso</i> : aroma floral e caramelo, suave, doce
8	Tulha ¹	69(100)	14 (28)	31 (62)		15 (30)	2(4)	6(12)	1(2)										Infuso- regular <i>Espresso</i> : aroma caramelo, suave, leve adstringente
13	Tulha ¹	48(96)	8 (16)	25 (50)								8(16)	1(2)					2(4)	Infuso-Regular <i>Espresso</i> : Corpo regular, aroma discreto, caramelo, leve adstringência Avaliação final: positiva
12	Bóia ²	24(48)	4(8)	3(6)	1(2)							9(18)	4(8)	1(2)	1(2)			2(4)	Infuso-Regular <i>Espresso</i> : Madeira forte, adstringência forte Avaliação final: negativa
15	Tulha ¹	48(96)	1(2)	26 (52)		1(2)						3(6)	4(8)	12 (24)	1(2)	3(6)			Infuso –Regular <i>Espresso</i> : Aroma discreto, caramelo, pouco corpo, leve adstringência Avaliação final: positiva
9	Varreção	54(100)	17 (34)	5 (10)		32 (64)													Infuso e <i>espresso</i> – leve fermentado, imaturo acentuado

¹ Cereja descascado² Não realizado devido a alta umidade

Tabela 08 – continuação

N ^o	Origem	Total isolados (% infecção total)	N ^o isolados (% de grãos infectados)														Avaliação Sensorial	
			<i>P. crustosum</i>	<i>P. brevicompactum</i>	<i>A. westerdijkiae</i>	<i>A. foetidus</i>	<i>A. carbonarius</i>	<i>F. lateritium</i>	<i>F. oxysporium</i>	<i>F. semitectum</i>	<i>Cladosporium</i> sp.	<i>Eurotium</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Penicillium</i> sp.	Fungos dematiáceos	<i>Mucor</i> sp.		<i>Aspergillus</i> sp.
Fazenda Tijuco Preto																		
3	Varreção	74(100)		24 (48)	15 (30)	8 (16)		25 (50)		2(4)								Infuso-sujo, mofo, riado <i>Espresso</i> : sujo, verde acentuado, amargo.
16	Verde	34(68)		3(6)							25 (50)		3(6)	1(2)			1(2)	Infuso- Regular <i>Espresso</i> : Aroma floral, caramelo, pouco corpo Avaliação final: positiva
18	Bóia	44(88)		10 (20)		17 (34)					1(2)	13 (26)	8(16)			2(4)	1(2)	Infuso e <i>espresso</i> : fermentado, mofo, amargo Avaliação final: negativa
19	Bóia	31(62)	7(14)	10 (20)		1(2)					3(6)	13 (26)					1(2)	Infuso – Regular <i>Espresso</i> : Madeira, fermentado forte (stinker) Avaliação final: negativa
20	Beneficiado ¹	22(44)				3(6)					1(2)	13 (26)	4(8)	1(2)				Infuso: Regular <i>Espresso</i> : suave, bom aroma, floral, caramelo, doce Avaliação final: positiva
17	Tulha ¹	23(72)		4(8)	2(4)	11 (22)						17 (34)						Infuso e <i>espresso</i> : Fermentado, madeira, verde acentuado Avaliação final: negativa

¹ Cereja descascado² Não realizado devido a alta umidade

Tabela 08 – continuação

N ^o	Origem	Total isolados (% infecção total)	N ^o isolados (% de grãos infectados)														Avaliação Sensorial	
			<i>P. crustosum</i>	<i>P. brevicompactum</i>	<i>A. westerdijkiae</i>	<i>A. foetidus</i>	<i>A. carbonarius</i>	<i>F. lateritium</i>	<i>F. oxysporium</i>	<i>F. semitectum</i>	<i>Cladosporium sp.</i>	<i>Eurotium sp.</i>	<i>Fusarium sp.</i>	<i>Penicillium sp.</i>	<i>Fungos dematiáceos</i>	<i>Mucor sp.</i>		<i>Aspergillus sp.</i>
Fazenda dos Cedros																		
23	Cereja	29(58)								4(8)		20(40)					5(10)	2
21	Verde ¹	29(58)	3(6)	11(22)	2(4)	1(2)					6(12)	3(6)	2(4)	1(2)				Infuso e <i>espresso</i> : madeira, mofo, fermentado forte (stinker) Avaliação final: negativa

¹ Cereja descascado

² Não realizado devido a alta umidade



Figura 8- Contaminação fúngica em café varreção (Piraju, amostra 9).

Penicillium brevicompactum esteve presente em 96% das amostras analisadas na região de Piraju, inclusive no café cereja. A média de infecção por essa espécie foi de 23,3%, variando de 0 a 70%. Nas amostras cujo resultado da avaliação sensorial foi positiva (amostras 1, 2, 7, 8, 13 e 15) também foi possível verificar a alta incidência dessa espécie, com média de 46% e variação de 10 a 70% de infecção. As principais características positivas obtidas foram aroma caramelo, floral, suave e doce. A Figura 9 apresenta a infecção fúngica presente na amostra n° 08, estocada na tulha.



Figura 9 – Contaminação fúngica em café da tulha (Pirajú, amostra 8).

Outra espécie de *Penicillium* presente nas amostras de Piraju, porém em menor incidência, foi *Penicillium crustosum*, presente em 55% das amostras e apresentando média de infecção de 6,6%, variando de 0 a 34%. Outros gêneros fúngicos isolados foram: *Fusarium* spp. (principalmente *Fusarium lateritium*), *Eurotium* sp. e *Cladosporium* sp.

Vários autores estudando os microrganismos nos grãos de café relataram a incidência dos mesmos gêneros fúngicos e de outros grupos. Bitancourt (1975), estudando os microrganismos que constituem a microflora do café cereja em diferentes fases do preparo, no pé e no terreiro, observou maior frequência de isolamento de *Colletotrichum* spp., *Fusarium* spp. e bolores verdes (*Penicillium* sp.). Também foram identificados *Aspergillus niger*, *Rhizopus* sp., *Phomopsis* sp. e *Epicoccum* sp. no café seco em terreiro e *Cladosporium* sp. desenvolvendo no pé. Carvalho *et al.* (1989) estudando a relação entre a microbiota e as características sensorias da bebida concluíram que as amostras de café classificadas como bebida mole e dura apresentaram baixa infecção pelas espécies *Fusarium roseum*, *Aspergillus ochraceus* e *Aspergillus flavus* e os cafés classificados como de bebida riada e rio, apresentaram índices elevados por espécies de *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp. Estudos anteriores realizados por Alves & Castro (1993) mostraram que a qualidade da bebida independe da contaminação dos grãos. Os gêneros mais frequentes foram: *Fusarium* spp. no café cereja, *Aspergillus* spp. nos cafés rio e riado e *Cladosporium* spp. nos cafés classificados como de melhor bebida. Por sua vez *Aspergillus glaucus* foi o mais frequente em cafés classificados em bebida muito ruim. Na maior parte dos trabalhos foi verificada a presença de espécies de *Aspergillus* sp., principalmente nas etapas pós-colheita, nos grãos já secos e nos cafés cuja bebida apresentou características negativas. Com a secagem dos grãos de café há o favorecimento das espécies xerofílicas, as únicas capazes de sobreviver em valores baixos de atividade de água. Dentre estas, encontram-se algumas espécies do grupo dos *Aspergillus*, que podem apresentar a capacidade de produzir toxinas, como *Aspergillus westerdijkiae*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus carbonarius* produtores de ocratoxina A.

No Brasil, Taniwaki *et al.* (2003), estudando a ocorrência de fungos em 408 amostras de grãos de café, constataram maior frequência de isolamento de *Aspergillus niger* (504 isolados), seguido de *Aspergillus westerdijkiae* (248) e *Aspergillus carbonarius* (48). Os autores constataram que a infecção por estas espécies ocorre após a colheita, quando os frutos entram em contato com o solo, ou devido às más práticas agrícolas

durante a secagem e estocagem. Este fato constata a grande importância do monitoramento destas espécies neste produto.

A Tabela 9 apresenta os valores de atividade de água das amostras analisadas.

Com exceção do café cereja, todas as amostras estavam secas, apresentando baixa atividade de água e dentro dos limites seguros para o crescimento de microrganismos.

Tabela 09: Valores de atividade de água (média de três repetições).

Nº amostra	Cerrado/MG	Piraju/SP
1	0,537	0,547
2	0,539	0,528
3	0,543	0,522
4	0,527	0,518
5	0,527	0,989
6	0,549	†
7	0,526	0,505
8	0,543	0,431
9	0,550	0,535
10	0,592	0,504
11	0,514	0,571
12	0,529	0,554
13	0,553	0,606
14	0,532	0,617
15	0,505	0,560
16	0,544	0,529
17	0,530	0,626
18	0,550	0,545
19	0,540	0,679
20	†	0,565
21	†	0,604
22	†	0,971

† Não consta

4.2 Avaliação dos metabólitos produzidos pelos isolados estudados

Três fungos foram selecionados para a avaliação da produção de compostos voláteis: *Penicillium brevicompactum*, *Penicillium crustosum* e *Aspergillus foetidus*, todos isolados de cafés da região de Piraju. Nestas amostras foi verificada uma maior diversidade fúngica e alta frequência das espécies selecionadas para o estudo.

Inicialmente foram testadas a capacidade de produção de metabólitos tóxicos por estas espécies. As cepas de *Aspergillus foetidus*, *Penicillium brevicompactum* e *Penicillium crustosum* não foram produtoras de ocratoxina A, penitrem A e tampouco micotoxinas relacionadas com estas espécies. De acordo com alguns autores (Pitt & Hocking, 1997; Frisvad *et al.*, 1989) já foi relatado a produção de ácido micofenólico por *Penicillium brevicompactum*, um composto fracamente tóxico para ratos e sem significância para

humanos; e penitrem A produzido por *Penicillium crustosum*, considerada uma micotoxina nefrotóxica para animais e ainda sem conhecimento para humanos. *Aspergillus foetidus* não está relacionado com a produção de ocratoxina A (Samson *et al.*, 2004).

4.3 Esterilização e inoculação dos grãos

Para a avaliação da produção de compostos voláteis pelos fungos no café, as três espécies foram inoculadas nos grãos. A amostra utilizada para o teste foi inicialmente caracterizada quanto à sua microbiota. Através do plaqueamento dos grãos no meio de cultura foi obtida a porcentagem de infecção de 18%. Os seguintes gêneros foram isolados: *Fusarium* sp. (6%), *Cladosporium* sp. (4%), *Aspergillus* sp. (2%), *Eurotium* sp. (2%) e *Penicillium* sp. (2%), além de leveduras (2%).

Para garantir a esterilidade do café e possibilitar a contaminação posterior com as espécies fúngicas estudadas, foi necessário à escolha de um método de esterilização que garantisse a integridade dos grãos e a não modificação das características sensoriais da bebida. Para tanto, foi escolhida a radiação ionizante Co-60, partindo inicialmente de uma dose alta de 10 kGy. Apesar de garantir a esterilidade do café, a dose aplicada de 10 kGy foi considerada muito alta, pois conferiu à bebida características negativas como forte sabor de madeira. Assim, a dose foi reduzida para 1 kGy, que, entretanto, não foi suficiente para promover a esterilização dos grãos. Em outro ensaio, foi constatado que o uso da dose de 3 kGy foi suficiente para eliminar todos os fungos sem causar efeitos negativos na qualidade sensorial da bebida.

Vários estudos têm comprovado a efetividade da irradiação gama para a redução da contagem de fungos em alimentos e vegetais e para o controle de fungos toxigênicos (Aziz & Abd El-Aal, 1997 e 1990; Refai *et al.*, 1996; Van Dyck *et al.*, 1982; Youssef *et al.*, 1999; Aquino *et al.*, 2005). A dose para completa eliminação de fungos toxigênicos em grãos de café e alimentos foi de 5 a 10 kGy (Aziz & Abd El-Aal, 1997). Aquino *et al.* (2005) testando isolados toxigênicos de *Aspergillus flavus* em amostras de milho contendo atividade de água de 0,88-0,94, obtiveram redução significativa de dois ciclos logarítmicos utilizando a dose de 2 kGy e cinco ciclos com as doses de 5 e 10 kGy, sendo que em algumas repetições utilizando 10 kGy houve a completa eliminação dos fungos. Em relação

à degradação da aflatoxinas as doses de 2 e 5 kGy foram capazes de provocar redução nos níveis de aflatoxinas de 30 e 54% respectivamente. A dose de 10 kGy eliminou a aflatoxina da matriz, considerando uma contaminação inicial de 2.214 $\mu\text{g/Kg}$ de aflatoxina B_1 .

Para a contaminação do café foi preparado um inóculo de concentração 10^6 esporos/mL, seguida da adição de água estéril para elevar a atividade de água e possibilitar o crescimento dos fungos. Os valores de atividade de água e umidade, antes e após o preparo da amostra e incubação foram de 0,492 e 11,3% e 0,612 e 13,5% respectivamente. Para avaliar o grau da contaminação, foi realizado o plaqueamento das amostras antes da análise sensorial. As três cepas testadas apresentaram 100% de infecção fúngica. A Figura 10 apresenta a contaminação dos grãos de café pelas três espécies.

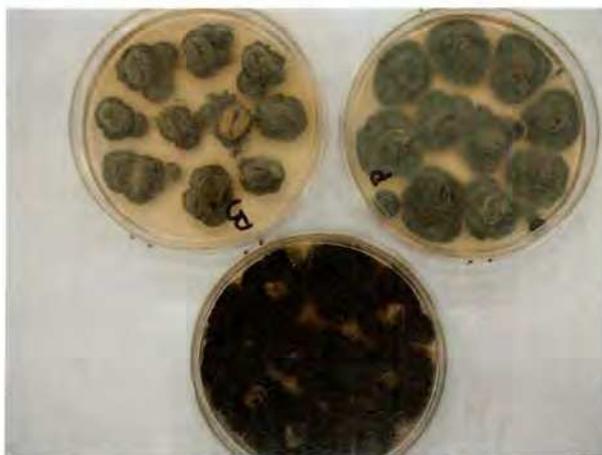


Figura 10 - Café com presença de *P. brevicompactum* (B), *P. crustosum* (P) e *A. foetidus* (fungo negro).

4.4 Avaliação sensorial do café com os fungos

A Tabela 10 apresenta os resultados da análise sensorial das amostras de cafés inoculado com os fungos e a avaliação consensual da equipe da Assicafé.

Tabela 10- Resultados da análise sensorial dos cafés inoculados com *Aspergillus foetidus*, *Penicillium crustosum* e *Penicillium brevicompactum*.

Amostras	Resultados Análise Sensorial	
	Características	Avaliação Final
Controle	Infuso: regular <i>Espresso</i> : aroma chocolate, pouco amargo e leve adstringência	Positiva
Café + <i>Aspergillus foetidus</i>	Infuso: Fermentado, mofo, terra <i>Espresso</i> : stinker, mofo, terra	Negativa
Café + <i>Penicillium crustosum</i>	Infuso: Fermentado forte <i>Espresso</i> : Fermentado forte, adstringente, imaturo	Negativa
Café + <i>Penicillium brevicompactum</i>	Infuso: Limpo <i>Espresso</i> : Aroma floral, caramelo, doce, leve adstringência	Positiva

Características indesejáveis como fermentado, mofo e terra estiveram presentes na amostra inoculada com *Aspergillus foetidus* e fermentado forte e imaturo na amostra inoculada com *Penicillium crustosum*, conferindo a essas bebidas, resultados negativos na avaliação sensorial final. O contrário ocorreu com o café inoculado com *Penicillium brevicompactum*. Este apresentou avaliação final positiva e características desejáveis como presença de aroma floral, caramelo e doçura. A presença do aroma floral também foi detectada diretamente nos grãos inoculados com esta espécie, antes mesmo do preparo da bebida. A amostra controle, sem contaminação, apresentou avaliação final positiva, com características no *espresso* de chocolate, amargor e adstringência, indicando que as alterações realizadas nos grãos, não interferiram negativamente nas características sensoriais da bebida final.

Várias espécies de *Penicillium* são capazes de produzir compostos voláteis que causam aromas desagradáveis, mostrando a potencialidade das mesmas como deterioradoras dos alimentos do ponto de vista sensorial.

Por outro lado, algumas podem ser usadas para a produção de aromas naturais, como por exemplo, *Penicillium griseofulvum* que é utilizado para a produção de aromas de frutas (Larsen, 1998; Larsen & Frisvad, 1995).

4.5 Análise dos compostos voláteis

4.5.1 Parâmetros testados

Em relação à quantidade de amostra para a captura dos compostos voláteis, não foi observada diferença utilizando 1,0 e 2,0g, contudo os picos foram menores quando pesado 0,5g da amostra. Este fato pode ser explicado pela saturação da fibra de SPME pelos compostos voláteis.

Da mesma maneira ocorreu com os testes avaliando a temperatura e tempo de extração. Entre 65 e 70°C e 30 e 60 min não houve diferença entre os perfis cromatográficos, já utilizando 50°C e 15 min, os picos apresentaram-se menores. Desta maneira foram escolhidos os valores intermediários, 1g de amostra, 65°C de temperatura e 30min de tempo de extração.

4.5.2 Compostos voláteis dos fungos no meio de cultura

Paralelamente aos ensaios de análise sensorial dos cafés inoculados com as espécies estudadas, foram avaliados os metabólitos voláteis dos fungos no meio de cultura, utilizando a técnica Headspace/SPME e GC/MS. Os compostos voláteis do meio de cultura foram também analisados e desconsiderados na avaliação final. .

Em relação aos metabólitos produzidos pelos fungos *Penicillium brevicompactum*, *Penicillium crustosum* e *Aspergillus foetidus* em ágar Czapek Extrato de Levedura, vários foram os compostos identificados. Os principais foram pertencentes ao grupo dos aldeídos, cetonas, álcoois e terpenos, como mostra a Tabela 11.

Tabela 11 - Compostos voláteis produzidos pelos fungos em meio de cultura CYA (Agar Czapek Extrato de Levedura) mantidos a 25°C por 7 dias.

Fungos	Grupos	Compostos voláteis	Índice de Kovats	
			I _{calculado}	I _{literatura}
<i>P. brevicompactum</i>	Aldeídos	Octanal	1282	1291
		2-octenal	1414	1442
		2-hexanal	1080	1088
		Decanal	1475	1500
		2-butenal	1201	1233
	Terpenos	Limoneno	1186	1208
	Cetona	2-nonanona	1374	1388
		3-nonen 2 ona	1487	1
		2-undecanona	1564	1
		Cyclohexanona	1326	1282
	Álcool	1-heptanol	1430	1453
		1-octanol	1521	1558
		2-octen 1-ol	1576	1618
	Outros	4-metil thiazole	1313	1279
1-deceno 1,2-diclorobenzeno		965	987	
<i>P. crustosum</i>	Cetona	1-octen 3-ona	1294	1305
		2-undecanona	1564	1
	Derivados de benzeno	1-etil 2, 4, 5- trimetil benzeno	1386	1
		1,1-dimetil propel benzene	1387	1
		1-etil 3,1-metil etil benzeno	1398	1
		Pentametil benzene	1470	1
		Benzeno metoxi Naftaleno	1341	1
		Álcool	1,6-octadien 3-ol	1426
		2-bornanol	1568	1
	Outros	2-pentil furano	1227	1
		Etil tiglato	1235	1
		Ciclopentadieno	1521	1
		Pentil ciclopropano	1705	1

¹ Tentativamente identificado

Tabela 11 - Continuação

Fungos	Grupos	Compostos voláteis	Índice de Kovats	
			I _{calculado}	I _{literatura}
<i>Aspergillus foetidus</i>	Aldeídos	2-heptenal	1321	1349
		2-octenal	1411	1442
		2,4-octadienal	1564	1
		2-butenal	1022	1041
		Benzaldeído	1511	1525
	Cetonas	2-nonanona	1370	1388
		3-octen 2-ona	1392	1
		2-undecanona	1560	1
	Derivados de benzeno	Benzonitrila	1585	1591
		1,3 bis (1,1-dimetil etil) benzeno	1394	1
	Álcool	2-octen 1-ol	1573	1618
		3-nonanol	1613	1
		1-octanol	1521	1558
		2-nonen 1-ol	1571	1722
		Benzil álcool	1823	1879
	Ácidos	Ácido acético	1444	1449
		Ácido butenóico	1528	1
		Ácido benzóico	2191	1
		2 n-butil furano	908	1
		2-pentil furano	1205	1
		Fenol	1941	1
	Outros	Dimetilbissulfeto	1029	1078

¹ Tentativamente identificado

Penicillium brevicompactum destacou-se pela produção de vários aldeídos, como 2-octenal, decanal e undecanal caracterizados pelos aromas cítricos, frescos e herbal respectivamente, e cetonas, como 2-nonanona, 3-nonen 2-ona, 2-undecanona caracterizados pelo aroma frutal. Além disso, outros compostos como 4-metil tiazole, 1-deceno e 1,2-diclobenzeno, caracterizados pelo aroma agradável e limoneno com aroma cítrico, também foram identificados. Börjesson *et al.* (1992) reportaram alta produção de acetona pela mesma espécie em aveia e trigo, bem como 3-pentanona, 2-butanona, 2-propanol, 2-metil 1-butanol, 2-metilfurano e 3-metilfurano.

Vários compostos derivados de benzeno, apresentando odor doce aromático, foram produzidos por *Penicillium crustosum*, dentre eles 1-etil 2,4,5-trimetil benzeno; 1,1-dimetil propil benzeno; 1-etil 3,1 metiletil benzeno e pentametil benzeno. Além destes, foram

identificados 1-octen 3-ona, com aroma de cogumelo e terra; naftaleno e ciclopentadieno, ambos com aroma de cânfora; 1,6-octadien 3-ol com aroma floral e pentil ciclopropano com aroma de éter de petróleo. Segundo estudos que avaliaram a produção de voláteis por espécies de *Penicillium* ssp. (Larsen, 1998 e Larsen & Frisvad, 1995) foi verificado que em meio ágar extrato de levedura-sacarose (SYES), geosmina, 2-metil-isoborneol, dimetilbissulfeto e estireno foram produzidos por *Penicillium crustosum*. De acordo com os autores, geosmina produziu odor de terra, 2-metil-isoborneol produziu odor de mofo e dimetilbissulfeto odor de podridão que, juntamente com o estireno, encobriram os outros odores produzidos por esta espécie.

Aspergillus foetidus destacou-se pela produção de vários compostos, alguns com características sensoriais negativas como 2-butenal (aroma pungente), 1,3 bis (1,1 dimetil etil) benzeno (odor de vegetal estragado), 2-nonanol (odor de pimenta), ácido acético, 2-pentil furano (odor de terra) e dimetilbissulfeto (odor sulfuroso). Em estudo realizado por Fiedler *et al.* (2001) *Aspergillus niger*, fungo semelhante morfológicamente ao *Aspergillus foetidus*, foi capaz de produzir os seguintes compostos em ágar Extrato de Malte, 1-octen-3-ol (odor de terra), 3-octanol (odor de cera, gordura), acetona e 3-octanona (odor herbal).

A Figura 11 apresenta o cromatograma dos compostos voláteis de *P. brevicompactum* e a comparação entre os espectros de massas (composto 3-nonen-2-ona).

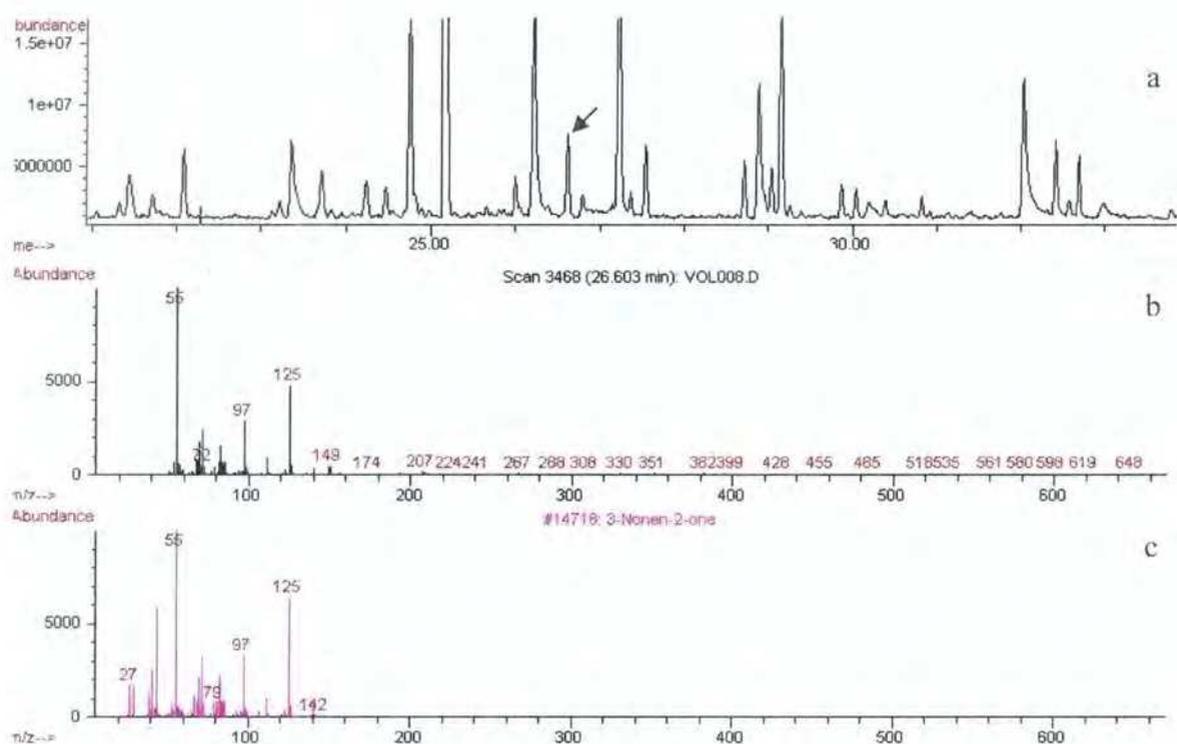


Figura 11 - Perfil HS/SPME-GC/MS de *Penicillium brevicompactum* em Ágar Czapek Extrato de Levedura (a) e comparação entre os espectros de massa do composto 3-nonen 2-ona (b) e (c).

4.5.3 Compostos voláteis do café inoculado com os fungos

Quando foram analisados os voláteis dos mesmos fungos inoculados no café cru, houve uma modificação na composição dos mesmos como mostra a Tabela 12. Os compostos voláteis do café sem inoculação foram analisados paralelamente e desconsiderados na avaliação final.

Tabela 12 - Compostos voláteis identificados no café cru inoculado com os fungos.

Café inoculados com fungos	Grupos	Compostos voláteis	Índice de Kovats	
			I _{calculado}	I _{literatura}
<i>Penicillium brevicompactum</i>	Cetona	3-octanona	1270	1
		2-pentadecanona	2218	1
	Álcool	2-metil 1-propanol	1101	1103
		1-hexanol	1362	1362
	Outros	2,6-bis 1,1-dimetil 4-etil fenol	1957	1
Myrcene		1184	1158	
<i>Penicillium crustosum</i>	Cetona	2-pentadecanona	1689	1
		6,10-dimetil 5,9-undecadien 2-ona	1879	1
	Álcool	3,7- dimetil 6-octen 1-ol	1778	1786
		5-metil 2,1-metil etil 4-hexen 1-ol	1695	1
		6-hepten 1-ol	1430	1
		1-hexanol	1362	1362
		2- metil 1-propanol	1100	1103
Derivados de benzeno	1,2,3,4 tetrahidronaftaleno	1645	1	
<i>Aspergillus foetidus</i>	Álcool	2-metil 1-propanol	1100	1103
		1-octen 3-ol	1459	1465
		3-metil 1-butanol	1217	1208

¹ Tentativamente identificado.

No café inoculado com *Penicillium brevicompactum* foi detectada a presença de cetonas como 3-octanona de odor herbal e 2-pentadecanona caracterizado por apresentar aroma floral. Este composto pode ser um dos responsáveis pelas características positivas da bebida, detectadas na análise sensorial. Além desses compostos foram identificados também álcoois como 2-metil 1-propanol e 1-hexanol e outros compostos como 2,6-bis 1,1- dimetil 4-etil phenol e mycene. Este último apresenta odor agradável, é encontrado em plantas e utilizado em indústria de perfumaria.

No café inoculado com *Penicillium crustosum* foi detectada a presença predominante de álcoois e 1,2,3,4 tetrahidronaftaleno, que apresenta odor de mistura de benzeno e mentol e também identificado como aguarrás.

No café inoculado com *Aspergillus foetidus*, foi detectada somente a presença de

álcoois como 2-metil 1-propanol, 1-octen 3-ol e 3-metil 1-butanol. O composto 1-octen 3-ol é caracterizado por apresentar odor de terra e mofo.

Borjesson *et al.*, (1993) estudando compostos produzidos por fungos em meio de cultura, identificaram voláteis de espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* com odor desagradável em ágar aveia, dentre eles o dimetilbissulfeto e 1-octen 3-ol, 2-metilisoborneol com odor de terra e a geosmina, 1-metox 3-metilbenzeno e metilfenol com odor desagradável.

A presença dos compostos como 2,4,6-tricloroanisol (TCA) e geosmineol (MIB) foi detectada em café e relatada como responsável pelo defeito terra e mofo por alguns autores (Spadone *et al.*, 1990, Cartegiani *et al.*, 2001). Cartegiani *et al.*, (2001) estudando compostos voláteis de cafés do México através da técnica de olfatometria e CG-MS, identificaram alguns compostos com odor de terra (geosmina, 2-metilisoborneol, 2, 4,6 tricloroanisol e 3 derivados das metoxipirazinas), contudo os autores não relacionaram diretamente os defeitos com a presença dos fungos, mas sugeriram que a causa do problema poderia estar relacionado com falhas na secagem dos grãos.

Neste trabalho esses compostos não foram detectados com os fungos no meio de cultura e tampouco nos café inoculados. Este fato pode ser explicado pela baixa concentração dos mesmos nestas amostras e que, nas condições utilizadas no ensaio não foram capazes de serem detectados. Ou pela interferência do ruído na linha de base ou pela não absorção destes compostos na fibra. Contudo, foi confirmada a presença do composto 1-octen 3-ol no café inoculado com *Aspergillus foetidus*, apresentando as mesmas características de odor de mofo e que pode estar relacionado com a avaliação final negativa da bebida. No meio de cultura, *A. foetidus* produziu maior número de compostos com características sensoriais negativas como: 2-butenal (aroma pungente), benzeno 1,3 bis (1,1 dimetil etil) (odor de vegetal estragado), 2-nonanol (odor de pimenta), ácido acético, 2-pentil furano (odor de terra) e dimetilbissulfeto (odor sulfuroso). A presença do defeito stinker ocasionado pela fermentação excessiva dos grãos e que cuja bebida é caracterizada pelo aroma e sabor “estragado” e “podre”, já foi relacionado com o composto dimetilbissulfeto em estudos realizados por Guyot *et al.*(1991).

A alteração das características sensoriais da bebida nas amostras inoculadas com o fungo pode também ser decorrente não somente dos compostos voláteis como também dos

compostos químicos não voláteis, que após o processo de torração, sofrem modificações e/ou interações químicas com outros compostos, dando origem àqueles responsáveis pelas características finais da bebida.

5. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente trabalho foi possível analisar as diferenças existentes em relação à microbiota dos grãos de café cru de duas diferentes regiões do Brasil, bem como compará-la quanto ao tipo de preparo, natural ou descascado e em relação aos diferentes tipos grãos e frutos (cereja, bóia, varreção, imaturos, grãos secos do terreiro e estocagem).

Amostras submetidas à secagem natural, mantidas em contato com o solo (varreção) e secas no pé (bóia) apresentaram maior infecção por fungos e avaliação sensorial negativa. As espécies com maior frequência de isolamento neste caso foram *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus westerdijkiae* e *Fusarium* spp. Logo, a adoção de boas práticas agrícolas como a não permanência dos frutos no pé após atingir o grau de maturidade, evitar o uso de cerejas e grãos que estiveram em contato com o solo e a secagem realizada corretamente em terreiro dos grãos com casca, são práticas desejáveis e recomendadas para que ocorra uma redução na contaminação dos grãos por estas espécies.

As observações quanto à infecção fúngica encontrados neste trabalho ratificaram observações anteriores de nossa equipe, que havia constatado baixa infecção fúngica nas amostras de Minas Gerais e alta infecção e diversidade fúngica nas amostras de Piraju/SP. Nesta região a alta incidência de *Penicillium* spp., posteriormente identificadas nesse trabalho como *Penicillium brevicompactum* e *Penicillium crustosum*, foi evidente, havendo a presença dessas mesmas espécies no café cereja. Possivelmente essas espécies fazem parte da microbiota destes cafés, estando presentes em safras consecutivas nesta região.

O teste de inoculação dos fungos nos grãos de café, seguido da avaliação sensorial, apresentou resultados que confirmaram os efeitos que as espécies estudadas podem causar na qualidade da bebida e foram indicativos de que *Aspergillus foetidus* é responsável por conferir características sensoriais negativas à bebida. Pelo contrário, a presença de *Penicillium brevicompactum* não foi prejudicial à bebida. Vários compostos foram produzidos e identificados tanto no meio de cultura (2-octenal, decanal, undecanal, 2-nonanona, 3-nonen 2-ona, 2-undecanona, 4-metil tiazole, 1-deceno, 1,2-diclobenzeno e limoneno) quanto nos cafés inoculados com esta espécie (1-propanol 2-metil 1-hexanol, 3-octanona e myrcene). Todos estes compostos apresentaram características sensoriais positivas e não alteraram negativamente a qualidade da bebida.

Após a confirmação de que cafés em contato com o solo e secos no pé apresentaram maior infecção fúngica por *Aspergillus foetidus* e que a bebida preparada com cafés inoculados com esta espécie foi prejudicada sensorialmente, a etapa seguinte foi avaliar quais compostos seriam os responsáveis por conferir estas características. *Aspergillus foetidus* no meio de cultura foi capaz de produzir vários compostos com odores desagradáveis como pentil furano com odor de terra, dimetilbissulfeto com odor sulfuroso e 2-butenal com odor pungente e, quando inoculado no café foi detectada a presença de 1-octen 3-ol, com odor de mofo. Em bebida preparada com grãos imaturos, o aroma fermentado foi detectado na análise sensorial e houve uma correlação com a infecção por *Aspergillus foetidus* (40%).

Neste trabalho inicial foi possível avaliar as alterações que algumas espécies fúngicas podem causar no café e na qualidade sensorial da bebida e identificar alguns dos possíveis compostos voláteis responsáveis por conferir estas características. Neste aspecto, o conhecimento da microbiota presente torna-se uma ferramenta bastante útil e pode ser utilizada para prever e/ou completar as informações sobre a qualidade final da bebida.

Contudo mais estudos são necessários visto que várias outras espécies fúngicas estão presentes e o grau de infecção pode variar de acordo com as diferentes regiões produtoras do Brasil, além da importância de se estudar a interação das espécies e ação desta sobre a produção de compostos voláteis. Em relação às espécies de *Penicillium* sp., não foi comprovada a influência benéfica da presença destas espécies na qualidade da bebida e assim mais estudos devem ser realizados. Além disso, uma pesquisa com o objetivo de verificar a influência da temperatura decorrente do processo de torração nos compostos identificados, avaliando se sofrem alguma modificação química ou se persistem nos grãos, também são necessários.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKIYAMA, M.; MURAKAMI, K.; OHTANI, N.; IWATSUKI, K.; SOTOYAMA, K.; WADA, A.; TOKUNO, K.; IWABUCHI, H. & TANAKA, K. Analysis of volatile compounds released during the grinding of roasted coffee beans using solid phase microextraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53: 1961-1969, 2003.

ALVES, E. & CASTRO, H. A. Fungos associados ao café (*Coffea arabica* L.) e sua relação com a bebida. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, 18: 329, 1993.

ALVES, G. L. & FRANCO, M. R. B. Headspace gás chromatography-mass spectrometry of volatile compounds in murici (*Byrsonima crassifolia* L. Rich), *Journal of Chromatography A*. 985: 297-301, 2003.

AMORIM, H.V.; CRUZ, A. R.; ST ÂNGELO, A. J.; DIAS, R. M.; MELO, M.; TEIXEIRA, A. A.; GUTTIEREZ, L. E.; ORY, R. L. Biochemical, physical and organoleptical changes during raw coffee deterioration. *Proceedings of 8th International Colloquium of Coffee*, Abidjan, Paris: ASIC, 1979.

AMSTALDEN, L. C.; LEITE, F.; MENEZES H. C. Identificação e quantificação de voláteis de café através de cromatografia gasosa de alta resolução/espectrometria de massas empregando um amostrador automático de "headspace". *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 21(1): 123-128, 2001.

AQUINO, S.; FERREIRA, F.; RIBEIRO D. H. B.; CORRÊA B.; GREINER, R.; VILLAVICENCIO, A. L. C. H. Evaluation of Viability of *Aspergillus flavus* and aflatoxins degradation in irradiated samples of Maize. *Brazilian Journal of Microbiology*, 36: 352-356, 2005.

AZIZ, N.H. & ABD EL-AAL, S.S. Occurrence of aflatoxin and aflatoxigenic molds in coffee beans and decontamination by gamma-irradiation. *Journal of the Egyptian Veterinary Medical Association*. 49:951-962, 1990.

AZIZ, N.H.; EL-FOULY, M.Z.; ABU-SHADY, M.R.; MOUSSA, L.A.A. Effect of Gamma radiation on the Survival of Fungal and Actinomycetal Florae contaminating Medicinal Plants. *Applied Radiation and Isotopes*, 48(1): 71-76, 1997.

BADE-WEGNER, H.; HOLSCHER, W.; WOLLMANN, R. Volatile compounds associated with the over fermented flavour defects. *Proceedings of 17th ASIC Colloquium*, 176-182, 1997.

BANKS, M.; MCFADDEN, C.; ATKINSON, C. *The World Encyclopedia of Coffee*. London: Annes Publishing Limited, 256p,1999.

1

BARR, J.G. Effects of volatile bacterial metabolites on the growth sporulation and mycotoxin production of fungi. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 27: 324-330, 1976.

BIANCARDI, A. & RIBERZANI, A. Determination of ochratoxin A in cereals and feed by sax-spe clean up and LC fluorimetric detection. *The Journal of Liquid Chromatography*, 19: 2395-2407, 1996.

BICCHI, C.; IORI, C.; RUBIOLO, P & SANDRA, P. Headspace sorptive extraction (HSSE), stir bar sorptive extraction (SBSE) and solid phase microextraction (SPME) applied to the analysis of roasted arabica coffee and coffee brew. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50: 449-459, 2002.

BITANCOURT, A.A., As fermentações e podridões da cereja de café. *Boletim da Superintendência dos Serviços do Café*, 32 (359): 179-1184, 1975.

BORJESSON, T. Volatile fungal metabolites as indicators of mould growth in stored cereals. PhD. Thesis. Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala. ISBN 91-576-4706-2, 1993.

BORJESSON, T.; STOLLMAN, U.; SCHNURER, J. Volatile metabolites produced by six fungal species compared with other indicators of fungal growth on cereal grains. *Applied and Environmental Microbiology*, 58: 2599-2605, 1992.

BORJESSON, T.; STOLLMAN, U.; ADAMEK, P.; KASPERSSON, A. Analysis of volatile compounds for detection of molds in stored cereals. *Cereal Chemistry*, 66: 300-304, 1989.

BORNEHAG, C. G.; BIOMQUIST, G.; GYNTELBERG, F.; JARVHOIM, B.; MALMBERG, P.; NORDVALL, L.; NIELSEN, A.; PERSHAGEN, G.; SUNDELL, L. Dampness in Buildings and Health: Nordic Interdisciplinary Review of the Scientific Evidence on Associations between Exposure to "Dampness" in Buildings and Health Effects. *Indoor Air*, 11 (2): 72-76, 2001.

BULLERMAN, L.B.; SCHOROEDER, L.L.; PARK, K.Y. Formation and control of mycotoxins in food. *Journal of Food Protection*, 47: 637-646, 1994.

CANTERGIANI, E.; BREVARD, H.; KREBS, Y.; FERIA-MORALES, A.; AMADO, R.; YERETZIAN, C. Characterization of the aroma of green Mexican coffee and identification of mouldy/earthy defect. *European Food Research and Technology*, 212: 648-657, 2001.

CARVALHO A.; GARRUTI, R. S.; TEIXEIRA, A. A.; PUPO, L. M.; MÔNACO, L. C. Ocorrência dos principais defeitos do café em várias fases de maturação dos frutos. *Bragantia*, 29(20): 207-220, 1972.

CARVALHO, A. *Principles and practice of Coffee plant breeding for productivity and quality factors: Coffea arabica*. In R. J. Clarke and R. Macrae (eds), *Coffe: Volume 4 – Agronomy*. London: Elsevier Applied Science, pp. 129-165, 1988.

CARVALHO, V.D.; CHAGAS, S.J.R.; SOUZA, S.M.C. Fatores que afetam a qualidade do café. *Inf. Agropecuária*, 18: 5-20, 1997.

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

CLIFFORD, M. N. Chlorogenic acids and other cinnamates nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science Food and Agriculture*, 79: 363-372, 1999.

CLIFFORD, M. N. Chlorogenic acids and other cinnamates nature, occurrence, dietary burden, absorption, and metabolism. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80: 1033-1043, 2000.

CLIFFORD, M. N.; JOHNSTON, K. L.; KNIGHT, S.; KUHNERT, N. Hierarchical scheme for LC-MS identification of chlorogenic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 2900-2911, 2003.

CLIFFORD, M. N. Chlorogenic acids: their complex nature and routine determination in coffee beans. In: CLARKE, J.R.; MACRE, R. *Coffee: Chemistry*. London: Elsevier Science, p. 153-202, 1985.

CURTIS, R.F.; DENNIS, C.; GEE, J.M.; GEE, M.G.; GRIFFITHS, N.M.; LAND, D.G.; PEEL, J.L.; ROBINSON, D. Chloroanisoles as a cause of musty taint in chicken and their Microbiological formation from chlorophenols in broiler house litters. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 25: 811-828, 1974.

DE MARIA, C. A. B.; TRUGO, L. C.; AQUINO NETO, F. R.; MOREIRA, R. F. A.; ALVIANO, C. S. Composition of green coffee water-soluble fractions and identification of volatiles formed during roasting. *Food Chemistry*, 55 : 203-207, 1996.

DENTAN, E. Examen microscopique de grain de café rôté. *Proceedings of the 12th International Colloquium of Coffee*, Montreux, 1987, Paris: ASIC, 1988.

FARAH, A.; MONTEIRO, M.; CALADO, V.; FRANCA, A. S; TRUGO, L. C. Correlation between cup quality and chemical attributes of Brazilian coffee. *Food Chemistry*, 98: 373–380, 2006.

FARAH, A.; DE PAULIS, T.; TRUGO, L. C.; MARTIN, P. R., Effect of Roasting on the Formation of Chlorogenic Acid Lactones in Coffee, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 1505-1513, 2005.

FIEDLER, K.; SCHÜLTZ, E.; GEH, S. Detection of microbial volatile organic compounds (MVOCS) produced by moulds on various materials. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 204: 111-121, 2001.

FILTENBORG, O.; FRISVALD, J.C.; SVENDENSEN, J.A. Simple screening method for molds producing intracellular mycotoxins in pure cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, 45: 581-585, 1983.

FLANNIGAN, B.; MCCABE, E.M.; MCGARRY, F. Allergenic and toxigenic microorganisms in houses. In: Pathogens in the environment. B. Austin ed. *Journal of Bacteriology Symposium Supplement*. 6: 61S-73S, 1991.

FOLSTAR, P.; VAN DER PLAS, H. C.; PILNIK, W.; DE HEUS J. G. Tocopherols in the unsaponifiable matter of coffee bean oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 25: 283-285, 1977.

FRISVAD, J. C. & FILTENBORG, O. Secondary metabolites as consistent criteria in *Penicillium* taxonomy and a synoptic key to *Penicillium* subgenus *Penicillium* pp. 373-384, 1990a. In: *Modern concepts in Penicillium and Aspergillus classification* (eds. R.A. Samson & Pitt) Plenum Press, New York

FRISVAD, J. C.; THRANE, U. Standardized high-performance liquid chromatography of 182 mycotoxins and other fungal metabolites based on alkyphenone retention indices and UV-VIS spectra (diode array detection). *Journal of Chromatography*, 404: 195-214, 1987.

FRISVAD, J. C.; FILTENBORG, O.; THRANE, U. Analysis and screening for mycotoxins and other secondary metabolites in fungal cultures by thin-layer chromatography and high performance liquid chromatography. *Archives of Environment and Contamination Toxicology*, 18: 331-335, 1989

GEE, J.M. & PEE, J.L. Metabolism of 2,3,4,6-tetrachlorophenol by microorganisms from broiler house litter. *Journal of Genetical Microbiology*, 85: 237-243, 1974.

GINZ, M.; ENHELHARDT, U. H. Analysis of bitter fractions of roasted coffee by LC-ESI-MSNsNew chlorogenic acid derivatives. *Proceedings of 16th International Scientific Colloquium of Coffee* (Kyoto), Paris: ASIC, 1995.

GODINO, R. P.; VILELA, E. R.; OLIVEIRA, G. A.; CHAGAS, S. J. R. Variações na cor e na composição química do café (*Coffea arabica* L.) armazenado em coco e beneficiado. *Revista Brasileira de Armazenamento, Especial Café*, 1: 38-43, 2000.

GONÇALVES, J. S. Mudar para Manter: análise do processo de pseudometamorfose da agricultura brasileira. Campinas, 469p. Tese de doutorado – Instituto de Economia, Unicamp, 1997.

GOODNER, K. L. Practical Retention index models of OV-101, DB-1, DB-5 and DB-Wax for flavour and fragrance compounds, *LWT*, 41, p. 951- 958, 2004.

GUICHARDI, E.; MOSANDL, A.; HOLLNAGEL, A.; LATRASSE, A.; HENRY, R. Chiral γ -lactones from *Fusarium poae*. Enantiomeric ratios and sensory differentiation of cis-6- γ -dodecenolactone enantiomers. *Z Lebensm. Unters Forsch*, 193: 26-31, 1991.

GUYOT, B.; COCHARD, B.; VICENT, J. C. Détermination quantitative du diméthylsulfide et du diméthylsulfure dans l'arôme de café. *Café Cacao Thé*, 35 : 49-56, 1991.

HOCKING, A D.; SHAW, K.J.; CHARLEY, N.J.; WHITFIELD, F.B. Identification of an off-flavour produced by *Penicillium solitum* in margarine. *Journal of Food Mycology*. 1: 23-30, 1998.

HUBBAL, J.A.; COLLINS, R.P. A study of factors affecting the synthesis of terpenes by *Ceratocystis variispora*. *Mycologia*, 70: 117-129, 1978.

HUSMAN T. Health effects of indoor-air microorganisms. *Scandinavian Journal of Work and Environmental Health* 22: 5-13, 1996.

ILLY, A. & VIANI, R. *Espresso Coffee: The Science of Quality*. San Diego: Academic Press, 2nd edition, 398p, 2005.

JACOBSEN, T.; HINRICHSEN, L. Bioformation of flavour by *Penicillium candidum*, *Penicillium nalgiovense* and *Geotrichum candidum* on glucose, peptone, maize oil and meat extract. *Food Chemistry*, 60: 409-416, 1997.

JANSSENS, L.; POOLER, H.L.; SCHAMP, N.M.; VANDAMME, E.J. Production of flavours by microorganisms. *Processing Biochemistry*, 27: 195-215, 1992.

JELLEN, H. & WASOWICZ, E. Volatile fungal metabolites and their relation to the spoilage of agricultural commodities, *Food Review International*, 14: 391-426, 1998.

JELLEN, H. H. Use of solid phase microextraction (SPME) for profiling fungal volatile metabolites. *Letters in Applied Microbiology*, 36: 263-267, 2003.

JELLEN, H.; LATUS-ZIETKIEWICZ, D.; WASOWICZ, E.; KAMINSKI, E. Trichodiene as a volatile marker for trichothecenes biosynthesis. *Journal of Microbiological Methods* 31: 45-49, 1997.

JOOSTEN, H.M.L.J.; GOETZ, J.; PITTET, A.; SCHELLENBERG, M.; BUCHELI, P. Production of ochratoxin A by *Aspergillus carbonarius* on coffee cherries. *International Journal of Food Microbiology*, 65: 39-44, 2001.

KAMINSKI, E.; STAWICKI, S.; WASOWICZ, E. Volatile flavour compounds produced by *Aspergillus*, *Penicillium* and fungi imperfect. *Applied Microbiology*, 27: 1001-1004, 1974.

KARAHADIAN, C.; JOSEPHSON, D.B.; LINDSAY, R.C. Volatiles compounds from *Penicillium* sp. contributing must-earth notes to brie and camembert cheese flavours. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 33: 339-343, 1985.

KESHRI, G.; MAGAN, N.; VOYSEY, P. Use the electronic nose for the early detection and differentiation between spoilage fungi, *Letters in Applied Microbiology*, 27: 261-264, 1998.

KESHRI, G.; VOYSEY, P.; MAGAN, N. Early detection of spoilage moulds in bread using volatile production patterns and quantitative enzyme assays. *Journal of Applied Microbiology*, 92: 165-172, 2002.

KLICH, M.A. & PITT, J.I. *A Laboratory Guide to Common Aspergillus species and their Teleomorphs*. Sydney: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, 115p, 1988

KRUG, H.P. Cafés duros II. Um estudo sobre a qualidade dos cafés de varrição. *Revista do Instituto do Café*, 26: 636-638, 1940.

LANCIOTTI, R.; GUERZONI, M.E. Competitive inhibition of *Aspergillus flavus* by volatile metabolites of *Rhizopus arrhizus*. *Food Microbiology*, 10: 367-377, 1993.

LARSEN, T.O. Volatiles in fungal taxonomy. In: *Chemical Fungal Taxonomy*. J.C. Frisvad; P.D. Bridge.; D.K. Arora eds. New York: Marcel Dekker, Inc. 398p, 1998.

LARSEN, F. O.; CLEMENTSEN, P.; HANSEN, M., MALTBAEK; N., LARSEN; T. O., NIELSEN, K. F.; GRAVESEN, S.; SKOV, P. S.; NORN, S. Volatile organic compounds from the indoor mould *Trichoderma viride* cause histamine release from human bronchoalveolar cells. *Inflammation Research*, 47: S5-S6, 1998.

LARSEN, T. O. & FRISVAD, J. C. Comparison of different methods for collection of volatile chemical markers from fungi. *Journal of Microbiological Methods*, 24: 135-144, 1995a.

LARSEN, T. O. & FRISVAD, J. C. Chemosytetics of *Penicillium* based on profiles of volatile metabolites. *Mycological Research*, 99 (10): 1167-1174, 1995b.

LARSEN, T. O. & FRISVAD, J.C. Characterization of volatile metabolites from 47 *Penicillium* taxa. *Mycological Research*, 99: 1153-1166, 1995c.

LESHERMES, P.; COUTURON, E.; MOREAU, N.; PAILARD, M.; LOUARN, J. Inheritance and genetic mapping of self incompatibility in *Coffea canephora*. *Theoretical and Applied Genetics*, 93: 458-462, 1996.

LEVI, C.P.; TRENK, H.L.; MOHR, H.K. Study of the occurrence of ochratoxin A in green coffee beans. *Journal of A.O.A.C.*, 57: 866-870, 1974.

LULLMANN, C. & SILVER, R. Investigation of mono-and disaccharide content of arabica and robusta green coffee using HPLC. *Lebensmittel Gericht Chem.*, 43: 42-43, 1989.

MACRAE, R. Nitrogenous compounds. In R. J. Clarke and R. Macrae (eds), *Coffee: Volume 1 – Chemistry*. Barking: Elsevier Applied Science, 115-152, 1985.

MAGAN N. & EVANS, P. Volatiles as an indicator of fungal activity and differentiation between species, and the potential use of electronic nose technology for early detection of grain spoilage. *Journal of Stored Products Research*, 36: 319-340, 2000.

MARIANI, C. & FEDELI, E. Sterols of Coffee grain of arabica and robusta species. *Rivista Italiana Sostanze Grasse*, 68: 111-115, 1991.

MEILGAARD, M.; CIVILLE, G. V.; CARR, B. T. *Sensory Evaluation Techniques*. Florida/USA: CRC Press, 1987.

MENEZES, H. C. Variação dos monoisômeros e diisômeros do ácido cafeoilquínico com maturação de café. Campinas: UNICAMP, 171p. (Tese – Doutorado em Tecnologia de Alimentos), 1994.

MICCO, C.; GROSSI, M.; MIRAGLIA, M.; BRERA, C. A study of the contamination by ochratoxin A of green and roasted coffee beans. *Food Additive and Contaminants*, 6: 333-339, 1989.

NILSSON, T.; LARSEN, T. O.; MONTANARELLA, L.; MADSEN, J. O. Application of head-space microextraction for the analysis of metabolites emitted by *Penicillium* species. *Journal of Microbiological Methods*, 25: 245-255, 1996.

NUNES, A. M. L.; SOUZA, F. F.; COSTA, J. N. M.; SANTOS, J. C. F.; PEQUENO, P. L. L.; COSTA, R. S. *Cultivo do Café Robusta em Rondônia*, Embrapa Rondônia, Sistemas de Produção, 5, ISSN 1807-1805 Versão Eletrônica dez., 2005

PENTON, Z. Determination of 2,4,6 trichloroanisole in wine with SPME and the 4000GCMS. *Aplication note*, number 74, 2004

PITT, J.I. & HOCKING, A.D. *Fungi and food spoilage*. London: Blackie Academic & Professional, 593p, 1997.

PITT, J.I. *A Laboratory Guide to Common Penicillium Species*. Sydney: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, 187p, 1988.

RAMIREZ, J. Compuestos fenólicos en la pulpa de café: cromatografía de papel de pulpa fresca de 12 cultivares de *Coffea arabica* L. *Turrialba, San José*, 37 (4): 317-323, 1987.

REFAI, M.K.; AZIZ, N.H.; EL-FAR, F.M.; HASSAN, A.A. Detection of ochratoxin produced by *A. ochraceus* in feedstuffs and its control by gamma irradiation. *Applied Radiation and Isotopes*, 7: 617-621, 1996.

RIGITANO, A.; TOSELLO, A.; SOUZA, O. F.; GARRUTI, R. S.; JORGE, J. P. N. Observações preliminares sobre armazenamento de café beneficiado a granel. *Bragantia*. Campinas, Instituto Agrônômico, 23(4): 39-43, 1964.

RIU, M.; MESTRES, M.; BUSTO, O.; GUASH, J. Determination of 2,4,6- trichloroanisole in wines by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-eletron-capture detection. *Journal of Chromatography A*, 977 (1): 1-8, 2002.

RYAN, D.; SHELLIE, R.; TRANCHIDA, P.; CASILLI, A.; MONDELLO, L.; MARRIOTT, P. Analysis of roasted coffee bean volatiles by using comprehensive two-dimensional gas chromatography-time-of flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1054: 57-65, 2004.

SAMSON, R.A. Occurrence of mould in modern living and working environments. *European Journal of Epidemiology*, 1: 54-61, 1985.

SAMSON, R.A.; HOUBRAKEN, J. A. M.P.; KUIJPERS, A. F. A.; FRANK, J. M.; FRISVAD, J. C. New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section Nigri, *Studies in Mycology*, 50: 45-61, 2004.

SANZ, C.; ANSORENA, D.; BELLO J.; CID, C. Optimizing headspace temperature and time sampling for identification of volatile compounds in ground roasted arabica coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49:1364-1369, 2001.

SANZ, C.; MAEZTU, L.; ZAPELENA, MA. J.; BELLO, C.; CID, C. Profiles of volatile compounds and sensory analysis of three blends of coffee: influence of different proportions of arabica and robusta and influence of roasting coffee with sugar. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 82: 840-847, 2002.

SCHNURER, J.; OLSSON, J.; BORJESSON, T. Fungal Volatiles as Indicators of Food and Feeds Spoilage. *Fungal Genetics and Biology*, 27: 209-217, 1999.

SHAHRZAD, S.; BITSCH, I. Determination of some pharmacologically active phenolic acids in juices. *Journal of Chromatography A*, 741: 223-231, 1996.

SILVA, R. F.; PEREIRA, R. G. F. A.; BOREM, F. M.; MUNIZ, J. A. Qualidade do café-cereja descascado produzido na região sul de Minas Gerais. *Ciências Agrotécnicas de Lavras*, 28 (6): 1367-1375, 2004.

SPADONE, J.C.; LIARDON, R. Identification of specific volatile components in Rio coffee beans. *Proceedings of the 12th International Colloquium of Coffee*, Montreux, 1987, Paris: ASIC, 1988.

SPADONE, J.C.; TAKEOKA, G.; LIARDON, R. Analytical investigation of Rio off-flavor in green coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38: 226-233, 1990.

SPEER, K.; KOLLING-SPEER, I. Lipids. In R.J. Clarke and O.G. Vitzthum (eds), *Coffee – Recent Developments*. Oxford: Blackwell Science, pp. 33-49, 2001.

STONE H. & SIDEL, J. L. *Sensory Evaluation Practices*. Academic Press, Inc. London, 311p. 1985.

SUÁREZ-QUIROZ, M.; GONZÁLEZ-RIOS, O.; BAREL, M.; GUYOT, B.; SCHORR-GALINDO, S. & GUIRAUD, J.P. Study of ochratoxin A producing strains in coffee processing. *International Journal of Food Science and Technology*, 39: 501-507, 2004.

SUNESSON, A. L., WOUTER H. J.V., NILSSON, C. A., BLOMQUIST, G., ANDERSSON, B.; CARLSON, R. Identification of Volatile Metabolites from Five Fungal Species Cultivated on Two Media. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(8): 2911–2918, 1995.

SZMRECSÁNYI, T. *Pequena História da Agricultura do Brasil*. São Paulo: Contexto. Cap. 2, 3, 17-48, 1990.

TANIWAKI M. H.; IAMANAKA B. T.; COPETTI M. V.; TEIXEIRA A.A., TEIXEIRA, A. R. R. Toxigenic Fungi and Ochratoxin A in Defective Coffee Beans, 21st International Conference of Coffee Science, 2006.

TANIWAKI, M.H.; PITT, J.I.; TEIXEIRA, A.A.; IAMANAKA, B.T. The source of ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to processing methods. *International Journal of Food Microbiology*, 82: 173-179, 2003.

TEIXEIRA, A. A.; HASHIZUME, H.; NOBRE, G. W.; CORTEZ, J. G.; FAZUOLI, L. C. Efeito da temperatura de secagem na caracterização dos efeitos provenientes de frutos colhidos verdes. *Proceedings of 10th International Scientific Colloquium of Coffee*, 73-80, 1982.

TEIXEIRA, A. A. *Classificação de café - Noções gerais*. Instituto Brasileiro do Café, 36 p., 1970.

TOLEDO, J. L. B. & BARBOZA, A. T. *Classificação e Degustação do Café*. Série Agronegócios. Brasília: Ed. Sebrae. Rio de Janeiro: ABIC, 1998.

URBANO, G.R.; TANIWAKI, M.H.; LEITÃO, M.F.F.; VICENTINI, M.C. Occurrence of ochratoxin A producing fungi in raw Brazilian Coffee. *Journal of Food Protection*, 64: 1226-1230, 2001.

VAN DER STEGEN, G.; JORISSEN, U.; PITTET, A.; SACCON, M.; STEINER, W.; VINCENZI, M.; WINKLER, M.; ZAPP, J., & SCHLATTER, C. Screening of European coffee final products for occurrence of ochratoxin A (OTA). *Food Additives and Contaminants*, 14: 211-216, 1997.

VAN DYCK, P.J.; TOBBACK, P.; FEYS, M.; VAN DE VOORDE, H. Sensitivity of Aflatoxin B1 to ionizing radiation. *Applied and Environmental Microbiology*, 43: 1317-1319, 1982.

VANOS, V. Preliminary microbial ecological studies in Rio coffee beans. *Proceedings of 12nd International Scientific Colloquium of Coffee*, Montreux, 1987, Paris: ASIC, 1987.

VIANI, R. & HORMAN, I. Determination of trigonelline in coffee. *Proceedings of 7th International Scientific Colloquium of Coffee*, 273-278, 1974.

VILELA, E. R.; CHANDRA, P. K.; OLIVEIRA, G. A. Efeito da temperatura e umidade relativa no branqueamento de grãos de café. *Revista Brasileira de Armazenamento, Especial Café*, 1: 31-37, 2000.

WADY, L.; BUNTE, A.; PEHRSON, C.; LARSSON, L. Use of gas chromatography-mass spectrometry solid phase microextraction for the identification of MVOCS from mouldy building materials. *Journal of Microbiological Methods*, 53: 325-332, 2002.

WANG, Y. Sample Preparation/Concentration for Trace Analysis in GC/MS (A study of solid phase microextraction and headspace sampling), Dissertation of Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University, Virginia, 1997.

WURZENBERGER, M. & GROSCH, W. The enzymatic oxidation breakdown of linoleic acid in mushrooms (*Psalliota bispora*). *Z Lebensm Unters Forsch*, 175: 186-190, 1982.

YERETZIAN, C.; JORDAN, A.; BADOUD, R.; LINDINGER, W. From the green bean to the cup of coffee: investigation coffee roasting by online monitoring volatiles. *European Food Research and Technology*, 214: 92-104, 2002.

YOUSSEF, M.B., MAHROUS, S.R., AZIZ, N.H. Effetes of gamma radiation on Aflatoxin B1 production by *Aspergillus flavus* in ground beef stored at 5°C. *Journal of Food Safety*, 19:231-239, 1999.

ZAMBONIN, C. G.; BALEST, L.; BENEDETTO, G. E.; PALMISANO, F. Solid-phase microextraction-gas chromatography mass spectrometry and multivariate analysis for characterisation of roasted coffees. *Talanta*, 66 (1): 261-265, 2005.

ABIC (Associação Brasileira da Indústria de Café). Disponível em: (<http://www.abic.com.br>).
Data de acesso: 12 de agosto de 2009

ICO (International Coffe Organization). Disponível em: (<http://www.ico.org>). Data de acesso:
12 de agosto de 2009

CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento). Disponível em:
(<http://www.conab.org.br>). Data de acesso: 10 de julho de 2009

FLAVORNET. Disponível em: (<http://www.flavornet.org/flavornet.htm>). Data de acesso: 15 de setembro de 2009.

PHEROBASE. Disponível em: (<http://www.pherobase.com>), Data de acesso: 15 de setembro de 2009