



GISLAINE OLIVEIRA

**EFEITO DE DIFERENTES PONTOS DE
TORRAÇÃO E TIPOS DE GRANULOMETRIA
NA CONCENTRAÇÃO DE OCRATOXINA “A”
EM GRÃOS DE CAFÉ**

LAVRAS - MG

2012

GISLAINE OLIVEIRA

**EFEITO DE DIFERENTES PONTOS DE TORRAÇÃO E TIPOS DE
GRANULOMETRIA NA CONCENTRAÇÃO DE OCRATOXINA “A”
EM GRÃOS DE CAFÉ**

Dissertação apresentada a Universidade
Federal de Lavras, como parte das
exigências do Programa de Pós-
Graduação em Ciência dos Alimentos,
para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Luís Roberto Batista

Coorientadores

Dr. Guilherme Prado

Dr. Leandro Carlos Paiva

Dra. Rosemary Gualberto Fonseca Alvarenga Pereira

LAVRAS - MG

2012

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

Oliveira, Gislaine.

Efeito de diferentes pontos de torração e tipos de granulometria
na concentração de ocratoxina “A” em grãos de café / Gislaine
Oliveira. – Lavras : UFLA, 2012.

86 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.

Orientador: Luís Roberto Batista.

Bibliografia.

1. *Aspergillus*. 2. Fungos toxigênicos. 3. Segurança alimentar. 4.
Qualidade. 5. Micotoxinas. I. Universidade Federal de Lavras. II.
Título.

CDD – 664.07

GISLAINE OLIVEIRA

**EFEITO DE DIFERENTES PONTOS DE TORRAÇÃO E TIPOS DE
GRANULOMETRIA NA CONCENTRAÇÃO DE OCRATOXINA “A”
EM GRÃOS DE CAFÉ**

Dissertação apresentada a Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 24 de fevereiro de 2012.

Dr. Leandro Carlos Paiva	IFSMG
Dra. Sara Maria Chalfoun de Souza	EPAMIG
Dra. Rosemary Gualberto Fonseca Alvarenga Pereira	UFLA

Dr. Luís Roberto Batista
Orientador

LAVRAS – MG

2012

Aos meus pais, José Ilicio e Genice,

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, que sempre se sacrificaram e se dedicaram para a conquista dos meus objetivos, obrigada pelo imenso amor, constante estímulo, enorme paciência. Vocês são um exemplo de amor.

A minha irmã, Clesiane, por todo incentivo, estímulo, carinho e por estar sempre ao meu lado, sendo fonte de inspiração para muitos dos meus passos.

A todos os meus familiares, obrigado pelo carinho e apoio.

Ao Luciano, pela paciência e companheirismo. Obrigada por estar ao meu lado em todos os momentos.

Ao meu orientador, Dr. Luís Roberto Batista, por ser paciente e generoso, disposto a oferecer estímulos e, principalmente, percorrer novos caminhos.

Ao Dr. Guilherme Prado, da Fundação Ezequiel Dias, pela confiança e disposição.

Ao prof. Dr. Leandro, por ter me recebido tão bem em Machado e me auxiliado em todo o processo de torração e moagem, além de sempre estar disposto a esclarecer minhas dúvidas.

A professora Dra. Rosemary, por todos os conselhos, sugestões, ensinamentos e disponibilização.

À Dra. Sara, pela atenção, incentivos e disponibilidade.

Ao Edson, do Pólo de Café da UFLA, por toda ajuda e prestatividade.

Às amigas do Laboratório de Micologia e Micotoxinas do DCA, em especial a Daiani, que tanto auxiliou na identificação dos fungos. Muito obrigada pelos conselhos e amizade.

A Katiany e Ariana, minhas amigas queridas, obrigada por toda a ajuda e amizade quando eu mais precisava.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento Ciências dos Alimentos, que permitiram a realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

A todos que, direta ou indiretamente contribuíram, agradeço profundamente e dedico o resultado deste trabalho.

RESUMO

A perda de controle ao longo da cadeia produtiva pode causar alterações indesejáveis nas características dos grãos, permitindo a contaminação por fungos filamentosos e toxigênicos. O estudo foi realizado em condições controladas, tendo como objetivo avaliar o efeito de diferentes pontos de torração e tipos de granulometria na concentração de ocratoxina A em grãos de café torrado e moído, para obter uma bebida de café filtrado seguindo os padrões da ABIC. Foram utilizados grãos de café (*Coffea arabica* L.) classificados como bebida dura, obtidos da Cooperativa Agrícola Alto Rio Grande no município de Lavras, MG. O isolamento dos fungos foi realizado pela Técnica de Plaqueamento Direto em meio dicloran rosa de bengala cloranfenicol (DRBC). Os fungos isolados foram purificados e identificados em meios de cultura e temperatura padronizados. O potencial ocratoxigênico dos isolados foi determinado pelo método Plug Agar. A inoculação dos grãos de café com *Aspergillus ochraceus* foi realizada utilizando-se uma suspensão de esporos de 10^7 UFC/ml. As amostras foram torradas em três pontos diferentes de torração (clara, média e escura) e moídas em três tipos diferentes de granulometria (fina, média e grossa). A quantificação de OTA nos grãos de café cru contaminado e grãos de café torrado e moído foi realizada pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Dos grãos analisados no plaqueamento direto, 97% encontravam-se contaminados com fungos. Destes, 83% foram identificados como pertencentes à *Seção Circumdati* e 14% como fungos pertencentes à *Seção Nigri*. Dos 35 isolados testados, 57% foram produtores de OTA, sendo todos identificados como *Aspergillus ochraceus*. Os resultados revelaram que a OTA foi detectada em 100% das amostras, com concentrações variando de 108,327 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a 3,059 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Em todos os tratamentos foi possível observar uma diferença significativa nos valores residuais de OTA. Tratamentos com granulometria grossa apresentaram menor valor residual de OTA. A interação torração escura com qualquer tipo de granulometria estudada foi a que apresentou os menores valores médios de concentração de OTA, sendo a combinação torração escura e granulometria grossa o tratamento com menor concentração da toxina com 3,060 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Esta amostra continha, em média, 2,83% de OTA residual, obtendo uma redução de 97,17% de OTA. A torração média sofreu maior influência dos diferentes tipos de granulometria, uma vez que apresentou maior diferença entre a estimativa das médias da granulometria fina com a grossa. Os resultados deste estudo demonstram que não apenas a torração, mas a torração e a granulometria são importantes na concentração residual de OTA em grãos de café torrado e moído.

Palavras-chave: Ocratoxina A. *Aspergillus*. Café. Fungos toxigênicos. Qualidade.

ABSTRACT

The loss of control over the supply chain can cause undesirable changes in the characteristics of the grains, allowing contamination and toxigenic fungi. The study was conducted under controlled conditions, in order to study the effect of different roasting degrees and types of grain size on the concentration of ochratoxin A in roasted coffee beans and ground coffee, for a coffee drink filtered according to the standards of ABIC. We used coffee beans (*Coffea arabica* L.) classified hard liquor, obtained from the Cooperativa Agrícola Alto Rio Grande in Lavras-MG. The isolation of fungi was made by Direct Plating Technique with Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol (DRBC). The isolates were purified and identified in culture media and temperature standard. The ochratoxigenic potential was determined by Plug Agar. Inoculation of the coffee beans was made using a spore suspension of 10^7 CFU / ml. The samples were roasted at three different points of roasting (light, medium and dark) and ground into three different types of grain size (fine, medium and coarse). The quantification of OTA in contaminated raw coffee beans and roasted and ground coffee beans was performed by the method of high performance liquid chromatography (HPLC). Of the grains analyzed in direct plating 97% were contaminated with fungi. Of these 83% were identified as belonging to the *Section Circumdati* and 14% as fungi belonging to *Section Nigri*. Of the 35 isolates tested, 57% were OTA producers, all identified as *Aspergillus ochraceus*. The results showed that the OTA were detected in 100% of the samples, with concentrations ranging from 108.327 $\mu\text{g/Kg}$ to 3.059 $\mu\text{g/Kg}$. In all treatments was possible to observe a significant difference in residual values of OTA. Treatments with coarse showed less residual value of OTA. The interaction of dark roast coffee with any type of particle size studied was the one with the lowest average concentration of OTA. As the dark roasted combination coarse treatment with a lower concentration of the toxin with 3.060 $\mu\text{g/kg}$. This sample contained on average 2.83% of residual OTA, obtaining a reduction of 97.17% of OTA. The medium roast suffered the greatest influence of different particle size, since biggest difference between the estimate of the mean particle size with fine to coarse. The results of this study demonstrate that not only the roasting, but roasting and grain size are important in the residual concentration of OTA in roasted coffee beans and ground coffee.

Keywords: Ochratoxin A. *Aspergillus*. Coffee. Toxigenic fungi. Quality

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1	Estrutura química da ocratoxina A	25
----------	---	----

CAPÍTULO 2

Figura 1	a) <i>Aspergillus ochraceus</i> em meio de cultura CYA; b) Estrutura microscópica de <i>Aspergillus ochraceus</i>	59
----------	---	----

ANEXOS

Figura 1	Câmara de Neubauer com os respectivos campos de contagem (ALVES; MORAIS, 1998).....	78
Figura 2	Amostras com torração clara, sendo (a) granulometria fina; (b) granulometria média; (c) granulometria grossa.....	83
Figura 3	Amostras com torração média, sendo (a) granulometria fina; (b) granulometria média; (c) granulometria grossa.....	84
Figura 4	Amostras com torração escura, sendo (a) granulometria fina; (b) granulometria média; (c) granulometria grossa.....	85

LISTA DE GRÁFICOS

CAPÍTULO 2

Gráfico 1	Cromatograma da amostra de café com torração escura e granulometria fina	64
Gráfico 2	Cromatograma da amostra de café com torração escura e granulometria média.....	65
Gráfico 3	Cromatograma da amostra de café com torração escura e granulometria grossa	65

ANEXOS

Gráfico 1	Perfil de torra da amostra com torração clara.....	83
Gráfico 2	Perfil de torra da amostra com torração média.....	84
Gráfico 3	Perfil de torra da amostra com torração escura	85

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1	Diferentes graus de torração, com denominações diferentes encontradas no mercado nacional e internacional, de acordo com o tempo de permanência do café no torrador	31
Tabela 2	Incidência de ocratoxina A em café torrado em diversas partes do mundo.....	34

CAPÍTULO 2

Tabela 1	Valores médios de OTA encontrados nas amostras, percentual de redução, valor residual, temperatura e tempo de torração.....	61
Tabela 2	Resultados da extração da OTA A, em $\mu\text{g}/\text{kg}$, observadas nas 27 unidades experimentais	62
Tabela 3	Análise de variância para os dados de extração de OTA encontrada no café, dados transformados em $\ln y$	62
Tabela 4	Análise de variância para o comportamento da torração para cada granulometria	63
Tabela 5	Teste de Tukey para torração dentro da granulometria fina.....	64
Tabela 6	Teste de Tukey para torração dentro da granulometria média	64
Tabela 7	Teste de Tukey para torração dentro da granulometria grossa.....	65
Tabela 8	Análise de variância para o estudo do comportamento da granulometria para cada tipo de torração	66
Tabela 9	Teste de Tukey para granulometria dentro da torração clara	67
Tabela 10	Teste de Tukey para granulometria dentro da torração média	67
Tabela 11	Teste de Tukey para granulometria dentro da torração escura.....	68

ANEXOS

Tabela 1	Campo de contagem da câmara de Neubauer com as respectivas áreas, volumes e fatores de conversão para ml	80
Tabela 2	Contagem dos esporos.....	80

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1	14
	INTRODUÇÃO GERAL	14
1	INTRODUÇÃO	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1	A cafeicultura no Brasil	17
2.2	Micotoxinas	20
2.3	Principais fungos produtores de OTA em café	22
2.4	Ocratoxina A	24
2.5	Ocratoxina A: riscos à saúde do consumidor	27
2.6	O processo de torração e moagem do café	29
2.7	O efeito da torração e moagem nos níveis de OTA	33
2.8	Determinação de OTA em café	36
	REFERÊNCIAS	39
	CAPÍTULO 2 Ocratoxina A em café com diferentes pontos de torração e tipos de granulometria	48
1	INTRODUÇÃO	50
2	MATERIAL E MÉTODOS	52
2.1	Amostras de café	52
2.2	Isolamento e identificação dos fungos potencialmente ocratoxigênicos de grãos de café	52
2.3	Identificação de espécies dos gêneros <i>Aspergillus</i>	52
2.4	Avaliação do potencial ocratoxigênico dos isolados pelo método plug agar	53
2.5	Preparação e inoculação de esporos do fungo com maior potencial ocratoxigênico em grãos de café	53
2.6	Análise de OTA nos grãos de café cru contaminados	54
2.6.1	Preparo da curva de calibração de ocratoxina A (OTA)	54
2.6.2	Extração	55
2.6.3	Purificação em coluna de imunoafinidade	55
2.6.4	Eluição da ocratoxina A	56
2.6.5	Cromatografia líquida de alta eficiência	56
2.7	Torração e moagem dos grãos de café contaminados	56
2.8	Análise de OTA nos grãos de café contaminados após a torração e moagem	57
2.9	Análises estatísticas	57
3	RESULTADOS	59
4	DISCUSSÃO	69
5	CONCLUSÃO	73

REFERÊNCIAS	74
ANEXOS	77

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO

O café é reconhecido como um dos principais produtos agrícolas exportados pelo Brasil e representa um importante gerador de divisas para o país, além de ter função social, fixando mão de obra no campo e gerando empregos. Atualmente, no Brasil, cerca de 3,5 bilhões de cafeeiros são cultivados em aproximadamente 350 mil propriedades agrícolas, ocupando diretamente quase 1,5 milhão de trabalhadores (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ - ABIC, 2011). O Brasil se destaca em relação à produção do café, como maior produtor e exportador mundial além de ser considerado o maior mercado consumidor dessa *commodity* (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2011).

Vários estudos comprovam que o café, além de saboroso, faz muito bem à saúde, sendo rico em minerais, açúcares, lipídios, aminoácidos e compostos fenólicos (COSTA; DOREA, 2005). A qualidade do café é determinada comercialmente por características físicas dos grãos e sensoriais da bebida. O desenvolvimento de infecções microbianas nos grãos de café pode comprometer tanto o seu aspecto visual quanto o sabor e aroma. Entre os microrganismos associados a frutos e grãos de café, os fungos filamentosos representam o grupo causador de maior dano, pois são grandes produtores de micotoxinas.

Micotoxinas são prejudiciais aos seres humanos e animais e são de grande preocupação em todo o mundo. A ocratoxina A (OTA) é considerada a principal micotoxina associada ao café, produzida principalmente por fungos do gênero *Aspergillus* Seção *Circumdati* e Seção *Nigri*. Os fungos contaminantes

de café produtores de OTA são *Aspergillus ochraceus*, *A. carbonarius* e, raramente, *A. niger*.

Estudos demonstraram que a OTA tem ação nefrotóxica, citotóxica, carcinogênica, teratogêncica e imunossupressora (ABRUNHOSA; SANTOS; VENÂNCIO, 2006; DACHOUPAKAN et al., 2009; GHALI et al., 2009; LINO et al., 2008; SUÁREZ-QUIROZ et al., 2004; ZHANG et al., 2009). Além disso, está relacionada com a nefropatia endêmica dos balcãs, doença degenerativa dos rins, que afeta exclusivamente a população adulta rural (ESTEBAN et al., 2006; LOBEAU et al., 2005).

Os resultados dos estudos da ocratoxina A em alimentos despertaram preocupação da União Europeia, que estabeleceu legislação específica limitando em até 5 µg/kg a concentração de ocratoxina A para grãos de café torrado e moído e 10 µg/kg para café solúvel (COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES - CEC, 2006). No Brasil, a concentração de OTA em café torrado e solúvel é de 10 µg/kg, conforme o estabelecido pela Resolução - RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011 (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA, 2011).

Estes estudos sugerem também a ocorrência de redução das concentrações de OTA durante a torração, no entanto, os mesmos não são conclusivos. Em razão das controvérsias dos resultados sobre a influência do processo de torração nos níveis de OTA, estudos mais criteriosos devem ser realizados para que se tenha uma visão mais aprofundada sobre os efeitos das condições de torração, analisando também os diferentes tipos de granulometria na concentração de OTA.

Devido à frequência de OTA em grãos de café e em produtos derivados e à dificuldade de controlar a qualidade sanitária do produto, o processo de torração e granulometria pode ser uma forma eficaz de obter menores valores residuais de OTA, minimizando os riscos do consumo do café filtrado. Desse

modo, com o presente estudo objetivou-se avaliar o efeito de diferentes pontos de torração e tipos de granulometria na concentração de ocratoxina A em grãos de café torrado e moído, para obter uma bebida de café filtrado seguindo os padrões da ABIC.

No Capítulo 1 encontra-se uma revisão de literatura, na qual são abordados os seguintes temas: a cafeicultura no Brasil, micotoxinas, principais fungos produtores de OTA em café, ocratoxina A, ocratoxina A: riscos à saúde do consumidor, o processo de torração e moagem do café, o efeito da torração e moagem nos níveis de OTA e determinação de OTA em café.

O Capítulo 2 está em formato de artigo e apresenta a incidência e os níveis de OTA em café com diferentes pontos de torração e tipos de granulometria, observando-se, assim, o efeito da torração e da granulometria nos valores residuais de OTA em grãos de café torrado e moído.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A cafeicultura no Brasil

O café chegou ao norte do Brasil, mais precisamente em Belém, em 1727, trazido da Guiana Francesa pelo sargento-mor Francisco de Mello Palheta, a pedido do governador do Maranhão e Grão Pará, que o enviara às Guianas com essa missão. As boas condições climáticas presentes no país facilitaram o cultivo e a cultura se espalhou rapidamente, com produção voltada para o mercado doméstico (SEGGES, 2001).

Em sua trajetória pelo Brasil, o café propagou-se pelos estados do Maranhão, Bahia, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Minas Gerais. Num espaço de tempo relativamente curto, o café passou de uma posição relativamente secundária para a de produto-base da economia brasileira. Desenvolveu-se com total independência, ou seja, apenas com recursos nacionais, sendo, afinal, a primeira realização exclusivamente brasileira que visou à produção de riquezas (ABIC, 2011).

O café é uma das bebidas mais consumidas mundialmente. No Brasil, o consumo de café também se destaca entre as demais bebidas. De acordo com a ABIC (2010), o consumo interno brasileiro de café continua crescendo. No período compreendido entre novembro/2009 e outubro/2010, a ABIC registrou o consumo de 19,13 milhões de sacas, o que representa um acréscimo de 4,03% em relação ao período anterior correspondente (novembro/2008 a outubro/2009), que havia sido de 18,39 milhões de sacas. O consumo per capita foi de 6,02 kg de café em grão cru ou 4,81 kg de café torrado, quase 81 litros para cada brasileiro por ano, registrando uma evolução de 3,5% em relação ao período anterior. Os brasileiros estão consumindo mais xícaras de café por dia e diversificando as formas da bebida durante o dia, adicionando ao café filtrado

consumido nos lares também os cafés expressos, cappuccinos e outras combinações com leite.

As principais justificativas para este aumento estão relacionadas com os esforços do setor cafeeiro em melhorar a qualidade do café produzido, à maior percepção e às exigências dos consumidores por cafés de qualidade, aos investimentos em marketing junto aos consumidores e profissionais da área médica, desmistificando o conceito de que café faz mal à saúde e à consolidação e ao amadurecimento dos segmentos das cafeterias (MOREIRA, 2007).

O café é um produto agrícola de extrema importância econômica e social para o Brasil. Embora, nos últimos anos, a cultura do café tenha se estendido por muitas outras regiões do mundo, o Brasil ainda é o maior produtor mundial, muito à frente do Vietnã (16,5 milhões de sacas), da Indonésia (9,35 milhões de sacas) e da Colômbia (8,1 milhões de sacas) (CONAB, 2011). A concorrência de mercado tem exigido constante preocupação com a qualidade do produto, pois é um dos poucos produtos agrícolas que têm seus preços baseados em parâmetros qualitativos.

Segundo a Organização Internacional do Café - OIC (2011), a exportação mundial de café atingiu 103,1 milhões de sacas de 60 kg no ano cafeeiro 2010/2011 (outubro de 2010 a setembro de 2011). O volume exportado apresentou alta de 9,4% em relação ao ciclo anterior, quando foram exportadas 94,3 milhões de sacas. Trata-se de um recorde histórico. Nesse mesmo período, as exportações da variedade arábica ficaram em 66,6 milhões de sacas, 5,1 milhões de sacas a mais do que no ano anterior. De robusta, foram exportadas 36,6 milhões de saca, volume 3,9 milhões de sacas maior do que na safra anterior.

De acordo com a CONAB (2011), a produção brasileira é estimada em 43,15 milhões de sacas beneficiadas, de arábica e conilon. Este volume é 10,3% ou 4,94 milhões de sacas inferior ao volume de 48,09 milhões de sacas

produzido na safra de 2010. Esta redução se deve principalmente, ao ano de baixa produção devido à bienalidade e à estiagem nos meses de janeiro e fevereiro, que prejudicaram as lavouras que se encontravam na fase de enchimento dos frutos, sobretudo nos estados de Minas Gerais (regiões Sul de Minas e Cerrado Mineiro), na Bahia e em Rondônia.

Os principais estados produtores de café no Brasil são: Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Paraná, Bahia, Rondônia, Mato Grosso, Pará e Rio de Janeiro. A produção de Minas Gerais está estimada em 21.677.922 sacas de café, na safra 2011, com variação percentual de 3,28%, para mais ou para menos. A produtividade média do estado atingiu 21,68 sacas de café por hectare. Em comparação com a safra anterior, a estimativa sinaliza uma redução da produção cafeeira em 13,82%. Este decréscimo se deve, basicamente, à bienalidade negativa da cultura, em que pesa a tendência de inversão da bienalidade fisiológica dos cafezais nas regiões da Zona da Mata, Centro Sul e Serra da Mantiqueira, refletindo a frustração da produção na safra 2010, em razão das adversidades climáticas ocorridas ao longo da fase produtiva das lavouras (CONAB, 2011).

O café não possui apenas cafeína, mas também potássio, zinco, ferro, magnésio e diversos outros minerais, embora em pequenas quantidades. O grão do café também possui aminoácidos, proteínas, lipídeos, além de açúcares e polissacarídeos. O principal segredo é que o café tem uma quantidade significativa de polifenóis antioxidantes, chamados ácidos clorogênicos (COSTA; DOREA, 2005). Durante a torração do café, esses ácidos clorogênicos formam novos compostos bioativos: os quinídeos. É nessa etapa também que as proteínas, aminoácidos, lipídeos e açúcares formam os quase mil compostos voláteis responsáveis pelo aroma característico do café e é toda essa composição que faz do café uma bebida natural e saudável (ABIC, 2011).

Como qualquer outro produto, o café está susceptível à contaminação por microrganismos. O desenvolvimento de infecções microbianas nos grãos de café compromete tanto o aspecto visual quanto o sabor e aroma, além de influenciar a qualidade e produzir micotoxinas (BATISTA et al., 2003).

2.2 Micotoxinas

Os fungos são capazes de produzir, em condições naturais e laboratoriais, metabólitos secundários tóxicos. Os metabólitos secundários são compostos biossintetizados e excretados por meio de um conjunto de vias metabólicas (que constituem o metabolismo secundário), mas que não são essenciais para o crescimento e a sobrevivência do organismo. Estão presentes no meio de cultura ou substrato em que os fungos estão se desenvolvendo e recebem a denominação de micotoxinas. Os produtos metabólicos secundários, quando ingeridos com os alimentos, causam alterações biológicas prejudiciais tanto ao homem como aos animais (SABBADINI et al., 2009; VISOTTO et al., 2008).

Embora a infecção fúngica dos alimentos deva ocorrer para que haja formação de micotoxinas, alimentos embolorados nem sempre estão contaminados com micotoxinas (HUSSEIN; BRASEL, 2001; TANIWAKI et al., 2003). Vale ressaltar que nem todos os fungos são potencialmente toxigênicos e não são todos os metabólitos secundários de fungos que são tóxicos. Os fungos podem se desenvolver no campo, durante o cultivo, a colheita e a estocagem, devido a fatores intrínsecos, ou seja, inerentes ao substrato, e a fatores extrínsecos, inerentes às condições que envolvem o substrato (PITTET, 2001).

Aproximadamente 20 tipos de micotoxinas, produzidas por diferentes espécies, são encontradas com frequência em quantidades suficientes para constituírem verdadeiro risco para a saúde alimentar, embora existam

aproximadamente 300 micotoxinas diferentes identificadas (SARTORI et al., 2006).

As micotoxinas podem ser encontradas em vários produtos agrícolas. Os principais estão descritos no Quadro 1.

Quadro 1 Principais micotoxinas encontradas em produtos agroalimentares

Produtos agrícolas	Micotoxinas
Amendoins	Aflatoxinas (B1, B2, G1 e G2), ácido clicopiazônico
Café	Ocratoxina A
Carnes e ovos	Patulina, citrinina, ocratoxina A, aflatoxina M1
Cereais	Desoxinivalenol, nivalenol, toxina T-2, zearalenona, fumonisinas, ocratoxina A, citrinina
Figos	Ocratoxina A
Frutos secos	Aflatoxinas (B1, B2, G1 e G2), ocratoxina A
Maçãs	Patulina
Milho	Aflatoxinas (B1, B2, G1 e G2), desoxinivalenol, nivalenol, zearalenona, fumanisinas, toxina T-2, citrinina, ocratoxina A
Produtos lácteos	Aflatoxina M1, ocratoxina A
Sementes oleaginosas	Aflatoxinas (B1, B2, G1 e G2)
Uvas passas	Ocratoxina A

Fonte: Abruñhosa (2008)

Pode-se observar, no Quadro 1, que as micotoxinas mais encontradas em alimentos são as aflatoxinas e as ocratoxinas (ABRUNHOSA, 2008).

Para Jarvis e Miller (2005), as micotoxinas de maior relevância para a saúde de animais e humanos são: as aflatoxinas, produzidas por fungos do gênero *Aspergillus*, como *A. flavus* e *A. parasiticus*; as ocratoxinas produzidas por espécies pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* e as fusariotoxinas, que possuem como principais representantes os tricotecenos, a zearalenona e as fumonisinas, produzidas por diversas espécies do gênero *Fusarium*. Dentre as micotoxinas, a OTA é a que apresenta maior relevância

para o café, por apresentar limites de níveis de ocorrência (PIMENTA; VILELA, 2003).

Segundo Vasanthi e Bhat (1998), em todas as etapas de produção devem-se tomar medidas preventivas para reduzir o risco de micotoxinas em produtos agrícolas, desde o plantio, a colheita, o transporte e a estocagem da matéria-prima até o processamento do produto final.

2.3 Principais fungos produtores de OTA em café

De acordo com Silva et al. (2008), os principais fungos produtores de OTA são *Penicillium verrucosum*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus sulphureus*, *Aspergillus sclerotiorum* e, raramente, *Aspergillus niger*. São três os principais fungos produtores de OTA que estão associados ao café: *A. carbonarius*, *A. ochraceus* e, raramente, *A. niger*.

Atualmente, sabe-se que a OTA é produzida por outras espécies de fungos pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, entretanto, sua presença em amostras de café tem sido atribuída, principalmente, à ocorrência de espécies do gênero *Aspergillus* pertencentes à *Seção Circumdati* e à *Seção Nigri* (CHALFOUN; PARIZZI, 2008). Segundo Chalfoun e Batista (2006), fungos produtores de OTA em café são encontrados com maior frequência na *Seção Circumdati*, especialmente *A. ochraceus*. A espécie *Penicillium verrucosum* é reconhecida como produtora de ocratoxina A, entretanto, alguns trabalhos citam também *P. viridicatum* como responsável pela produção desta micotoxina (PITT; HOCKING, 1997).

Os fungos produtores de micotoxinas estão presentes nos ambientes das lavouras, no preparo e no armazenamento do café e sua relação com a qualidade e a segurança do produto final depende das condições ambientais, do manejo da cultura e do processamento pós-colheita (BATISTA et al., 2003). A

contaminação dos grãos de café pode ocorrer nas fases de processamento, principalmente durante a lavagem, a fermentação e a secagem (TANIWAKI et al., 2003; URBANO et al., 2001). A secagem é uma das rotas de contaminação por espécies de *Aspergillus* ocratoxigênicos e, conseqüentemente, de contaminação com OTA (BUCHELI; TANIWAKI, 2002). O tipo de terreiro de secagem do café é importante nesta contaminação, sendo o terreiro de terra o mais favorável (MORAES; LUCHESE, 2003).

Conforme Silva (2008), as instalações e as condições de armazenamento das tulhas também precisam ser levadas em consideração, nas quais se observa grande acúmulo de poeira proveniente do processo de beneficiamento. Isso pode acarretar a disseminação de fungos ocratoxigênicos de uma safra para outra ou agravar as contaminações já ocorridas, dependendo do tempo de armazenamento. Além do risco de produzir OTA, fungos que crescem em grãos estocados podem reduzir a taxa de germinação ao longo do tempo, com perda de carboidratos, proteínas e óleo total, e induz o aumento de umidade e a quantidade de ácidos graxos livres, e outras mudanças químicas (DUARTE; PENA; LINO, 2009).

Aspergillus ochraceus, que é o maior produtor de ocratoxina em café, desenvolve-se em temperatura entre 8 °C e 37 °C (temperatura ótima 24-31 °C), atividade de água mínima de 0,76 a 25 °C (aw ótima 0,95-0,99) e pH entre 3-10 (PITT; HOCKING, 1997). Apesar de *Aspergillus ochraceus* desenvolver-se a partir de 0,76 de atividade de água, a ocratoxina é produzida a partir de 0,85 (sendo 0,97 a aw ótima). A temperatura em que ocorre a produção da toxina situa-se entre 12 °C e 37 °C (ótima de 25 °C) e o pH ótimo de produção entre 5-6 (MOSS, 1996).

Umidade, temperatura, tipo de substrato e alguns outros fatores desempenham importante papel no desenvolvimento de fungos produtores de OTA (TANIWAKI et al., 2003).

De acordo Suárez-Quiroz et al. (2005), os fungos ocratoxigênicos podem ser eliminados quando removido o mesocarpo, um importante substrato para o seu desenvolvimento. A colonização interna pelos fungos pode ser explicada por danos causados por insetos, ácaros ou condições climáticas adversas. Outra explicação é a ocorrência da ruptura de estruturas da parede celular por alterações nas pectinas, celuloses, hemiceluloses e ligninas nos frutos. Estes compostos conferem uma estrutura mais rígida aos frutos do café e a degradação natural torna os frutos mais susceptíveis à ocorrência fúngica (BATISTA; CHALFOUN, 2007).

Batista et al. (2009) avaliaram a ocorrência de OTA em grãos de café processados por diferentes métodos e verificaram que as frações boia e varrição apresentaram os maiores níveis de contaminação por fungos toxigênicos e OTA, quando secos em terreiro de terra. Esse estudo demonstrou que a colheita e as operações de pré-processamento geram produtos com características e riscos diferentes de exposição a esta contaminação. O maior risco de exposição à contaminação do café foi caracterizado, portanto, pelo contato do fruto com o solo, constituído pelo café de varrição e por manejo pós-colheita inadequado, durante a secagem em terreiro de terra. Campos et al. (2009) também verificaram que o café com permanência prolongada no solo apresentou elevada ocorrência de *A. ochraceus* e níveis muito elevados de OTA, no cerrado mineiro e baiano.

2.4 Ocratoxina A

Entre as ocratoxinas e análogos que compõem o grupo, foi relatada a ocorrência de ocratoxina A, ocratoxina B e ocratoxina C. A ocratoxina A (OTA) caracteriza-se por apresentar fluorescência verde quando exposta à luz ultravioleta e tem uma molécula de cloro em sua estrutura, responsável pelo

caráter tóxico (EDWARDS; O'CALLAGHAN; DOBSON, 2002). A ocratoxina B apresenta fluorescência azulada, não apresentando toxicidade devido à ausência da molécula de cloro. A ocratoxina C, com fluorescência verde, constitui um etil éter da ocratoxina A, sendo muito menos tóxica que essa.

A fluorescência da OTA é utilizada para a revelação em cromatografia de camada delgada (CCD) e para a sua detecção por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (ABRUNHOSA, 2008).

Segundo Marin (2005), as OTA são um grupo de sete derivados de isocumarina ligada a uma amina que, por sua vez, está unida a um grupo β -fenilalanina (FIGURA 1).

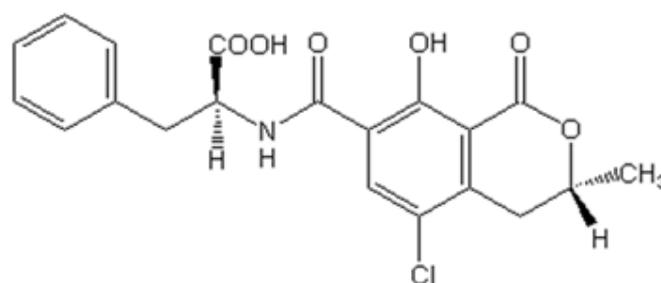


Figura 1 Estrutura química da ocratoxina A
Fonte: Marin (2005)

A OTA é um metabólito secundário produzido por fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. As principais espécies de fungos do gênero *Aspergillus* produtores de OTA no café são *A. ochraceus*, *A. carbonarius*, *A. niger* e *A. westerdijkiae* (GILBERT; ANKLAM, 2002; MORELLO et al., 2007). De acordo com Moss (1996), a principal espécie produtora de OTA é *A. ochraceus*.

Os fungos produtores de ocratoxina pertencentes ao gênero *Penicillium* são *P. brevicompactum*, *P. crustosum*, *P. olsonii* e *P. oxalicum*, sendo a

principal *P. verrucosum* (GOLLUCKE; TANIWAKI; TAVARES, 2004; VEGA et al., 2006).

A OTA pode ser encontrada em muitos alimentos, como cereais (trigo, aveia, cevada, milho), vinho, suco de uva, cerveja, frutas secas (passas), soja, cacau, chá, temperos, produtos de origem animal e café verde, torrado e instantâneo (ALMEIDA et al., 2007; FUJJI et al., 2007).

Vários países estabeleceram limites máximos de OTA para diversos cereais e outros produtos. Em 1999, nos Estados Unidos, a recomendação de ingestão máxima era de 100ng/kg por semana; já no Canadá houve uma maior restrição, de 1,5-5,7 ng/kg por dia. Em 2007 ocorreu uma reavaliação desses valores e a Europa abaixou o limite para 1,14-2,24 ng/kg ao dia. A União Europeia também introduziu limites de OTA para o café, como 5 µg/kg de café torrado e 10 µg/kg de café solúvel. Certos países impuseram limites também para café verde de 8-20 µg/kg (LEONG et al., 2007). No Brasil, a concentração de OTA em café torrado e solúvel é de 10 µg/Kg, estabelecida pela Resolução-RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011 (ANVISA, 2011).

Segundo Joosten et al. (2001), mais de 80% da OTA originalmente presente nos grãos de café verde é destruída durante o processo para a obtenção de café solúvel sob condições industriais. Estima-se que uma xícara de café solúvel contenha, aproximadamente, 2,5 ng de OTA.

Em pesquisa desenvolvida por Chalfoun e Batista (2006), os cafés tipo cereja, cereja despolpado, cereja descascado, verde e seco na planta mostraram-se com uma contaminação de OTA de até 5,0 µg/kg, em sua grande maioria e as frações de café mistura, boia e, principalmente, varrição, apresentam índices de contaminação por OTA acima de 5,0 µg/kg. Para Chalfoun e Batista (2002), para que o café possa ser comercializado como alimento com segurança, a primeira condição seria sua qualidade, que envolveria boa aparência, sabor, aroma, valor nutricional e segurança do ponto de vista toxicológico.

Segundo Gelli et al. (2001), a segurança do alimento é a maior preocupação que a indústria alimentícia enfrenta. O sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) é indicado pelo *Codex Alimentarius* para garantir a segurança de produtos alimentícios. Assim, a aplicação dos princípios da APPCC depende de base científica quanto aos fatores relacionados à produção de OTA em toda cadeia produtiva do café, até o armazenamento do grão beneficiado, para assim caracterizar quais medidas de controle e de caráter preventivo poderão ser utilizadas e como.

No Brasil, a seleção tradicional de cafés de boa qualidade para atender às exportações inclui uma classificação sensorial que elimina qualquer material com significativa presença de fungos e OTA acima dos níveis admitidos. Assim, cafés contaminados são improváveis de serem aceitos e comercializados porque odores e sabores indesejáveis os tornam inaceitáveis. Entretanto, cafés sem o mesmo rigor de seleção podem apresentar níveis significativos de OTA. A preocupação reside, portanto, no consumo interno do país, uma vez que se consome o excedente do produto exportável (CHALFOUN; PARIZZI, 2008).

Os estudos realizados com café brasileiro destinado ao mercado brasileiro indicaram baixa contaminação por OTA, mas o ideal é a ausência desse contaminante (LEONI et al., 2001). De forma semelhante, não se têm registros de OTA acima dos limites aceitáveis nos últimos anos.

2.5 Ocratoxina A: riscos à saúde do consumidor

A OTA permanece no organismo por um longo período, tendo uma meia vida de 35 dias em humanos, de 72 a 120 horas em porcos e de 77 horas em animais ruminantes (AL-ANATI; PETZINGER, 2006).

Conforme Richard (2007), em humanos, a OTA é excretada lentamente, devido à sua grande afinidade com algumas proteínas plasmáticas, sua

circulação entero e sua reabsorção da urina (LINO et al., 2008). A OTA acumula no tecido adiposo e este processo também auxilia na sua lenta eliminação pelo organismo (PITT, 2000).

Os efeitos tóxicos da OTA parecem estar relacionados à sua capacidade de inibir a síntese protéica, competindo com a fenilalanina na reação catalisada pela fenilalanil-tRNA sintetase e outros sistemas que exigem esse aminoácido, e aumenta a peroxidação lipídica, levando a um maior dano celular e mitocondrial (DIRHEIMER, 1996; TURNER; SUBRAHMANYAM, 2009). Esta micotoxina é, ainda, considerada nefrotóxica, citotóxica, carcinogênica, teratogênia e imunossupressora (ABRUNHOSA; SANTOS; VENÂNCIO, 2006; DACHOUPAKAN et al., 2009; GHALI et al., 2009; LINO et al., 2008; SUÁREZ-QUIROZ et al., 2004; ZHANG et al., 2009). Tem sido investigada também como indutora de mutações gênicas por meio de mecanismos genotóxicos ainda não muito claros (RINALDI et al., 2007).

Após ser ingerida, a OTA é absorvida pelo trato gastrointestinal, entra na circulação e liga-se às proteínas do soro. A maior toxicidade da OTA em mamíferos está relacionada aos rins, o que se deve, em parte, à reabsorção ativa pelo túbulo proximal, no sistema de transporte de ânions, acumulando altas concentrações de OTA neste órgão (FUNGARO; SARTORI, 2009).

Os rins são o principal alvo da atividade tóxica da OTA, no entanto, o fígado também pode sofrer danos quando exposto a altos níveis da toxina (BUSBY JUNIOR; WOGAN, 1981). Estudos têm demonstrado que a OTA está relacionada com a nefropatia endêmica dos balcãs, doença degenerativa dos rins que afeta exclusivamente população adulta rural (ESTEBAN et al., 2006; LOBEAU et al., 2005).

A nefropatia endêmica é uma doença renal que ocorre em algumas áreas rurais da Bósnia, Bulgária, Croácia, Kosovo, Romênia e Sérvia (PERAICA et al., 2008). A etiologia da doença é ainda desconhecida, apesar de haver um

número razoável de hipóteses. Suas principais características são a distribuição geográfica limitada, a ocorrência em famílias de agricultores, a alta mortalidade por uremia e a alta incidência de tumores uroteliais (MILETIC-MEDVED; PERAICA; DOMIJAN, 2005).

Para Zhang et al. (2009), pesquisas têm indicado que a OTA pode afetar também o sistema neural. Os mecanismos moleculares de sua neurotoxicidade ainda não estão bem elucidados, embora o potencial neurotóxico da OTA seja conhecido.

A OTA foi classificada, pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC), como pertencente ao grupo 2B, ou seja, possível carcinogênico humano (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER - IARC, 1993).

2.6 O processo de torração e moagem do café

O sabor e o aroma que caracterizam a bebida do café são resultantes da combinação de centenas de compostos químicos produzidos pelas reações que ocorrem durante a torração. A torração é responsável pela transformação do grão verde em grão torrado, para a confecção da bebida. O controle do tempo e da temperatura utilizados durante o processo é fator relevante na qualidade final do produto (ABIC, 2011).

O processo de torração do café acontece de forma simplificada, quando os grãos de café são torrados e tornam-se amarelados, perdendo grande parte de água quando expostos a 100 °C. A partir de 120-130 °C, a cor do grão passa a ser castanha. No decorrer do processo de torração, à temperatura de 150 °C ocorre o desprendimento de um odor de óleo. Quando se atinge a temperatura de 180 °C, os gases de combustão começam a se desenvolver sob a forma de uma fumaça branco-azulada com desprendimento de dióxido (CO₂) e monóxido (CO)

de carbono. A cor muda para marrom e o volume dos grãos aumenta e estes se tornam porosos e quebradiços. De acordo com o grau de torração, ocorrem maior ou menor perda de peso dos grãos e aumento do volume. Na torração brasileira (escura), ocorre, normalmente, perda de peso de 20% e, deste total, de 9% a 10% são decorrentes da perda de água, cerca de 1% devido à eliminação de cascas e de 10% a 12% são decorrentes das perdas de substâncias voláteis (COELHO, 2000).

Conforme Clarke e Macrae (1985), esta etapa é de suma importância, pois, dependendo do tempo e da temperatura em que o grão é exposto, o aroma é definido. A maioria das substâncias aumenta em concentração durante a torração dos grãos, enquanto outras diminuem devido à degradação.

Os pontos de torração são determinados tanto para fins comerciais quanto científicos e varia de indivíduo para indivíduo. Para auxiliar na padronização da medida colorimétrica, a Specialty Cup Association of América (SCAA) utiliza um sistema de discos colorimétricos obtidos após experimentos científicos sob condições controladas de torração, nos quais foi determinada uma progressão linear, baseada na caramelização do açúcar e nos pontos de torração mais comumente encontrados no mercado. Este sistema foi denominado *AGTRON/SCAA roast classification color disc system* (sistema de classificação de pontos de torra por discos colorimétricos).

Na Tabela 1 encontram-se os diferentes graus de torração, com denominações diferentes encontradas no mercado nacional e internacional, de acordo com o tempo de permanência do café no torrador (FARAH, 2004).

Tabela 1 Diferentes graus de torração, com denominações diferentes encontradas no mercado nacional e internacional, de acordo com o tempo de permanência do café no torrador

Classificação da torra	Nome correspondente no mercado nacional	Nome correspondente ao mercado internacional	Nº. referência na escala Agtron/SCAA
Muito clara	-----	-----	95
Clara	-----	Cinamon	85
Moderadamente clara	Americana	American	75
Média-clara ou moderadamente clara	Convencional-menos	City	65
Média	Convencional ou torrado e moído Convencional-menos	Full city	55
Média escura ou moderadamente escura	Convencional-mais	Vienna	45
Escura – Coloração marrom-escuro, começando a soltar óleo.	Extraforte	French or Italian	35
Muito escura, grãos quase pretos e bem oleosos	Extraforte/queimado	Spanish	25

Fonte: Adaptado de Farah (2004)

Segundo Melo (2011), existem três características importantes que indicam a qualidade da bebida em função do grau de torração: a acidez, o aroma e o corpo. Em torração mais clara, a característica predominante é a acidez, mas, à medida que a torração se intensifica, essa característica diminui, deixando ressaltar as demais. O aroma e o corpo são mais acentuados em níveis de torração intermediários e, à medida que o grão torna-se mais escuro, alguns componentes são carbonizados prevalecendo o sabor de queimado.

Grãos torrados com umidades superiores a 3% b.u. podem amolecer com facilidade, prejudicando o processo de moagem. A qualidade do ar utilizado nos sistemas de resfriamento também deve ser observada, de forma a garantir que, por ocasião do insuflamento, o mesmo esteja livre de contaminação física, química e/ou microbiológica (CARVALHO; CHALFOUN, 1985).

Segundo a ABIC (2011), a diferenciação do tipo de moagem é realizada por meio do uso da porcentagem de retenção em peneiras granulométricas nº 12 (1,70 mm), nº 16 (1,18 mm), nº 20 (0,84 mm), nº 30 (0,59 mm), utilizando-se um equipamento granutest, com agitação por 10 minutos. Os cafês moídos de granulometria fina são aqueles com 0% de retenção nas peneiras nº 12 e 16, 70% de retenção nas peneiras nº 20 e 30 e 30% no fundo. Os de granulometria média, com 7% de retenção nas peneiras nº 12 e 16, 73% de retenção nas peneiras nº 20 e 30 e 20% no fundo. Granulometria grossa quando alcançar 33% de retenção nas peneiras nº 12 e 16, 55% de retenção nas peneiras nº 20 e 30 e 12% no fundo.

Durante o processo de moagem, pode ocorrer a perda de compostos voláteis imprescindíveis na composição do aroma da bebida, caso seja gerada uma grande quantidade de calor (MOREIRA; TRUGO, 2000).

2.7 O efeito da torração e moagem nos níveis de OTA

Conforme Taniwaki et al. (2003), no meio científico, ainda não há um consenso com relação à influência da torração na eliminação de OTA presente no café. Dados na literatura dão evidências de que o processo de torração seja eficiente na redução da OTA, porém, ainda há a carência de estudos mais conclusivos sobre os efeitos dos diversos estágios de torração, moagem e formas de preparação da bebida na estabilidade da toxina.

Taniwaki et al. (2003) reuniram, em um estudo, dados que mostram a presença da ocratoxina A em café torrado, como pode ser visto na Tabela 2.

Tabela 2 Incidência de ocratoxina A em café torrado em diversas partes do mundo

País de Origem	Nºamostras positivas/Nºtotal amostras	% (amostras positivas/total)	Faixa de OTA (µg/kg)	Referências
Japão	5/68	7,3	3,2-17,0	Tsbouchi et al. (1988)
Inglaterra	17/20	85,0	0,2-2,1	Patel et al. (1997)
Europa	?/484	-	<0,5 ^a - 8,2	Stegen et al. (1997)
Dinamarca	11/11	100	0,1-3,2	Jorgensen (1998)
Espanha	29/29	100	0,22-5,64	Burdespal e Legarda (1998)
Estados Unidos	9/13	69,2	0,1-1,2	Trucksess et al. (1999)
Brasil	23/34	67,6	0,3-6,5	Leoni et al. (2000)
Brasil	41/47	87,2	0,99-5,87	Prado et al. (2000)
Alemanha	22/67	32,8	0,3-3,3	Wolff (2000)
Alemanha	273/490	55,7	0,21-12,1	Otteneder e Majerus (2001)
Canadá	42/71	59,1	0,1-2,3	Lombaert et al. (2002)
Hungria	22/38	57,8	0,17-1,3	Fazekas et al. (2002)

Fonte: Taniwaki et al. (2003)

Durante o processo de torração, os principais fatores que contribuem para a redução de OTA a níveis aceitáveis são tempo e temperatura, além da concentração da toxina presente no grão cru (SCHLATTER et al., 1994).

É fato que determinadas condições podem interferir no desenvolvimento do fungo e, conseqüentemente, na velocidade e na quantidade da OTA produzida durante o armazenamento do grão cru. Condições de umidade e temperatura favoráveis ao crescimento do fungo e à produção da toxina, armazenamento por longos períodos de tempo e a prevalência de espécies fúngicas com alto poder de produção podem aumentar significativamente a concentração da OTA durante o período de armazenamento do grão cru. Portanto, nenhum procedimento de monitoramento de concentração de OTA no recebimento da matéria-prima será válido se o mesmo não for feito durante o período em que o produto estiver armazenado.

A grande dificuldade em garantir a eliminação da toxina durante a torração é demonstrada em diversas pesquisas, por todo o mundo, que confirmam a presença de OTA em café torrado. Esses estudos também demonstram que, apesar da contaminação inicial se dar no campo, a formação da OTA pode acontecer em toda a cadeia, em cada estágio de produção.

Apesar da eficiência na redução de OTA, níveis altos de torração não devem ser utilizados de forma indiscriminada, uma vez que outros compostos termolábeis benéficos à saúde humana, tais como os ácidos clorogênicos, também podem ser destruídos. Os ácidos clorogênicos são os principais compostos fenólicos do café (4%-12% da composição do café verde), formado por esterificação de uma ou duas moléculas de certos ácidos trans (FARAH et al., 2004).

2.8 Determinação de OTA em café

A determinação de qualquer micotoxina envolve amostragem, extração e limpeza, separação, detecção, quantificação e confirmação da identidade. A etapa de maior importância é a amostragem, uma vez que a contaminação por micotoxina é sempre heterogênea. Outra etapa importante é a escolha do solvente extrator, para que não haja perdas do analito e uma limpeza adequada deste extrator para que não remova a micotoxina em estudo (EGMOND, 1996; SCOTT, 1995).

De acordo com Fujji, Sataque e Hirooka (2002), existem diversas metodologias analíticas para a detecção de ocratoxina A. Dentre elas, destacam-se as técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) e diferentes modalidades de ensaio imunoenzimático com ênfase em cromatografia de imunoafinidade. Geralmente, para a extração da OTA, são utilizados solventes orgânicos puros ou combinados com soluções de bicarbonato de sódio ou outros sais nos quais a extração ocorre por meio de uma mistura de metanol e solução de bicarbonato de sódio. O extrato diluído com tampão fosfato é aplicado em coluna de imunoafinidade e, em seguida, a coluna é lavada com água, finalizando com a eluição da OTA com metanol. O eluato é injetado em cromatógrafo líquido de alta eficiência com detecção por fluorescência e utilização de coluna analítica de fase reversa C18.

Estudos otimizaram técnicas de *clean up* por extração em fase sólida para análise de ocratoxina no café torrado por HPLC, reduzindo a presença de possíveis interferentes e melhorando a resolução dos picos obtidos de OTA (SIBANDA; SAEGER; PETEGHEM, 2002).

Para extração de amostra de café torrado é utilizada a extração líquido-líquido com água, solventes orgânicos, mistura de sais e ácidos, seguida de *clean*

up com cartuchos recheados por fase sólida (EFS), no qual são utilizadas, principalmente, as colunas de imunoafinidade. Devido à complexidade da matriz café, faz-se necessário um *clean up* adequado do extrato, a fim de remover as substâncias interferentes, como os lipídeos, que podem prejudicar a extração da substância de interesse (ABIC, 2010; COMMISSION REGULATION - EC, 2005; FUJJI et al., 2007; SFORZA; DALL'ASTA; MARCHELLI, 2006; VARGAS; SANTOS; PITTET, 2005).

Cantafora et al. (1983) introduziram a HPLC para separar e quantificar OTA em café verde, utilizando uma extração com bicarbonato de sódio e metanol, seguida de etapa desengordurante, partição e passagem por coluna de celite, tendo sido empregada a cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência, cujo limite de detecção foi de aproximadamente 0,2 Pg/kg.

Terada et al. (1986) descreveram um método para análise de café verde, torrado, instantâneo em pó e café coado, utilizando extração com bicarbonato de sódio e metanol, seguida de partição e eluição por coluna de fase reversa (octadecilsilano) e HPLC com detecção de fluorescência, cujo limite de detecção foi de aproximadamente de 2 µg/kg para grãos de café, 5 µg/kg para café instantâneo e 0,2 Pg/kg para café coado (BULLERMAN et al., 2003; TANIWAKI et al., 2003).

A HPLC é uma técnica sensível que apresenta alto poder de separação e cuja eficiência depende da etapa de pré-limpeza e do tipo de detector utilizado. Apesar de esta técnica, quando acoplada ao detector de fluorescência, ser sensível, ela pode apresentar problemas analíticos como a coeluição dos analitos com interferentes e também deslocamento do tempo de retenção, que pode gerar resultados errôneos. Entretanto, estes problemas podem ser solucionados com ajuste cromatográfico adequado (TANIWAKI et al., 2003).

Atualmente, a metodologia oficial da Association of Official Analytical Chemists International (AOAC) para o café verde e torrado é a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência. Esta técnica é a mais utilizada devido à fluorescência natural da ocratoxina A (VARGAS et al., 2005; VEGA et al., 2006).

O método utilizado para análise de OTA em café verde, pelo Ministério da Agricultura Pecuária e do Abastecimento (BRASIL, 2000), baseia-se na extração com solventes orgânicos, purificação da toxina com coluna de imunoafinidade e detecção e quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência. No entanto, a crescente demanda para a detecção e a quantificação da OTA em alimentos, especialmente no café, devido às barreiras técnicas às quais este produto vem sendo submetido, requer a utilização de técnicas analíticas cada vez mais sensíveis e seletivas, a fim de evitar um resultado falso positivo durante as análises. Dessa forma, a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas é a técnica que combina a alta capacidade de separação com elevada seletividade e sensibilidade.

REFERÊNCIAS

ABRUNHOSA, L. J. **Estratégias para o controle de ocratoxina A em alimentos**. 2008. 236 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química e Biológica) - Universidade do Minho, Minho, 2008.

ABRUNHOSA, L. J.; SANTOS, L.; VENÂNCIO, A. Degradation of ochratoxin A by proteases and by a crude enzyme of *Aspergillus niger*. **Food Biotechnology**, New York, v. 20, n. 3, p. 231-242, Dec. 2006.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução RDC n. 7**, de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre Limites Máximos Tolerados (LMT) para micotoxinas em Alimentos. Brasília, 2011. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 29 nov. 2011.

AL-ANATI, L.; PETZINGER, E. Immunotoxic activity of ochratoxin A. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, Oxford, v. 29, n. 1, p. 79-90, Jan. 2006.

ALMEIDA, A. P. et al. Ochratoxin A in Brazilian instant coffee. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 38, n. 2, p. 300-303, Apr./June 2007.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ. **História do café**. Disponível em: <<http://www.abic.com.br>>. Acesso em: 29 nov. 2011.

_____. **Estatísticas**: indicadores da indústria de café do Brasil. Disponível em: <<http://www.abic.com.br/exportação>>. Acesso em: 16 jun. 2010.

BATISTA, L. R.; CHALFOUN, S. M. Incidência de ocratoxina A em diferentes frações do café (*Coffea arabica* L.): bóia, mistura e varrição após secagem em terreiros de terra, asfalto e cimento. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 3, p. 804-813, maio/jun. 2007.

BATISTA, L. R. et al. Ochratoxin A in coffee beans (*Coffea arabica* L.) processed by dry and wet methods. **Food Control**, Guildford, v. 20, n. 9, p. 784-790, Sept. 2009.

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

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 9**, de 12 de março de 2000. Metodologia analítica para determinação de ocratoxina A por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em café verde, milho e feijão. Brasília, 2009. Disponível em: <<http://www.cidasc.sc.gov.br/html/legislacao/INSTRU%C7%C3O%20NORMATIVA%20N%C3%93%20DE%2013%20DE%20MAR%C7O%20DE%202000%20.pdf>>. Acesso em: 29 nov. 2011.

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

BULLERMAN, L. B. Ochratoxins. In: CABALLERO, B.; TRMGO, L. C.; FINGLAS, P. (Ed.). **Encyclopedia of food sciences and nutrition**. 2nd ed. London: Academic, 2003. v. 6, p. 4080-4108.

BUSBY JUNIOR, W. F.; WOGAN, G. N. Ochratoxins. In: SHANK, R. C. (Ed.). **Mycotoxins and Nitroso compounds: environmental risks**. Boca Raton: CRC, 1981. v. 2, p. 129-136.

CAMPOS, R. da S. et al. Fungos micotoxigênicos e ocratoxina A em cafés com permanência prolongada na planta e no solo, colhidos nas regiões do cerrado mineiro e baiano. **Coffee Science**, Lavras, v. 4, n. 2, p. 136-148, abr./jun. 2009.

CANTÀFORA, A. et al. Determination of ochratoxin A in coffee beans using reversed-phase high performance liquid chromatography. **La Revista Della Società Italiana di Scienza Dell Alimentazione**, Rome, v. 12, n. 2, p. 103-108, 1983.

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

CHALFOUN, S. M.; BATISTA, L. R. Incidência de Ocratoxina A em diferentes frações de grãos de café (*Coffea arabica* L.). **Coffee Science**, Lavras, v. 1, n. 1, p. 28-35, jan./mar. 2006.

_____. O papel dos microrganismos na qualidade e segurança do café. In: ENCONTRO SUL MINEIRO DE CAFEICULTURA, 8.; SIMPÓSIO DE PESQUISA CAFEIEIRA DO SUL DE MINAS, 3., 2002, Lavras. **Anais...** Lavras: EMATER/EPAMIG/UFLA, 2002. p. 200.

CHALFOUN, S. M.; PARIZZI, F. C. Fungos toxigênicos e micotoxinas em café. In: BORÉM, F. M. (Ed.). **Pós-colheita do café**. Lavras: UFLA, 2008. p. 512-543.

CLARKE, R. J.; MACRAE, R. **Coffee chemistry**. London: Elsevier Applied Science, 1985. v. 1, 42 p.

COELHO, K. F. **Avaliação química e sensorial da qualidade do café de bebida estritamente mole após a inclusão de grãos defeituosos**. 2000. 77 p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000.

COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. **Commission regulation n° 1881/2006**: setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Brussels, 2006. 364 p.

COMMISSION REGULATION. EC n° 123/2005, of 26 of January of 2005. **Official Journal of the European Union**, Dordrecht, n. 25, p. 3-5, 2005.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Segundo levantamento grãos safra 2011-2012**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 24 nov. 2011.

COSTA, T. H. M.; DOREA, J. G. Novos fatos e velhos mitos sobre o café. **Brasília Médica**, Brasília, v. 42, n. 3/4, p. 15-20, set. 2005.

DACHOUPAKAN, C. et al. Study of the phenotypic and genotypic biodiversity of potentially ochratoxigenic black aspergilli isolated from grapes. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 132, n. 1, p. 14-23, Jan. 2009.

DIRHEIMER, G. Mechanistic approaches to ochratoxin toxicity. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 13, n. 7, p. 45-48, Aug. 1996.

DUARTE, S. C.; PENA, A.; LINO, C. M. Ochratoxina A non-conventional sources: a review. **Microchemical Journal**, New York, v. 93, n. 2, p. 115-120, Nov. 2009.

EDWARDS, S. G.; O'CALLAGHAN, J.; DOBSON, A. D. W. PCR-based detection and quantification of mycotoxigenic fungi. **Mycological Research**, London, v. 106, n. 9, p. 1005-1025, Sept. 2002.

EGMOND, H. P. van. Analytical methodology and regulations for ochratoxin A. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 13, p. 11-13, 1996. Supplement.

ESTEBAN, A. et al. Effect of water activity on ochratoxin A production by *Aspergillus niger* aggregate species. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 108, n. 2, p. 188-195, Apr. 2006.

FARAH, A. **Distribuição nos grãos, importância na qualidade da bebida e biodisponibilidade dos ácidos clorogênicos do café**. 2004. 198 p. Tese (Doutorado em Ciência de alimentos) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004.

FUJII, S. et al. A comparison between enzyme immunoassay and HPLC for Ochratoxin A detection in green, roasted and instant coffee. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 50, n. 2, p. 349-359, Mar. 2007.

FUJII, S.; SATAQUE, E. Y.; HIROOKA, E. Y. Ochratoxina A em café: controle metodológico analítico com ênfase à inovação no contexto de segurança alimentar. **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 23, n. 2, p. 273-292, 2002.

FUNGARO, M. H. P.; SARTORI, D. An overview on molecular markers for detection of ochratoxigenic fungi in coffee beans. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 52, p. 1-9, Nov. 2009. Special number.

GELLI, D. S. et al. Aplicação dos princípios do sistema HACCP/APPCC para identificação e controle de fatores que favorecem a produção de ocratoxina em café das regiões Sul e Sudeste do Brasil, São Paulo, Rio de Janeiro e Paraná. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 2., 2001, Vitória. **Anais...** Brasília: EMBRAPA Café, 2001. p. 724-730.

GHALI, R. et al. CLAE determination of ochratoxin A in high consumption Tunisian foods. **Food Control**, Guildford, v. 20, n. 8, p. 716-720, Aug. 2009.

GILBERT, J.; ANKLAM, E. Validation of analytical methods for determining mycotoxins in foodstuffs. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 21, n. 6, p. 468-469, 2002.

GOLLUCKE, A. P. B.; TANIWAKI, M. H.; TAVARES, D. Q. Survey on ochratoxin A in Brazilian green coffee destined for exports. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 4, p. 641-645, out./dez. 2004.

HUSSEIN, H. S.; BRASEL, J. M. Toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, Limerick, v. 167, n. 1, p. 101-134, Mar. 2001.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Ochratoxin A**: some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and micotoxins. Lyon, 1993. 452 p. (Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans, 56).

JARVIS, B. B.; MILLER, J. D. Mycotoxins as harmful indoor air contaminants. **Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 66, n. 4, p. 367-372, Nov. 2005.

JOOSTEN, H. M. L. J. et al. Production of ochratoxin A by *Aspergillus carbonarius* on coffee cherries. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 65, n. 1, p. 39-44, Feb. 2001.

LEONG, S. L. et al. Ochratoxin A production Aspergilli in vietnamese green coffee beans. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 45, n. 3, p. 301-306, Sept. 2007.

LEONI, L. A. B. et al. Ochratoxin A in Brazilian green coffee. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 21, n. 1, p. 105-107, jan./mar. 2001.

LINO, C. M. et al. Levels of ochratoxin A in serum from urban and rural Portuguese populations and estimation of exposure degree. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 3, p. 879-885, Mar. 2008.

LOBEAU, M. et al. Development of a new clean-up tandem assay column for the detection of ochratoxin A in roasted coffee. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 538, n. 1/2, p. 57-61, May 2005.

MARIN, F. Z. La ocratoxina A: un problema emergente. **Enólogos**, Madrid, v. 34, p. 21-24, 2005.

MELO, W. L. B. **A importância da informação sobre o grau de torra do café e sua influência nas características organolépticas da bebida**. Disponível em: <http://watts.cnptia.embrapa.br/publicacoes/CT58_2004.pdf>. Acesso em: 14 mar. 2011.

MILETIC-MEDVED, M.; PERAICA, M.; DOMIJAN, A. M. Recent data on endemic nephropathy and related urothelial tumors in Croatia. **Wiener Klinische Wochenschrift**, Hannover, v. 117, n. 17, p. 604-609, Sept. 2005.

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

MOREIRA, M. Mais um café por favor. **Jornal do Café**, Rio de Janeiro, n. 157, p. 6-10, 2007.

MOREIRA, R. F. A.; TRUGO, L. C. Componentes voláteis do café torrado: parte II, compostos alicíclicos e aromáticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 23, n. 2, p. 195-203, jul. 2000.

MORELLO, L. G. et al. Detection and quantification of *Aspergillus westerdijkiae* in coffee 102 beans based on selective amplification of beta-tubulin gene by using real-time PCR. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 119, n. 3, p. 270-276, Nov. 2007.

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

ORGANIZAÇÃO INTERNACIONAL DO CAFÉ. **Sobre o café**. Disponível em: <<http://www.cafemoraes.com.br>>. Acesso em: 24 nov. 2011.

PERAICA, M. et al. The involvement of micotoxins in the development of endemic nephropathy. **Wiener Klinische Wochenschrift**, Hannover, v. 120, n. 13/14, p. 402-407, Mar. 2008.

PIMENTA, C. J.; VILELA, E. R. Composição microbiana ocratoxina A no café (*Coffea arabica* L.) submetido diferentes tempos de espera antes da secagem. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 6, p. 1315-1320, nov./dez. 2003.

PITT, J. I. Toxigenic fungi: which are important? **Medical Mycology**, Oxford, v. 38, n. 1, p. 17-22, Dec. 2000.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. 2nd ed. London: Blackie Academic & Professional, 1997. 593 p.

PITTET, A. Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds: a decade in review. In: COE, W. J. et al. (Ed.). **Mycotoxins and Phycotoxins in perspective at the turn of the millennium**. Wageningen: Centraalbureau vöör Schimmelcultures, 2001. p. 153-172.

RICHARD, J. L. Some major mycotoxins and their mycotoxicoses an overview. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 119, n. 1/2, p. 3-10, Oct. 2007.

RINALDI, G. et al. Effect of red winw on ochratoxin A toxicity in intestinal Caco-2/TC7 cells. **Toxicology In Vitro**, Oxford, v. 21, n. 2, p. 204-210, Mar. 2007.

SABBADINI, A. M. et al. Ocorrência de fungos toxicológicos em grãos coletados no município de campo mourão e a relação destes com o desenvolvimento de doenças. In: ENCONTRO INTERNACIONAL DE PRODUÇÃO CIENTÍFICA CESUMAR, 6., 2009, Maringá. **Anais...** Maringá: CESUMAR, 2009. Disponível em: <<http://www.cesumar.br/epcc2009/trabalhos.php>>. Acesso em: 10 fev. 2010.

SARTORI, D. et al. PCR methods for the detection of ochratoxin producing fungal species in coffee beans. **Research in Microbiology**, Paris, v. 157, n. 4, p. 350-354, 2006.

SCHLATTER, J. et al. Ochratoxin A and coffee. In: ANNUAL ASSEMBLY OF THE SWISS SOCIETY OF FOOD AND ENVIRONMENTAL CHEMISTRY, 106., 1994, Oberägeri. **Proceedings...** Oberägeri: SFEC, 1994. 1 CD-ROM.

SCOTT, P. M. Mycotoxin methodology. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 12, n. 3, p. 395-403, June 1995.

SEGGES, J. H. **Focalizando o café e a qualidade**. Seropédica: UFRRJ, 2001. 126 p.

SFORZA, S.; DALL'ASTA, C.; MARCHELLI, R. Recent advances in mycotoxin determination in food and feed by hyphenated chromatographic techniques: mass spectrometry. **Mass Spectrometry Reviews**, Chichester, v. 25, n. 1, p. 54-76, 2006.

SIBANDA, L.; SAEGER, S.; PETEGHEM, C. van. Optimization of solid-phase cleanup prior to liquid chromatographic analysis of ochratoxin A in roasted coffee. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 959, p. 327-330, 2002.

SILVA, A. B. **Identificação de riscos e perigos no processo de torra e moagem de café visando a obtenção de produtos seguros e de qualidade.** 2008. 76 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

SUÁREZ-QUIROZ, M. L. et al. Effect of chemical and environmental factors on *Aspergillus ochraceus* growth and toxigenesis in green coffee. **Food Microbiology**, London, v. 21, n. 6, p. 629-634, Dec. 2004.

_____. Effect of the post-harvest processing procedure on OTA occurrence in artificially contaminated coffee. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 103, n. 3, p. 339-345, Sept. 2005.

TANIWAKI, M. H. et al. The source of ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to processing methods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 82, n. 2, p. 173-179, Apr. 2003.

TERADA, H. et al. Liquid chromatographic determination of ochratoxin A in coffee beans and coffee products. **Journal of Association Official of Analytical Chemistry**, Arlington, v. 69, n. 6, p. 960-964, Dec. 1986.

TURNER, N. W.; SUBRAHMANYAM, S. S. A. P. Analytical methods for determination of mycotoxins: a review. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 632, n. 2, p. 168-180, Jan. 2009.

URBANO, G. R. et al. Occurrence of ochratoxin A: producing fungi in raw Brazilian coffee. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 64, n. 8, p. 1226-1230, Aug. 2001.

VARGAS, E. A.; SANTOS, E. A.; PITTET, A. Determination of ochratoxin A in green coffee by immunoaffinity column cleanup and liquid chromatography: collaborative study. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 88, n. 3, p. 773-779, 2005.

VASANTHI, S.; BHAT, R. V. Mycotoxins in foods: occurrence, health & economic significance & food control measures. **Indian Journal Medical Research**, New Delhi, v. 108, n. 5, p. 212-224, Nov. 1998.

VEGA, F. E. et al. Penicillium species endophytic in coffee plants and ochratoxin A production. **Mycologia**, New York, v. 98, n. 1, p. 31-36, Apr. 2006.

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

ZHANG, X. et al. Ochratoxin A induces apoptosis in neuronal cells. **Genes and Nutrition**, New York, v. 4, n. 1, p. 41-48, Jan. 2009.

CAPÍTULO 2

Ocratoxina A em café com diferentes pontos de torração e tipos de granulometria

RESUMO

Micotoxinas são metabólitos secundários, prejudiciais aos seres humanos e animais. Este estudo foi realizado em condições controladas, tendo como objetivo avaliar o efeito de diferentes pontos de torração e tipos de granulometria na concentração de ocratoxina A em grãos de café torrado e moído, para obter uma bebida de café filtrado seguindo os padrões da ABIC. Foram analisadas amostras de café quanto ao teor de ocratoxina A (OTA), sendo uma amostra de café verde inoculado e nove amostras de café torradas em três pontos diferentes de torração (clara, média e escura) e moídas em três tipos diferentes de granulometria (fina, média e grossa). A quantificação de OTA das amostras foi realizada pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção por fluorescência. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANAVA) e teste Tukey, a 5% de probabilidade. Dos grãos analisados no plaqueamento direto, 97% encontravam-se contaminados com fungos. Destes, 83% foram identificados como pertencentes à Seção *Circumdati* e 14% como fungos pertencentes à Seção *Nigri*. Dos 35 isolados testados, 57% foram produtores de OTA, sendo todos identificados como *Aspergillus ochraceus*. Os resultados revelaram que a OTA foi detectada em 100% das amostras, com concentrações variando de 108,327 µg/kg a 3,059 µg/kg. Em todos os tratamentos foi possível observar uma diferença significativa nos valores residuais de OTA. Tratamentos com granulometria grossa apresentaram menor valor residual de OTA. A interação torração escura com qualquer tipo de granulometria estudada foi a que apresentou os menores valores médios de concentração de OTA, sendo a combinação torração escura e granulometria grossa o tratamento com menor concentração da toxina, com 3,060 µg/kg. Esta amostra continha, em média, 2,83% de OTA residual, obtendo-se uma redução de 97,17% de OTA. A torração média sofreu maior influência dos diferentes tipos de granulometria, uma vez que apresentou maior diferença entre a estimativa das médias da granulometria fina com a grossa. Os resultados deste estudo demonstram que não apenas a torração, mas a torração e a granulometria são importantes na concentração residual de OTA em grãos de café torrado e moído.

Palavras-chave: Torração. Granulometria. Ocratoxina A. Segurança Alimentar. Ocratoxina A.

ABSTRACT

Mycotoxins are secondary metabolites, which are harmful to humans and animals. This study was conducted under controlled conditions, in order to study the effect of different roasting degrees and types of grain size on the concentration of ochratoxin A in roasted coffee beans and ground coffee for a coffee drink filtered according to the standards of ABIC. Coffee samples were analyzed on the content of ochratoxin A (OTA), and a sample of green coffee samples inoculated and nine coffee roasted at three different points of roasting (light, medium and dark) and ground into three different particle size (fine, medium and coarse). The quantification of OTA samples were analyzed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) with fluorescence detection. The data were subjected to analysis of variance (ANOVA) and Tukey test at 5% probability. Of the grains analyzed in direct plating 97% were contaminated with fungi. Of these 83% were identified as belonging to the *Section Circumdati* and 14% as fungi belonging to *Section Nigri*. Of the 35 isolates tested, 57% were OTA producers, all identified as *Aspergillus ochraceus*. The results showed that the OTA were detected in 100% of the samples with concentrations ranging from 108.327 $\mu\text{g/Kg}$ to 3.059 $\mu\text{g/Kg}$. In all treatments was possible to observe a significant difference in residual values of OTA. Treatments with coarse showed less residual value of OTA. The interaction of dark roast coffee with any type of particle size studied was the one with the lowest average concentration of OTA. As the dark roasted combination coarse treatment with a lower concentration of the toxin with 3.060 mg / kg. This sample contained on average 2.83% of residual OTA, obtaining a reduction of 97.17% of OTA. The medium roast suffered the greatest influence of different particle size, since biggest difference between the estimate of the mean particle size with fine to coarse. The results of this study demonstrate that not only the roasting, but roasting and grain size are important in the residual concentration of OTA in roasted coffee beans and ground coffee.

Keywords: Roasting. Particle size. Ochratoxin A. Food Safety. ochratoxin A.

1 INTRODUÇÃO

As exigências no controle de qualidade e nas condições higiênico-sanitárias dos produtos são fundamentais e estão se tornando cada vez mais rigorosas, principalmente para os produtos destinados à alimentação humana, atraindo cada vez mais a atenção e a preocupação dos consumidores.

A qualidade do café é determinada comercialmente por características físicas dos grãos e sensoriais da bebida. Além de saboroso, o café faz muito bem à saúde, sendo rico em minerais, açúcares, lipídios, aminoácidos e compostos fenólicos (COSTA; DOREA, 2005). O desenvolvimento de infecções microbianas nos grãos de café pode comprometer tanto o seu aspecto visual quanto o sabor e o aroma. Entre os microrganismos associados a frutos e a grãos de café, os fungos filamentosos representam o grupo causador de maior dano, pois são grandes produtores de micotoxinas.

As micotoxinas são compostos químicos tóxicos produzidos por fungos filamentosos, prejudiciais aos seres humanos e animais. Os grupos de micotoxinas que ocorrem com maior frequência em alimentos são as aflatoxinas, as ocratoxinas e as fusariotoxinas.

O café tem sido alvo de pesquisas que buscam verificar o potencial toxigênico de fungos e, principalmente, detectar a presença de ocratoxinas nos grãos crus e torrados. As três principais espécies de fungo produtores de ocratoxina A (OTA) que estão associados ao café são *A. carbonarius*, *A. ochraceus* e, raramente, *A. niger*. A produção de OTA pode acontecer no processamento pós-colheita, durante o transporte ou no armazenamento dos grãos. Ela tem ação nefrotóxica, teratogênica, carcinogênica, imunossupressora e está relacionada com a nefropatia endêmica dos balcãs.

Os resultados dos estudos da ocratoxina A em alimentos despertaram preocupação da União Europeia, que estabeleceu legislação específica limitando

em até 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a concentração de ocratoxina A para grãos de café torrado e moído e 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para café solúvel (COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES - CEC, 2006). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA (2011) estabeleceu, como limite máximo de acratoxina A, até 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ em café torrado e solúvel. Estes estudos sugerem também a ocorrência da redução das concentrações de OTA durante a torração, no entanto, os mesmos não são conclusivos.

Devido à controvérsia de resultados sobre a influência do processo de torração nos níveis de OTA, estudos mais criteriosos devem ser realizados para que se tenha uma visão mais aprofundada sobre os efeitos das condições de torração, analisando também os diferentes tipos de granulometria na concentração de OTA, uma vez que o tamanho das partículas pode influenciar o poder de extração. Desse modo, no presente estudo, objetivou-se avaliar o efeito de diferentes pontos de torração e tipos de granulometria na concentração de ocratoxina A em grãos de café torrado e moído, para obter uma bebida de café filtrado seguindo os padrões da ABIC.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostras de café

Foram utilizados grãos de café (*Coffea arabica* L.) da safra 2009/2010, classificados como bebida dura, obtidos por meio da Cooperativa Agrícola Alto Rio Grande, no município de Lavras, MG. Para a realização de todas as etapas do projeto foram utilizados, aproximadamente, 20 kg de café.

2.2 Isolamento e identificação dos fungos potencialmente ocratoxigênicos de grãos de café

Para o isolamento de fungos contaminantes em grãos de café, foi utilizada a técnica de plaqueamento direto em meio de cultura DRBC (Merck) (dicloran rosa bengal cloranfenicol), sendo 100 grãos de café sem desinfecção superficial e 100 grãos com desinfecção superficial com álcool 70% e hipoclorito de sódio a 1%, para a identificação dos fungos presentes no interior dos grãos, conforme descrito por Samson et al. (2000). As placas foram incubadas, a 25 °C, por 7 dias, e os resultados foram expressos em porcentagem de grãos contaminados por fungos filamentosos, conforme Pitt e Hocking (1997).

2.3 Identificação de espécies dos gêneros *Aspergillus*

Para a purificação das culturas de fungos toxigênicos, foram realizadas repicagens sucessivas em meio *malt agar* (MA) (extrato de malte) e lâminas foram preparadas para a identificação dos gêneros dos fungos.

A partir das culturas puras, as espécies do gênero *Aspergillus* foram identificadas e incubadas em meio czapeck yeast agar (CYA), incubados às temperaturas de 25 °C e 37 °C, por 7 dias e *malt extract agar* (MEA), a 25 °C, por 7 dias. Após o crescimento, foram observadas as características macroscópicas e microscópicas, descritas conforme Klich (2002).

2.4 Avaliação do potencial ocratoxigênico dos isolados pelo método plug agar

Os isolados da Seção *Circumdati* foram inoculados em meio *yeast extract sucrose agar* (YES) e os da Seção *Nigri*, em meio CYA, a 25 °C, por 7 dias, conforme Filtenborg e Frisvad (1980). Em seguida, um disco da colônia pura de cada isolado foi colocado em pontos equidistantes na placa de cromatografia de camada delgada, sendo testados, no máximo, 12 isolados diferentes ao mesmo tempo. Foram utilizados 10 µL de solução padrão de OTA (Sigma-Aldrich) adicionados em um ponto pré-determinado da placa de cromatografia. A fase móvel foi composta por tolueno, acetato de etila e ácido fórmico 90% (60:30:10). Após a eluição, a placa foi colocada para secar em capela de fluxo laminar. A confirmação quanto à produção das micotoxinas foi feita sob luz ultravioleta de λ 366 nm em cromatovisor Camag (UF-Betrachter). Os isolados considerados produtores de OTA apresentaram um RF (fator de retenção) e um spot de fluorescência semelhante ao do padrão da micotoxina.

2.5 Preparação e inoculação de esporos do fungo com maior potencial ocratoxigênico em grãos de café

Aspergillus ochraceus isolados da amostra foram inoculados em 3 placas grandes contendo extrato de malte ágar (MEA) e incubados, a 25 °C, por

7 dias. Após o crescimento do fungo, foram adicionados, em cada placa, 40 ml de água destilada a 0,1% de tween 80 e, com auxílio de uma alça de drigalski, fez-se a raspagem dos esporos da superfície do meio. Esta suspensão foi filtrada em gases e, em seguida, adicionados 200 ml de água a 0,1% de tween 80, obtendo-se, assim, 240 ml de inóculo. A concentração de esporos de 10^7 UFC/ml foi obtida utilizando-se a câmara de Neubauer (Anexo A).

Para a etapa de inoculação, foram utilizados 6 kg de café esterilizados em autoclave, sendo divididos em 3 bandejas. Para cada bandeja com 2 kg de café foram adicionados 240 ml do inóculo. Além disso, foi adicionada água para alcançar a umidade adequada. Para o desenvolvimento do fungo e a produção da OTA, a umidade deve ser de, no mínimo, 18%. Em seguida, com o auxílio de um bastão de vidro, a amostra foi homogeneizada e, em seguida, os grãos foram colocados em sacos de aniagem e armazenados em caixa de isopor, por 30 dias, borrifando-se água diariamente. Após 30 dias, todos os grãos foram homogeneizados e secos em terreiro, até atingir a umidade de 11%, para posterior análise da OTA.

2.6 Análise de OTA nos grãos de café cru contaminados

As análises de OTA por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) foram realizadas no Laboratório de Micotoxinas e Micologia, da Fundação Ezequiel Dias, em Belo Horizonte, MG. Para extração e quantificação da OTA, foi utilizada a metodologia descrita por Vargas e Santos (2005).

2.6.1 Preparo da curva de calibração de ocratoxina A (OTA)

Utilizando uma solução estoque (SE) de padrão da OTA, com concentração de 120,144 $\mu\text{g/mL}$ – determinada por espectrofotometria –

preparou-se uma solução intermediária (SI) de concentração 1,2014 μ g/mL, obtida por meio da diluição da SE em cem vezes (pipetando-se 10 μ L da SE e adicionando-se 990 μ L de tolueno:ácido acético 99:1 v/v).

A partir da SI foi preparada uma solução de trabalho (ST) diluída dez vezes (pipetando-se 200 μ L da SE, evaporando-se em atmosfera de N₂ e ressuspendendo-se em 2.000 μ L de fase móvel), obtendo-se uma concentração de 120,144 ng/mL. A partir da ST foi elaborada, por diluições sucessivas, a curva de calibração, na faixa de 3,0036 a 180,216 ng \square mL

2.6.2 Extração

Foram pesados, em erlenmeyer de 500 mL, 12,5 g da amostra de café, em triplicata, e adicionados de 200 mL de solução metanol:bicarbonato de sódio 3% (1:1, v/v). O erlenmeyer foi fechado com rolhas de silicone e o sistema submetido à agitação mecânica vigorosa, por 30 minutos. Após 2 minutos de descanso, as amostras foram filtradas em papel Whatman n° 4 e, em seguida, refiltrados em microfibras Whatman GF/B de 47 mm de diâmetro, sob vácuo. Pipetaram-se 10 mL (pipeta volumétrica), que foram acrescidos de 90 mL de tampão PBS.

2.6.3 Purificação em coluna de imunoafinidade

Foram aplicados os 100 mL do extrato diluído pela IAC Ochraprep® - Rhône, em um fluxo de 2-3 mL \cdot min⁻¹, com auxílio de vácuo. Em seguida, a coluna foi lavada com 10 mL de água deionizada e secada sob vácuo por, aproximadamente, 30 segundos.

2.6.4 Eluição da ocratoxina A

Adaptou-se à IAC uma seringa de vidro de 20 mL, adicionando-se 1 mL de metanol grau HPLC à coluna. O *back-flushing* foi realizado e o metanol permaneceu em contato com o recheio da coluna por 3 minutos. O eluato foi recolhido em frasco de 4 mL. O procedimento foi repetido por mais duas vezes e o eluato foi evaporado em banho-maria, à temperatura de 40 °C-50 °C, sob atmosfera de N₂.

2.6.5 Cromatografia líquida de alta eficiência

A separação e a quantificação da OTA foram realizadas em sistema de cromatografia líquida de alta eficiência Shimadzu acoplado a detector de fluorescência (excitação de 333 nm e emissão de 476 nm), utilizando-se o software o CLASS-VP. A coluna utilizada foi uma C18 Shim-pack VP-ODS de dimensões de 4,6 mm x 250 mm e partículas de 4,6 µm de diâmetro. A pré-coluna utilizada foi uma Shim-pack G-ODS, de dimensões de 4 mm x 10 mm e partículas de 5 µm de diâmetro. A coluna foi estabilizada com fase móvel (acetonitrila:metanol:solução aquosa de ácido acético glacial (35:35:30, v/v), a um fluxo de 0,8 mL.min⁻¹. Foram injetados 50 µL das soluções padrão e amostras. Nestas condições, o tempo de retenção foi de, aproximadamente, 9 minutos. A quantificação foi realizada por meio de uma curva de calibração, utilizando-se a área dos picos e as concentrações das soluções padrão de OTA.

2.7 Torração e moagem dos grãos de café contaminados

Após a secagem em terreiro, os grãos inoculados com umidade adequada (11%) foram torrados em um torrador marca Probat modelo Probatino,

em 3 pontos diferentes de torração (clara, média e escura). Para estabelecer a tonalidade das amostras, foram utilizados os discos de cor do Sistema Agtron/Specialty Coffee Association of America (SCAA) *roast classification color disk* (Anexo B).

Os cafés foram moídos em um moinho elétrico Mahlkoning, em 3 tipos diferentes de granulometria (fina, média e grossa), de acordo com o Programa de Qualidade do Café (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ - ABIC, 2012). Para esta classificação, foram utilizadas peneiras números 12, 16, 20, 30 e fundo de padrão ABNT. Os cafés moídos de granulometria fina foram aqueles com 0% de retenção nas peneiras nº 12 e 16, 70% de retenção nas peneiras nº 20 e 30 e 30% no fundo. Os de granulometria média com 7% de retenção nas peneiras nº 12 e 16, 73% de retenção nas peneiras nº 20 e 30 e 20% no fundo. O café com granulometria grossa teve 33% de retenção nas peneiras nº 12 e 16, 55% de retenção nas peneiras nº 20 e 30 e 12% no fundo.

2.8 Análise de OTA nos grãos de café contaminados após a torração e moagem

Nesse procedimento adotou-se a mesma metodologia descrita para análise da OTA nos grãos de café cru contaminados, apresentada no item 2.6. No entanto, para a etapa de extração, item 2.6.2, não é necessária a trituração.

2.9 Análises estatísticas

Para que a análise do experimento fosse realizada seguindo os pré-requisitos básicos, os dados foram transformados em $\ln y + e$, em seguida, realizada a análise de variância (ANAVA). Foi utilizado um esquema fatorial

3x3, instalado em um delineamento inteiramente casualizado (DIC), com 3 repetições.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e comparados pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Toda a análise foi realizada no software R (versão 2.11.1, 20).

3 RESULTADOS

Dos grãos analisados no plaqueamento direto, 97% apresentaram-se contaminados por fungos. Destes, 83% foram identificados como pertencentes à Seção *Circundati* e 14% como fungos pertencentes à Seção *Nigri*. Dos 35 isolados testados, 57% foram produtores de OTA, sendo todos identificados como *Aspergillus ochraceus* (Figuras 1a e 1b).

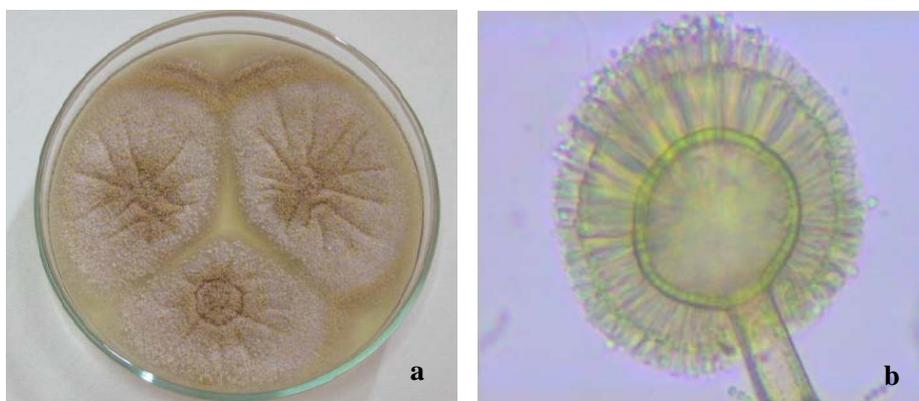


Figura 1 a) *Aspergillus ochraceus* em meio de cultura CYA; b) Estrutura microscópica de *Aspergillus ochraceus*

Na Tabela 1 estão descritos os valores médios de OTA, o percentual de redução, o valor residual, a temperatura e o tempo de torração do café verde sem inoculação, café verde inoculado e amostras de café torradas em três pontos diferentes de torração (clara, média e escura) e moídas em três tipos diferentes de granulometria (fina, média e grossa).

Estes valores revelam que a OTA foi detectada em 100% das amostras, com concentrações variando de 108,327 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a 3,060 $\mu\text{g}/\text{kg}$. A amostra com maior concentração foi a de café verde inoculado com *Aspergillus ochraceus* produtor de OTA, sendo considerada a amostra indicadora, uma vez que foi a

partir desta que foram feitos os tratamentos experimentais. Observou-se também uma redução no valor residual de OTA após a torração e moagem.

Tabela 1 Valores médios de OTA encontrados nas amostras, percentual de redução, valor residual, temperatura e tempo de torração

Temperatura e tempo de torração	Tipo de amostras	Média (µg/kg)	Redução de OTA	Valor residual
	Café verde sem inoculação	5,414	-	
	Café verde inoculado	108,327	-	
205°C □ 14''	Torração clara e granulometria fina	47,413	56,25%	43,77%
	Torração clara e granulometria média	40,779	62,36%	37,64%
	Torração clara e granulometria grossa	28,240	73,93%	26,07%
217°C □ 14''	Torração média e granulometria fina	16,812	84,48%	15,52%
	Torração média e granulometria média	10,752	90,01%	9,93%
	Torração média e granulometria grossa	8,433	92,22%	7,78%
224°C □ 14''	Torração escura e granulometria fina	4,974	95,41%	4,59%
	Torração escura e granulometria média	3,732	96,55%	3,44%
	Torração escura e granulometria escura	3,060	97,17%	2,83%

Na Tabela 2 encontram-se os valores das repetições e média da concentração de OTA das 27 unidades experimentais após a torração.

Tabela 2 Resultados da extração da OTA A, em $\mu\text{g}/\text{kg}$, observadas nas 27 unidades experimentais

Fator torração	Fator granulometria	Repetições			Médias
		1	2	3	
Clara	Fina	49,522	45,623	47,094	47,413
	Média	41,722	40,994	39,619	40,779
	Grossa	32,35	26,734	25,637	28,240
Média	Fina	15,621	17,274	17,542	16,812
	Média	11,4	10,831	10,026	10,752
	Grossa	9,197	8,642	7,46	8,433
Escura	Fina	4,849	4,89	5,183	4,974
	Média	4,106	3,706	3,383	3,732
	Grossa	3,039	2,91	3,23	3,060

Tabela 3 Análise de variância para os dados de extração de OTA encontrada no café, dados transformados em $\ln y$

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	Pr > F
Torração	2	23,5911	11,7956	$Fa=2084,75$	0,000000
Granulometria	2	1,4487	0,7243	$Fb=128,02$	0,000000
Torração x granulometria	4	0,0848	0,0212	$Fc=3,74$	0,021866
Resíduo	18	0,1018	0,0057		
Total	26	25,2264			

CV = 3,04%

Sendo a hipótese de interesse:

$$H_0^{(1)} : \alpha\beta_{ij} = 0$$

$$H_1^{(1)} : \alpha\beta_{ij} \neq 0$$

Os valores estatísticos do teste $F_c = 3,74$ sugerem que a hipótese $H_0^{(1)}$: $\alpha\beta_{ij} = 0$ seja rejeitada a 3% de probabilidade e que a hipótese $H_1^{(1)}$: $\alpha\beta_{ij} \neq 0$ seja aceita. Dessa forma, pode-se concluir que o efeito da interação pontos de torração com tipos de granulometria foi estatisticamente significativo sobre o valor médio da concentração de OTA no café (Tabela 3).

Na Tabela 4 é apresentado o comportamento da torração para cada tipo de granulometria, considerando que a hipótese seja:

$$H_0^{(2)}: \alpha_I = \dots = \alpha I = 0$$

$$H_1^{(2)}: \alpha_I = \dots = \alpha I \neq 0$$

Os valores estatísticos dos testes $F_{d,e,f}$ sugerem que a hipótese $H_0^{(2)}$: $\alpha_I = \dots = \alpha I = 0$ seja rejeitada, a 3% de probabilidade, e que a hipótese $H_1^{(2)}$: $\alpha_I = \dots = \alpha I \neq 0$ seja aceita. Este fato leva à conclusão de que os três pontos de torração apresentam valores médios de concentração de OTA diferentes para cada granulometria utilizada.

Tabela 4 Análise de variância para o comportamento da torração para cada granulometria

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	Pr > F
(Torrção/G _{fina})	2	7,64055	3,82027	$F_d=675,1942$	0
(Torrção/G _{média})	2	7,39947	3,69974	$F_e=653,8903$	0
(Torrção/G _{grossa})	2	8,63587	4,31793	$F_f=763,1505$	0
Resíduo	18				
Total	26	25,2264	0,97025		

Por meio do teste Tukey, observa-se uma diferença significativa entre as médias dos três pontos de torração com a granulometria fina, sendo a torração escura o tipo com menor valor médio de concentração de OTA (Tabela 5; Gráfico 1).

Tabela 5 Teste de Tukey para torração dentro da granulometria fina

Torrção	Média	Valores das médias sem transformação em ln y
Clara	3,858325 a	47,413 µg/kg
Média	2,820806 b	16,812µg/kg
Escura	1,603783 c	4,974µg/kg

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade

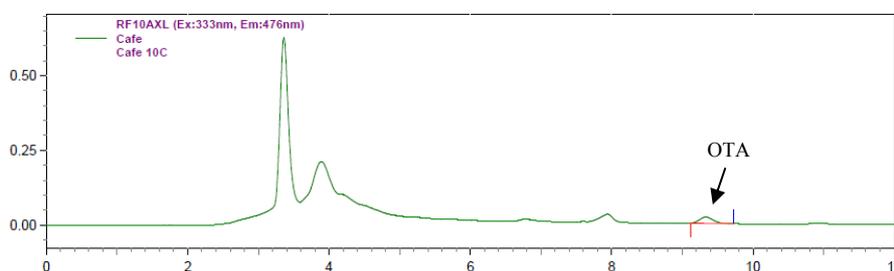


Gráfico 1 Cromatograma da amostra de café com torração escura e granulometria fina

Analisando-se o teste Tukey para as torrações com granulometria média, pode-se observar também uma diferença significativa entre as médias dos três pontos de torração. Seguindo o mesmo comportamento observado na Tabela 5, para as torrações com granulometria fina, a torração escura também apresentou menor valor médio de concentração de OTA (Tabela 6; Gráfico 2).

Tabela 6 Teste de Tukey para torração dentro da granulometria média

Torrção	Média	Valores das médias sem transformação em ln y
Clara	3,707921 a	40,779 µg/kg
Média	2,373736 b	10,752 µg/kg
Escura	1,313722 c	3,732 µg/kg

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade

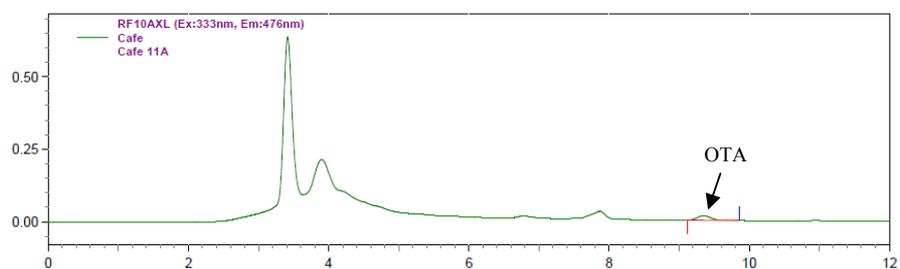


Gráfico 2 Cromatograma da amostra de café com torração escura e granulometria média

Por último, aplicou-se o teste Tukey para análise da torração escura com granulometria grossa. As médias também apresentaram significativa diferença entre elas, sendo a torração escura o tipo com menor valor médio de concentração de OTA (Tabela 7; Gráfico 3).

Tabela 7 Teste de Tukey para torração dentro da granulometria grossa.

Torrção	Média	Valores das médias sem transformação em ln y
Clara	3,335529 a	28,240 µg/kg
Média	2,128356 b	8,433 µg/kg
Escura	1,117388 c	3,060 µg/kg

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade

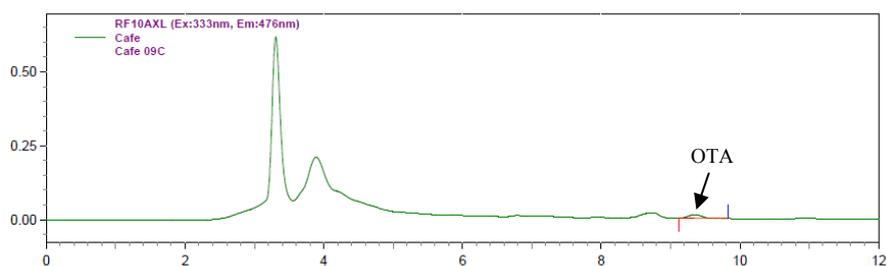


Gráfico 3 Cromatograma da amostra de café com torração escura e granulometria grossa

Como observado, a interação granulometria grossa em qualquer ponto de torração estudada apresentou os menores valores médios de concentração de OTA, tendo a combinação torração escura e granulometria grossa sido o tratamento com menor concentração da toxina, com 3,060 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Esta amostra continha, em média, 2,83% de OTA residual, obtendo-se uma redução de 97,17% de OTA.

Na Tabela 8 apresenta-se o comportamento da torração para cada tipo de granulometria.

Tabela 8 Análise de variância para o estudo do comportamento da granulometria para cada tipo de torração

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	Pr > F
(Granulometria/G _{clara})	2	0,43461	11,79557	F _g =2084,7451	0
(Granulometria/G _{média})	2	0,73957	0,36978	F _h =65,3557	0
(Granulometria/G _{escura})	2	0,35926	0,17963	F _i =31,748	0
Resíduo	18				
Total	26	25,22643	0,97025		

Considerando que a hipótese seja:

$$H_0^{(2)}: \beta_I = \dots = \beta_I = 0$$

$$H_1^{(2)}: \beta_I = \dots = \beta_I \neq 0$$

Os valores estatísticos dos testes F_g;h;i sugerem que a hipótese H₀⁽²⁾: $\beta_I = \dots = \beta_I = 0$ seja rejeitada até o nível de 1% de probabilidade, e que a hipótese H₁⁽²⁾: $\beta_I = \dots = \beta_I \neq 0$ seja aceita. Este fato leva à conclusão de que os três tipos de granulometria apresentam valores médios de extração de OTA diferentes para cada torração utilizada.

Na Tabela 9 estão dispostos os resultados do Teste de Tukey para torração dentro da granulometria fina. Pelo teste de Tukey, a 5% de

probabilidade, as médias da extração de OTA são estatisticamente iguais para a granulometria fina e média associada à torração clara; a granulometria grossa apresentou menor valor médio de concentração de OTA em relação aos demais.

Tabela 9 Teste de Tukey para granulometria dentro da torração clara

Granulometria	Média	Valores das médias sem transformação em ln y
Fina	3,858325 a	47,413 µg/kg
Média	3,707921 a	40,779µg/kg
Grossa	3,335529 b	28,240 µg/kg

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade

Analisando-se o teste Tukey para granulometria dentro da torração média, pode-se observar uma diferença significativa entre as médias dos três tipos de granulometria associada à torração média. A granulometria grossa apresentou menor valor médio de concentração de OTA em relação às demais (Tabela 10).

Tabela 10 Teste de Tukey para granulometria dentro da torração média

Granulometria	Média	Valores das médias sem transformação em ln y
Fina	2,820806 a	16,812 µg/kg
Média	2,373736 b	10,752 µg/kg
Grossa	2,128356 c	8,433 µg/kg

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade

Por último, aplicou-se o teste Tukey para granulometria dentro da torração escura. As médias também apresentaram significativa diferença entre elas, tendo a granulometria grossa apresentado menor valor médio de concentração de OTA, em relação às demais (Tabela 11).

Tabela 11 Teste de Tukey para granulometria dentro da torração escura

Granulometria	Média	Valores das médias sem transformação em ln y
Fina	1,603783 a	4,974 µg/kg
Média	1,313722 b	3,732 µg/kg
Grossa	1,117388 c	3,060 µg/kg

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade

Como observado, a interação granulometria grossa com qualquer ponto de torração estudada apresentou os menores valores médios de concentração de OTA, tendo a combinação torração escura e granulometria grossa sido o tratamento com menor concentração da toxina, com 3,060 µg/kg. Esta amostra continha, em média, 2,83% de OTA residual, obtendo redução de 97,17% de OTA.

4 DISCUSSÃO

Da amostra analisada no plaqueamento direto, 97% dos grãos estavam contaminados com fungos, sendo todos *Aspergillus*. Pardo et al. (2004) encontraram incidência de 93% de contaminação dos grãos de café com fungos do gênero *Aspergillus*. Resultado semelhante foi encontrado por Bokhari (2007), em estudos com fungos ocratoxigênicos.

Os fungos pertencentes à Seção *Circumdati* corresponderam a 83% do total de fungos contaminantes dos grãos de café e os fungos pertencentes à Seção *Nigri*, a 14%. Em estudo realizado por Batista et al. (2009), 41% dos isolados identificados pertenciam à Seção *Circumdati* e 25% à Seção *Nigri*. Dos 35 isolados testados neste estudo, 57% foram produtores de OTA, sendo todos identificados como *Aspergillus ochraceus*. Dentre os fungos do gênero *Aspergillus* da Seção *Circumdati*, *A. ochraceus* é o mais comum em café e o maior produtor de ocratoxina A (BATISTA et al., 2009; ESPADALÉ; LAMPURLANÉS; AUBERT, 2008).

Os resultados por cromatografia líquida de alta eficiência demonstram que o processo de torração e granulometria é importante na concentração residual de OTA em grãos de café torrado e moído. Em um dos tratamentos, este valor chegou a 2,83% de OTA residual, com redução de 97,17% de OTA. Em alguns estudos já foi demonstrado que, após o processo de torração, ocorre diminuição da OTA, porém, devem ser levados em consideração alguns fatores, como heterogeneidade da contaminação dos grãos de café, contaminação natural versus contaminação artificial, desempenho dos métodos analíticos e condições de torração (SCOTT, 1996).

Comparando-se apenas com o processo de torração, a redução de 97,17% nos níveis de OTA é semelhante ao encontrado por Levi, Trenk e Mohr (1974). Estes autores demonstraram que grãos de café verde adicionados de

OTA e submetidos a condições que simulem operações típicas de torração (20 min a 200 °C) sofreram redução de 77%-87% de OTA. Blanc et al. (1998), com torração de 14 minutos, a 223 °C, encontraram apenas 16% de OTA originalmente presente no café verde. Ferraz et al. (2010) relataram que, após 12 minutos de torração, a redução do teor de OTA foi de 53% e 99%, para amostras torradas a 180 °C e a 240 °C, respectivamente.

Em todos os tratamentos foi possível observar uma diferença significativa nos valores residuais de OTA. Entre os tratamentos com torração clara, a combinação torração clara e granulometria grossa apresentou menor valor residual de OTA, obtendo redução de 73,93%.

Nos tratamentos com torração média, o menor valor residual de OTA também foi observado em sua combinação com a granulometria grossa, com redução de 92,22% de OTA. A combinação torração escura e granulometria grossa foi o tratamento com menor concentração da toxina, com 3,060 µg/kg. Esta amostra continha, em média, 2,83% de OTA residual, obtendo redução de 97,17% de OTA.

A interação da torração escura com qualquer tipo de granulometria estudada apresentou menor concentração de OTA. Stegen, Essens e Lijn (2001), estudando os efeitos da torração na redução de OTA em café, observaram que, em torrações mais prolongadas com amostras de coloração mais escura, ocorre maior redução de OTA. Este fato pode estar relacionado à maior temperatura do processo de torração, uma vez que quanto maior a temperatura, maior a redução da OTA por meio do tratamento térmico (HEILMANN; REHFELDT; ROTZOLL, 1999; STUDER-ROHR et al., 1995) De acordo com Romani, Pinnavaia e Dalla Rosa (2003), a redução de OTA durante a torração é atribuída, principalmente, à severidade do tratamento térmico e é, geralmente, relacionada com o teor de OTA inicial.

O menor valor residual de OTA nos tratamentos com granulometria grossa pode ser explicado pela influência do tamanho das partículas no poder de extração. Carvalho e Chalfoun (1985) relatam que a velocidade de extração de solúveis do café está estreitamente relacionada ao grau de moagem, uma vez que quanto maior a intensidade da moagem, mais triturado estará o grão e menor será sua granulometria.

A torração média sofreu maior influência dos diferentes tipos de granulometria, uma vez que apresentou maior diferença entre a estimativa das médias da granulometria fina com a grossa. O contrário pode ser observado na torração escura. Com a alta temperatura de torração, o maior responsável pela redução de OTA foi o tratamento térmico, tornando a granulometria menos influente.

Alguns autores mencionam que outro mecanismo de eliminação de OTA é a remoção física através dos resíduos da película do grão após a torração. Porém, Blanc et al. (1998) demonstraram que esta remoção só pode ser parcialmente explicada. Romani, Pinnavaia e Dalla Rosa (2003), em seus estudos, observaram uma pequena remoção de OTA dos resíduos de películas dos grãos (2,08%). Estes resultados levaram à conclusão de que a redução do nível de OTA durante a torração parece ser atribuído, principalmente, à destruição térmica.

Outra possível explicação para os menores valores residuais de OTA foi dado por Studer-Rohr et al. (1995). Para estes autores, durante o processo de torração, ocorre a isomerização parcial da OTA na posição C-3, tornando a OTA não detectável nas metodologias de rotina.

A *Europea Coffee Federacion*, entidade que representa a indústria do café na União Europeia, baseada em diversos estudos que tratam da destruição térmica da OTA, considera que cerca de 66% da OTA presente no grão é eliminada durante a torração. Portanto, sugere que o grão cru seja adquirido

com, no máximo, de 15 µg/kg, já que, após a torração, a concentração de OTA restante não excederia os limites máximos permitidos pela UE.

Porém, ao restringir a avaliação do teor da OTA ao recebimento do grão cru e considerar que 66% da toxina será destruída durante a torração, independente do processo e equipamento utilizado, a *European Coffee Federation* não levou em consideração outros fatores que irão se sobrepor aos controles sugeridos pela entidade. Este estudo demonstra que a granulometria tem um papel importante dentro do processo de torração.

Em estudos anteriores, foi demonstrado que a torração (BLANC et al., 1998; FERRAZ et al., 2010; LEVI; TRENK; MOHR, 1974), a remoção física (BLANC et al., 1998; ROMANI; PINNAVAIA; DALLA ROSA, 2003) e a isomerização (STUDER-ROHR et al., 1995) reduzem os níveis de OTA.

O grande diferencial deste trabalho foi a avaliação do efeito de três tipos de granulometria, ficando evidente que ela influencia os valores residuais de OTA em café torrado e moído. Sendo assim, o estudo auxilia na formação de requisitos de qualidade para a produção do café torrado e moído dentro dos padrões nacionais e internacionais de qualidade, possibilitando a incorporação de valor a um produto tradicional da agricultura brasileira.

5 CONCLUSÃO

O ponto de torração escura submetido a qualquer tipo de granulometria estudada apresentou menor concentração de OTA, tendo a combinação torração escura e granulometria grossa sido o tratamento com menor concentração da toxina com 3,060 µg/kg. Esta amostra continha, em média, 2,83% de OTA residual, obtendo-se uma redução de 97,17% de OTA. A torração média sofreu maior influência dos diferentes tipos de granulometria, uma vez que apresentou maior diferença entre a estimativa das médias da granulometria fina com a grossa. Assim, este estudo demonstra que o processo de torração associado aos tipos de granulometria influencia a obtenção de menores valores residuais de OTA em grão de café torrado e moído.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução RDC n. 7**, de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre Limites Máximos Tolerados (LMT) para micotoxinas em Alimentos. Brasília, 2011. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 9 mar. 2011.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ. **Indicadores da indústria de café no Brasil**. Disponível em: <<http://www.abic.com.br>>. Acesso em: 17 dez. 2011.

BATISTA, L. R. et al. Ochratoxin A in coffee beans (*Coffea arabica* L.) processed by dry and wet methods. **Food Control**, Guildford, v. 20, n. 9, p. 784-790, Sept. 2009.

BLANC, M. et al. Behavior of ochratoxin A during green coffee roasting and soluble coffee manufacture. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 46, n. 2, p. 673-675, Feb. 1998.

BOKHARI, F. M. Mycotoxins and toxigenic fungi in arabic coffee beans in Saudi Arabia. **Advances in Biological Research**, Islamabad, v. 1, n. 1/2, p. 56-66, Jan./Apr. 2007.

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

COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. **Commission regulation n.º. 1881/2006**: setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Brussels, 2006. 364 p.

COSTA, T. H. M.; DOREA, J. G. Novos fatos e velhos mitos sobre o café. **Brasília Médica**, Brasília, v. 42, n. 3/4, p. 15-20, set. 2005.

ESPADALÉ, R. M. A.; LAMPURLANÉS, X. S.; AUBERT, A. C. Exposición laborala hongos en una planta de procesamiento de café. **Medicina y Seguridad del Trabajo**, Madrid, v. 54, n. 211, p. 31-37, marzo 2008.

FERRAZ, M. B. M. et al. Kinetics of ochratoxin A destruction during coffee roasting. **Food Control**, Guildford, v. 21, n. 6, p. 872-877, June 2010.

FILTENBORG, O.; FRISVAD, J. C. A simple screening method for toxigenic moulds in pure cultures. **Lebensmittel-Wissenschaft Technologie**, London, v. 13, n. 3, p. 128-130, 1980.

HEILMANN, W.; REHFELDT, A. G.; ROTZOLL, F. Behaviour and reduction of ochratoxin A in green coffee beans in response to various processing methods. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 209, n. 3/4, p. 297-300, Aug. 1999.

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

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

PARDO, E. et al. Occurrence of ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in green coffee from diferent origins. **Food Science and Technology International**, London, v. 10, n. 1, p. 45-50, Feb. 2004.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. 2nd ed. London: Blackie Academic & Professional, 1997. 593 p.

ROMANI, S.; PINNAVAIA, G. G.; DALLA ROSA, M. Influence of roasting levels on ochratoxin A content in coffee. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 51, n. 17, p. 5168-5171, Aug. 2003.

SAMSON, R. A. et al. **Introdution to food and airborne fungi**. 4th ed. Wageningen: Centraalbureau Voor Schimmelcultures Baarn Delft, 2000. 260 p.

SCOTT, P. M. Effects of processing and detoxification treatments on ochratoxin A: introduction. **Food Additives and Contaminants Part A-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment**, London, v. 13, n. 1, p. 19-21, 1996.

STEGEN, G. H. D. van der; ESSENS, P. J. M.; LIJN, J. van der. Effect of roasting conditions on reduction of ochratoxin A in coffee. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 49, n. 10, p. 4713-4715, Oct. 2001.

STUDERROHR, I. et al. The occurrence of ochratoxin-a in coffee. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 33, n. 5, p. 341-355, May 1995.

VARGAS, E. A.; SANTOS, E. A. Determination of ochratoxin A in green coffee by immunoaffinity column cleanup and liquid chromatography: collaborative study. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 68, n. 3, p. 773-779, May 2005.

ANEXOS

ANEXO A - CÂMARA DE NEUBAUER

CÂMARA DE NEUBAUER

A contagem de células através de uma câmara de Neubauer, ou hemacitômetro, é uma técnica padrão usada em muitos laboratórios. Estimativas acuradas do número de células são essenciais para o desenvolvimento e a validação de modelos quantitativos de crescimento celular e expressão de produtos. Os dois parâmetros principais que determinam a margem de erro da contagem usando uma câmara de Neubauer são: (1) número de câmaras contadas (isto é, o número de vezes que a câmara é totalmente preenchida e contada) e (2) número de células ou, no caso deste estudo, esporos contados em cada câmara inteira.

Assim, nesta seção, o objetivo é relatar os procedimentos utilizados para a contagem de esporos em câmara de Neubauer para a inoculação de esporos em concentração de 10^7 UFC/ml nas amostras de café utilizadas no experimento.

PROTOCOLO PARA CONTAGEM DE ESPOROS EM CÂMARA DE NEUBAUER

A câmara de Neubauer é um instrumento utilizado para estimar o número de células em um volume determinado com auxílio de um microscópio. É composta por uma lâmina de vidro fina, com duas áreas de contagem (uma de cada lado da câmara), sendo que cada uma possui 0,1 mm de profundidade (Fig. 1). Além disso, cada câmara é dividida em 9 quadrados grandes (Fig. 1 - a), delimitados por 3 linhas brancas. O quadrado grande central é subdividido em

25 quadrados médios (Fig. 1 - b). Estes 25 quadrados são novamente subdivididos em 16 quadrados menores (Fig. 1 - c). Esta superfície marcada tem uma área de 9 mm^2 . Uma lamínula deve ser utilizada para cobrir as duas câmaras de contagem.

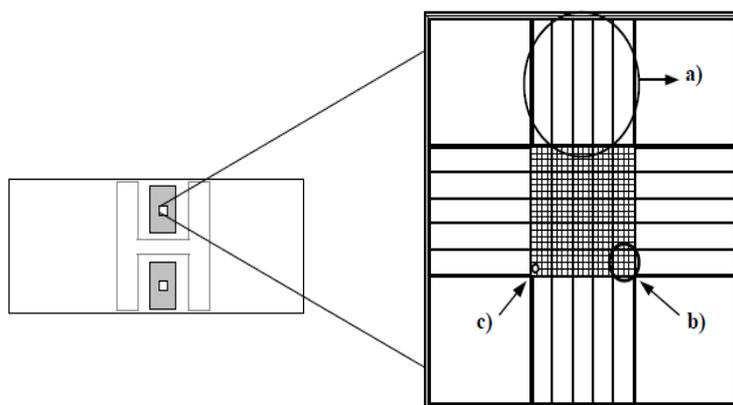


Figura 1 Câmara de Neubauer com os respectivos campos de contagem (ALVES; MORAIS, 1998)

Existem diferentes maneiras de se realizar a contagem numa câmara de Neubauer. São elas:

- a) contagem de 5 quadrados médios (os 4 quadrados dos cantos e o quadrado central);
- b) contagem total de um dos lados (de uma das câmaras de contagem – que corresponde ao quadrado grande central);
- c) contagem total dos dois lados (câmara inteira – que corresponde ao quadrado grande central de cada lado).

Neste trabalho foi realizada a contagem dos 5 quadrados médios (os 4 quadrados dos cantos e o quadrado central), denominado Campo 3. Após a extração dos esporos, foram feitas diluições necessárias para realizar a contagem em câmara de Neubauer. Foi realizada uma contagem para cada amostra de 240 ml de inóculo, para se obter uma concentração de esporos de 10^7 UFC/ml.

MÉTODO PARA UTILIZAÇÃO DA CÂMARA DE NEUBAUER

Inicialmente, a lamínula e a câmara foram limpas com álcool (70%); a seguir, as extremidades da câmara próximas aos canais laterais foram umedecidas com água. A lamínula foi colocada sobre os canais e as áreas de contagem. Isso foi feito para garantir que a profundidade na câmara fosse de 0,1 mm em toda a extensão.

Na sequência, uma alíquota de 10 mL foi extraída de uma suspensão de esporos e transferida para a câmara. Para isso, a ponta da pipeta foi colocada no canal, em um dos lados e o fluido foi forçado a sair, permitindo, assim, que entrasse na câmara por capilaridade. A seguir, a câmara foi colocada sob o microscópio (objetiva de 40x), no qual foi realizada a contagem dos esporos. Foram contados todos os esporos que estavam dentro da área dos 5 quadrados médios, incluindo aqueles que estavam sobre as linhas. Após a contagem, a lamínula foi retirada e, juntamente com a câmara, foi limpa com álcool.

CÁLCULO DO NÚMERO DE ESPOROS POR GRAMA DE SUBSTRATO

Após realizar as contagens, fez-se a soma do número de esporos obtido por contagem, isto é, o total dos campos de contagem dividido por 5. A partir dessa quantidade média de esporos, foram feitos os cálculos necessários para se obter o número total de esporos, utilizando o fator de conversão (Tabela 1).

Tabela 1 Campo de contagem da câmara de Neubauer com as respectivas áreas, volumes e fatores de conversão para mL

Campos de contagem	Área (mm ²)	Volume		Fator de conversão (conídios/ml)
		mm ³	mL	
1	1,0000	0,10000	10 ⁻⁴	n x 10 ⁴
2	0,0625	0,00625	62,5 x 10 ⁻⁷	n x 16 x 10 ⁴
3	0,0400	0,00400	4,0 x 10⁻⁶	n x 2,5 x 10⁵
4	0,0025	0,00025	2,5 x 10 ⁻⁷	n x 4 x 10 ⁶

Fonte: Alves e Moraes (1998)

Tabela 2 Contagem dos esporos

Quadrados médios	1° Amostra de inóculo	2° Amostra de inóculo	3° Amostra de inóculo
1	82	28	72
2	84	34	80
3	99	56	68
4	74	37	82
5	80	56	62
Total	419	211	364

1-média de esporos obtidos (n):

$$1- \text{ esporos} = \frac{82 + 84 + 99 + 74 + 80}{5} = 83,8$$

$$2- \text{ esporos} = \frac{28 + 34 + 56 + 37 + 56}{5} = 42,2$$

$$3- \text{ esporos} = \frac{72 + 80 + 68 + 82 + 62}{5} = 72,8$$

2- quantidade de esporos por mL de inóculo:

$$n \times 2,5 \times 10^5$$

$$1- 83,8 \times 2,5 \times 10^5 = 20750000 \text{ ou } \mathbf{2,08 \times 10^7}$$

$$2- 42,2 \times 2,5 \times 10^5 = 10550000 \text{ ou } \mathbf{1,06 \times 10^7}$$

$$3- 72,8 \times 2,5 \times 10^5 = 18200000 \text{ ou } \mathbf{1,82 \times 10^7}$$

Dessa forma, pode-se observar que o inóculo obtido estava com a concentração de esporos desejada para a inoculação do café.

ANEXO B – PADRONIZAÇÃO DO PONTO DE TORRAÇÃO

PONTO DE TORRAÇÃO

A torração é responsável pela transformação do grão verde em grão torrado para a confecção da bebida. Esse desenvolvimento está relacionado com o tempo e a temperatura utilizados durante o processo. Por um determinado período de tempo, os grãos ficam em repouso para que aconteça um equilíbrio da umidade interna do grão; após a torrefação, os grãos tornam-se mais leves devido à perda de umidade.

A padronização dos pontos da torração é subjetiva, variando de indivíduo para indivíduo.

Neste trabalho, para estabelecer a tonalidade das amostras, foram utilizados os discos de cor do Sistema Agtron/ Specialty Coffee Association of America (SCAA) Roast Classification Color Disk, sendo este um método subjetivo, que necessita de técnicos e de muita prática. A indústria, atualmente, utiliza, além dos discos de agtron, equipamentos rápidos e mais exatos, como os colorímetros e espectrofotocolorímetros (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA, 2011). Para classificar os graus de torra, a Associação Brasileira da Indústria de Café - ABIC (2011) recomenda a seguinte relação entre o ponto de torração e o número do disco agtron: torra clara - disco agtron nº 65; torra média - disco agtron nº 55 e torra escura - disco agtron nº 45.

Foram estabelecidas, para as amostras, as seguintes relações entre o ponto de torração e o número dos discos agtron: torração clara - disco agtron nº 95; torração média - disco agtron nº 65 e torração escura – disco agtron nº 35. Nessa etapa, controlamos o tempo e a temperatura a que os grãos foram expostos, formando, assim, perfis de torração.

Para a obtenção das amostras com torração clara, média e escura, iniciamos a torração à temperatura de 160 °C. Passados alguns minutos, pequenas quantidades eram retiradas do torrador, moídas e comparadas com o disco agron designado para cada tipo de torração.

Para a obtenção da amostra de torração clara, o tempo gasto foi de 13,5 minutos, à temperatura de 205 °C, obtendo-se, assim, o perfil de torra (Gráfico 1, Figura 2).

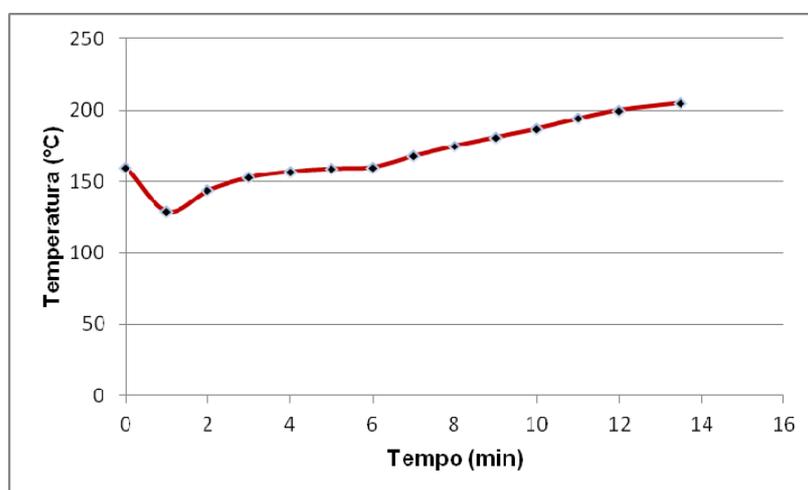


Gráfico 1 Perfil de torra da amostra com torração clara



Figura 2 Amostras com torração clara, sendo (a) granulometria fina; (b) granulometria média; (c) granulometria grossa

Para a obtenção da amostra de torração média, o tempo gasto foi de 14 minutos, à temperatura de 217 °C, obtendo-se, assim, o perfil de torra (Gráfico 2; Figura 3).

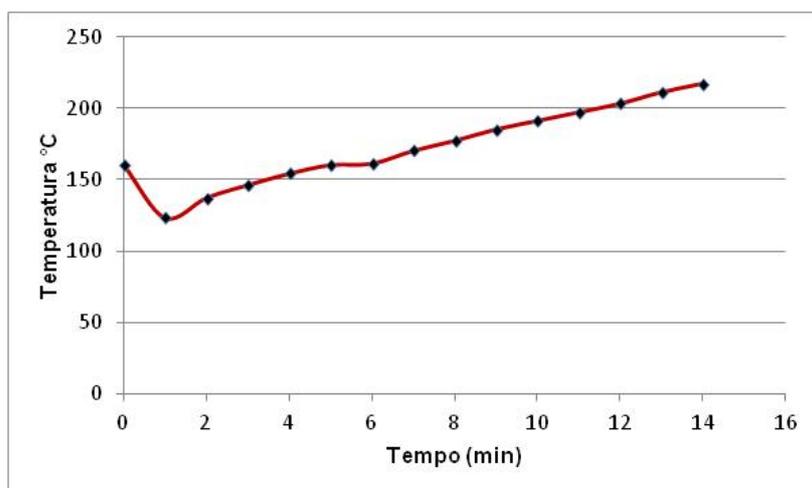


Gráfico 2 Perfil de torra da amostra com torração média

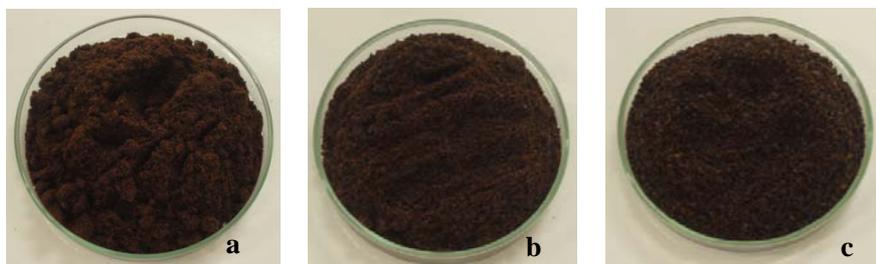


Figura 3 Amostras com torração média, sendo (a) granulometria fina; (b) granulometria média; (c) granulometria grossa

Para a obtenção da amostra de torração escura, o tempo gasto foi de 14 minutos, à temperatura de 224 °C, obtendo-se, assim, o perfil de torra (Gráfico 3, Figura 4).

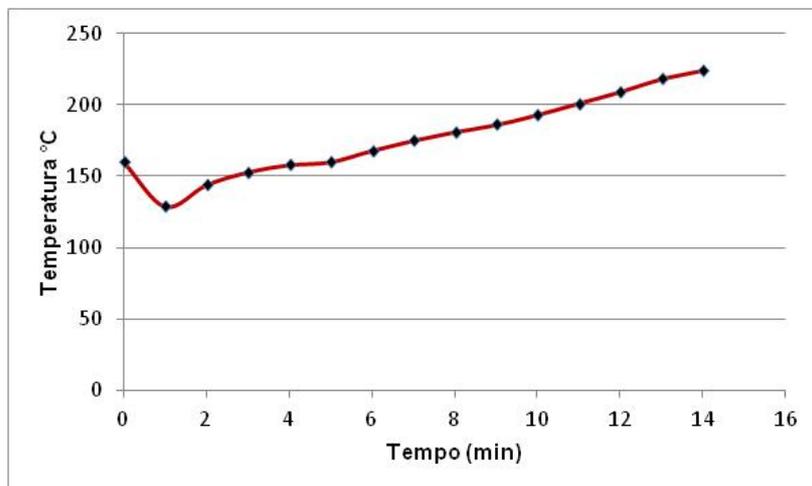


Gráfico 3 Perfil de torra da amostra com torração escura

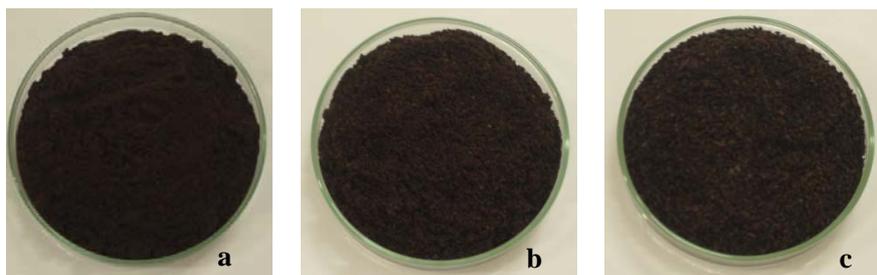


Figura 4 Amostras com torração escura, sendo (a) granulometria fina; (b) granulometria média; (c) granulometria grossa

REFERÊNCIAS

ALVES, S. B.; MORAES, S. A. Quantificação de inóculo de patógenos de insetos. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 765-777.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ. **Norma de qualidade recomendável e boas práticas de fabricação de cafés torrados e moídos**. Disponível em: <<http://www.abic.com.br>>. Acesso em: 17 dez. 2011.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Relatório de gestão 1998-2003**. Disponível em: <http://www22.sede.embrapa.br/cafe/outros/relatorio_gestao.htm>. Acesso em: 17 dez. 2011.