

OCRATOXINA A EM DEFEITOS DE CAFÉS, CINÉTICA DE DESTRUIÇÃO DA TOXINA E AVALIAÇÃO DAS BEBIDAS PELO USO DA LÍNGUA ELETRÔNICA

Marta H. TANIWAKI¹, E-mail: mtaniwak@ital.sp.gov.br; Aldir A. TEIXEIRA²; Ana Regina R. TEIXEIRA²; Mariano, B.M. FERRAZ¹; Alfredo A VITALI¹; Beatriz T. IAMANAKA¹; Marina V. COPETTI¹; Leonardo PATERNO³

¹ Instituto de Tecnologia de Alimentos – ITAL – Av. Brasil, 2880 – Campinas-SP – CEP 13070-178; ² Assicafé Assessoria e Consultoria Agrícola Ltda, São Paulo-SP; ³ Laboratório de Microeletrônica – PSI – EPUSP, São Paulo-SP

Resumo:

O presente trabalho teve os seguintes objetivos: (i) analisar a presença dos fungos ocratoxigênicos nos principais defeitos de cafés (preto, verde, preto-verde e ardido - PVA); (ii) verificar a presença da ocratoxina A (OTA) nos defeitos de cafés; (iii) verificar a destruição da OTA produzida por *Aspergillus westerdijkiae* inoculado em café normal (sem defeitos) utilizando o torrador de leito de jorro vertical; (iv) avaliar amostras de café contendo diferentes teores de PVA com o equipamento língua eletrônica. Os grãos defeituosos ardidados e pretos apresentaram o maior teor de OTA, com 11,35 µg/kg e 25,66 µg/kg, respectivamente. O defeito verde que se refere aos grãos imaturos, foi o defeito mais comum nas amostras de resíduo e a presença de fungos toxigênicos e OTA neles foi baixa. O café arábica normal foi contaminado com *Aspergillus westerdijkiae* toxigênico e após o seu desenvolvimento, houve uma produção de OTA de 247 µg/kg. Este café foi submetido à torração pelo torrador de leito de jorro à 4 diferentes temperaturas (180, 200, 220 e 240°C) e 3 tempos (5, 8 e 12 min). À 180°C por 5, 8 e 12 min, houve uma redução da OTA de 8% (226 µg/kg), 42% (142 µg/kg) e 53% (114 µg/kg) respectivamente; à 200°C, a redução foi de 30% (173 µg/kg), 56% (108 µg/kg) e 66% (80 µg/kg) respectivamente; à 220°C, a redução foi de 46% (131 µg/kg), 76% (58 µg/kg) e 87% (31 µg/kg) e à 240°C, a redução foi de 76% (57 µg/kg), 94% (14 µg/kg) e 98% (2 µg/kg) respectivamente. Estes resultados demonstram que o torrador de leito de jorro é um equipamento eficiente na destruição da OTA no café. Amostras de café contendo diferentes teores de PVA (5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 100%) foram avaliadas pelo equipamento Língua Eletrônica, composta de 5 sensores poliméricos. O equipamento LE foi capaz de classificar amostras de café de acordo com diferentes teores de PVA. No geral, a resposta dos sensores aumentou com o aumento do teor de PVA nas amostras de café.

Palavras chave: café PVA, micobiota, ocratoxina A, cinética da destruição de OTA, língua eletrônica.

OCHRATOXIN A IN DEFECTIVE COFFEE BEANS, KINETIC OF TOXIN DESTRUCTION AND BEVERAGE EVALUATION USING ELECTRONIC TONGUE

Abstract:

The objectives of the present work were: (i) to analyse the presence of ochratoxigenic fungi in the main coffee defects (black, immature, black immature and sour - BIS); (ii) to verify the presence of ochratoxin A (OTA) in coffee defects; (iii) to verify the OTA destruction produced by *Aspergillus westerdijkiae* inoculated in normal coffee (without defects) using a vertical spouted bed roaster and (iv) to evaluate coffee samples with different levels of (BIS) with electronic tongue equipment. The sour and black defective beans had the highest OTA concentration, 11.35 µg/kg and 25.66 µg/kg, respectively. The defect green which refers to the immature beans, was the most common defect in the residue samples, and the presence of toxigenic fungi and OTA was low. Normal arabic coffee was contaminated with toxigenic *Aspergillus westerdijkiae* and after its development showed an OTA production of 247 µg/kg. This coffee was submitted to a roasting process using a vertical spouted bed roaster at 4 different temperatures (180, 200, 220 and 240°C) and 3 time periods (5, 8 and 12 min). At 180°C for 5, 8 and 12 min, OTA reduction was 8% (226 µg/kg); 42% (142 µg/kg) and 53% (114 µg/kg) respectively. At 200°C for 5, 8 and 12 min, OTA reduction was 30% (173 µg/kg); 56% (108 µg/kg) and 66% (80 µg/kg) respectively. At 220°C for 5, 8 and 12 min, OTA reduction was 46% (131 µg/kg), 76% (58 µg/kg) and 87% (31 µg/kg). Finally, at 240°C for 5, 8 and 12 min, OTA reduction was 76% (57 µg/kg), 94% (14 µg/kg) and 98% (2 µg/kg) respectively. The results of this experiment showed that hot air spouted bed roasting can be an efficient tool for eliminating OTA in coffee. Coffee samples containing different BIS levels (5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 100%) were evaluated by electronic tongue (ET) equipment, with 5 polymeric sensors. ET was able to classify coffee samples according to different BIS levels. In general, the sensor response increased with the increase of BIS in coffee samples.

Key words: BIS coffee, mycobiota, ochratoxin A, kinetic of OTA destruction, electronic tongue.

Introdução

Os defeitos do café podem ser tanto de natureza intrínseca como extrínseca aos grãos. Os primeiros são os denominados grãos alterados e são decorrentes da aplicação inadequada dos processos agrícolas (preto, ardido, verde, preto verde, verde escuro e etc), ou então são originados de modificações fisiológicas ou genéticas do grão (miolo de concha, concha, chocho e etc). Os defeitos de natureza extrínseca são aqueles representados pelos elementos estranhos ao café beneficiado, como coco, marinho, cascas, paus, pedras e etc. Todos esses defeitos desvalorizam o café durante sua comercialização, interferindo negativamente na sua colocação no mercado, além de acarretar em prejuízos de ordem econômica por pesarem

menos que os grãos normais. Além disso, esses defeitos alteram as características sensoriais da bebida do café, produzindo uma bebida de qualidade inferior. Sendo a presença de grãos defeituosos nos lotes de café um fato real, um estudo mais detalhado desses defeitos adquire importância, não somente em termos econômicos, mas principalmente, em termos de saúde pública.

Com exceção dos defeitos de origem fisiológica ou genética, os demais são decorrentes da aplicação inadequada de práticas agrícolas. Dentre estas, encontra-se a prática da permanência prolongada dos grãos em contato com o chão, o que implica na contaminação desses grãos por microrganismos presentes no solo e a formação do defeito preto e ardido. Estes microrganismos, além de serem deterioradores e os causadores dos defeitos citados, podem ainda ser capazes de produzir toxinas. Uma toxina que tem sido bastante pesquisada em café é a ocratoxina. É produzida principalmente pelo fungo *Aspergillus ochraceus*, e mais recentemente, tem sido verificada sua produção por *Aspergillus niger* e *Aspergillus carbonarius* (Urbano *et al.*, 2001; Joosten *et al.*, 2001; Taniwaki *et al.*, 2003). Já foi comprovada que a ocratoxina é nefrotóxica, teratogênica e mutagênica em vários animais. É uma micotoxina que vem sendo detectada em diferentes lotes de cafés, no Brasil e no mundo (Patel *et al.*, 1997; Bucheli & Taniwaki, 2002; Taniwaki *et al.*, 2003). Alguns países da Europa já estabeleceram limites máximos de ocratoxina A para café cru que vai de 5 a 20 µg/kg.

Até recentemente, considerava-se que a ocratoxina A era decomposta durante a torração e moagem dos grãos de café crus. A partir de então surgiram controvérsias sobre o efeito da torração e preparação da bebida e a resistência da toxina. As razões das discrepâncias podem ser devidas aos métodos experimentais de inoculação da OTA; à evolução dos métodos analíticos de detecção da toxina; e a não homogeneidade da distribuição de ocratoxina nas amostras de café (Viani, 1996; Pittet *et al.*, 1996; Blanc *et al.*, 1998).

Nestas condições o presente trabalho teve os seguintes objetivos: verificar a presença dos fungos ocratoxigênicos nos principais defeitos de cafés (preto, verde, preto-verde e ardido – PVA); investigar a presença de ocratoxina A nos grãos defeituosos; verificar o efeito do tratamento térmico na destruição da OTA produzida por *Aspergillus westerdijkiae* toxigênico inoculado em café normal (sem defeitos), utilizando o torrador leito de jorro vertical; avaliar “blends” de cafés com diferentes porcentagens de PVA através de um sensor gustativo ou língua eletrônica.

Material e Métodos

Amostras: As amostras de resíduos de café arábica foram provenientes de duas regiões produtoras: Patrocínio (MG) e Pirajú (SP).

Separação dos defeitos: Os defeitos dos cafés foram separados a partir de amostras de resíduo manualmente em: meio preto, verde escuro, verde, preto-verde, preto e ardido pela equipe de classificação da Assicafé.

Análise micológica: Um total de 50 grãos de cafés foram desinfetados superficialmente com hipoclorito de sódio 0,4% por 1 min e plaqueados em meio agar Dicloran 18% de glicerol (Pitt & Hocking, 1997). As placas foram incubadas a 25°C por 5 a 7 dias, e a porcentagem de infecção foi calculada. As colônias foram identificadas de acordo com Samson *et al.* (2004) e Frisvad *et al.* (2004).

Inoculação com o fungo: Café arábica normal foi inoculado com *Aspergillus westerdijkiae* toxigênico e incubado à 25°C por 30 dias. Após o seu desenvolvimento a OTA foi extraída e quantificada. Este café foi utilizado para o estudo da destruição de OTA, utilizando o torrador de leito de jorro.

Torração do café: O torrador de leito de jorro vertical foi aquecido até a temperatura desejada. Uma alíquota de 300g de café contaminado com OTA foi colocada no torrador à quatro temperaturas diferentes: 180, 200, 220 e 240°C e três diferentes períodos: 5, 8 e 12 min. Cada tratamento foi repetido duas vezes. Após o período de torração, o café foi imediatamente removido do leito de jorro e colocado num resfriador de ar seco até atingir a temperatura ambiente. O café torrado foi moído, peneirado e a ocratoxina A foi extraída.

Ocratoxina A: As amostras de foram trituradas em moinho até granulometria de 20 mesh. A ocratoxina A em amostras de café cru e café torrado e moído foi analisada de acordo com o método de Vargas *et al.* (2005), com a limpeza da amostra em coluna de imunoafinidade e detecção por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando detector de fluorescência. Os limites de detecção foram 0,2 µg/kg e 0,1 µg/kg para café cru e café torrado, respectivamente.

Teste com língua eletrônica (LE): Amostras de café contendo diferentes teores de PVA (5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 100%) foram avaliadas por uma LE típica, composta de 5 sensores poliméricos. O café foi preparado segundo um procedimento padrão: 10g de café para 100 ml de água mineral (Bioleve) em ebulição, seguido da filtração em papel de filtro (Melita, n. 2). Após o preparo, a bebida de café foi diluída em água mineral, na proporção 1:9 v/v (1 parte da bebida de café para 9 partes de água mineral). As amostras foram medidas numa seqüência aleatória. Todas as medidas foram efetuadas em 25°C com o auxílio de um banho termostatizado. As impressões digitais para cada café obtidas com a LE foram posteriormente processadas através de um método estatístico, conhecido como análise das componentes principais (PCA).

Resultados e Discussão

A Tabela 1 apresenta a porcentagem dos defeitos nas amostras de resíduos de café da região de Patrocínio (MG) e Pirajú (SP). O defeito verde que se refere aos grãos imaturos, foi o defeito que se apresentou em maior porcentagem na região de Patrocínio 30,5% e na região de Pirajú 38%.

A porcentagem de infecção por fungos ocratoxigênicos nos defeitos de cafés de Patrocínio e Pirajú é mostrada na Tabela 2. Os principais fungos produtores de ocratoxina foram *Aspergillus carbonarius* (de 60 a 100%) e *Aspergillus westerdijkiae* (de 53 a 100%). *A.westerdijkiae* foi recentemente descrito por Frisvad *et al.* (2004), pertence ao grupo *Aspergillus section circumdati*, e era antes classificado com *A. ochraceus*, é considerado hoje o principal fungo produtor de ocratoxina A no café. Somente de 6 a 17% dos isolados de *A. niger* foram produtores de OTA. Os defeitos preto e ardido foram os mais infectados por estas espécies nas duas regiões estudadas. A Tabela 3 apresenta os níveis de ocratoxina A nos defeitos de café nestas regiões. Os defeitos ardido da região de Patrocínio e preto de Pirajú apresentaram os maiores níveis de contaminação por OTA, sendo 11,35 µg/kg e 25,66 µg/kg, respectivamente.

O café contaminado com *A westerdijkiae* toxigênico após seu desenvolvimento obteve um nível de 247 µg/kg de OTA. A Figura 1 apresenta a cinética de destruição de OTA utilizando o torrador de leito de jorro. De acordo com a Figura 1 pode-se observar que a redução foi de 8 a 98% dependendo do tempo e temperatura utilizados. À 180°C por 5, 8 e 12 min, houve uma redução da OTA de 8% (226 µg/kg), 42% (142 µg/kg) e 53% (114 µg/kg) respectivamente; à 200°C, a redução foi de 30% (173 µg/kg), 56% (108 µg/kg) e 66% (80 µg/kg) respectivamente; à 220°C, a redução foi de 46% (131 µg/kg), 76% (58 µg/kg) e 87% (31 µg/kg) e à 240°C, a redução foi de 76% (57 µg/kg), 94% (14 µg/kg) e 98% (2 µg/kg) respectivamente. A Comunidade Européia (2006) estabeleceu um limite de 5 µg/kg e 10 µg/kg de OTA para café torrado e solúvel, respectivamente. Na prática níveis tão altos de OTA como no nosso experimento não seriam encontrados em cafés torrados. Iamanaka *et al.* (2005) analisaram a incidência de OTA em várias amostras de café cru, solúvel e torrado brasileiro e encontraram uma média de 12,43; 4,43 e 1,30 µg/kg, respectivamente. A maioria das amostras de café analisados por Iamanaka *et al.* (2005) estava dentro dos limites estabelecidos pela Comunidade Européia.

Diferenças na destruição de OTA usando o processo de torração têm sido publicados. Tsubouchi *et al.* (1987) estudaram o efeito da torração na estabilidade da OTA, utilizando um aquecedor de ar, à uma temperatura de torração de 200° C por 20 minutos. Neste estudo Tsubouchi *et al.* (1987) obtiveram uma destruição de apenas 12% de OTA. Por outro lado Blanc *et al.* (1998) verificaram que após a torração e moagem, o café continha apenas 16% da contaminação de OTA original. Santos *et al.* (2005) conseguiram uma destruição de OTA de cerca de 87% após torração do café à 210°C, contudo houve uma variação dos resultados de até 134%.

A Figura 2 apresenta o gráfico de análise de componentes principais (PCA) para cafés com diferentes teores de PVA. O equipamento Língua Eletrônica foi capaz de classificar amostras de café de acordo com diferentes teores de PVA. No geral, a resposta dos sensores aumentou com o aumento do teor de PVA nas amostras de café.

Tabela 1. Porcentagem de defeitos nas amostras de resíduos de cafés das regiões de Patrocínio e Pirajú.

Tipo de defeito	Patrocínio (%)	Pirajú (%)
Preto	7,14	4,93
Meio preto	3,53	-
Verde claro	21,95	37,99
Verde escuro	8,55	-
Preto verde	5,08	16,15
Ardido	9,85	3,35
Total de PVA	56,10	62,42
Intermediários, indefinidos, outros	3,08	37,58
Normal	40,82	-
Total da amostragem	100	100

Tabela 2. Porcentagem de infecção por fungos ocratoxigênicos nos defeitos de cafés de Patrocínio e Pirajú.

Tipo de defeito	<i>A carbonarius</i>	<i>A niger</i>	<i>A westerdijkiae</i>
Patrocínio:			
Preto	10	24	24
Verde	8	28	10
Preto verde	6	34	22
Ardido	10	29	30
Pirajú:			
Preto	-	-	33
Verde	-	-	3
Preto verde	-	-	6
Ardido	-	6	9

Tabela 3. Teores de ocratoxina A ($\mu\text{g}/\text{kg}$)¹ nos defeitos de café de Patrocínio e Pirajú.

Defeitos de café	Patrocínio Ocratoxina A ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Pirajú Ocratoxina A ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Preto	0,49	25,66
Verde	ND ²	0,35
Preto verde	0,39	0,30
Ardido	11,35	0,33

¹ Média de 3 repetições; ² Não detectado pelo método (limite de detecção $0,2\mu\text{g}/\text{kg}$)

Figura 1. Destruição da OTA durante a torração à diferentes temperaturas e tempos.

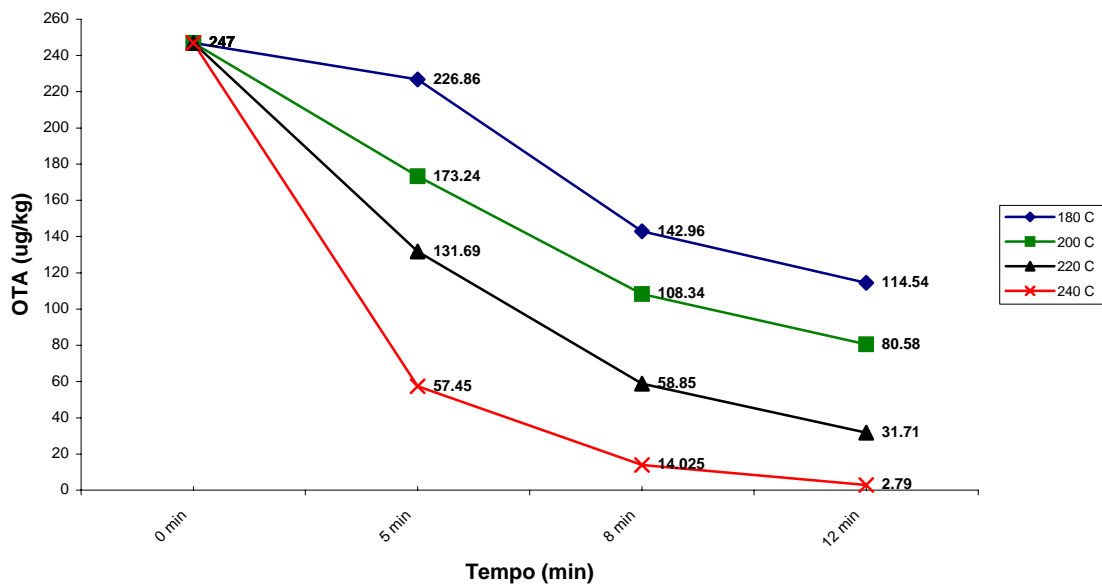
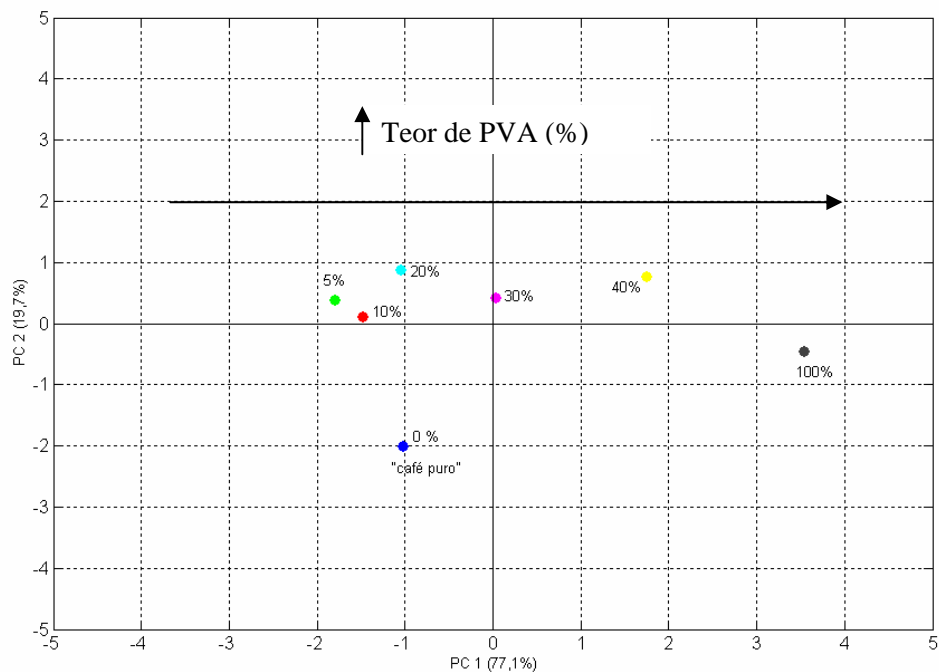


Figura 2. Gráfico de análise dos componentes principais (PCA) para cafés com diferentes teores de PVA.



Conclusões

O defeito verde que se refere aos grãos imaturos, foi o defeito que se apresentou em maior porcentagem (38%) nas amostras de resíduo. A presença de fungos toxigênicos e OTA foi baixa neste defeito. Este defeito poderia ser utilizado para outros fins que não o da bebida. Os defeitos ardido e preto foram os que apresentaram maior porcentagem de infecção com fungos ocratoxigênicos e teor de OTA. Estes defeitos poderiam ser utilizados para bio-combustível e não deveriam ser usados para bebida. O torrador de leito de jorro apresentou uma redução de 8 a 98% de OTA dependendo do tempo e temperatura utilizado na torração. O equipamento Língua Eletrônica foi capaz de classificar amostras de café de acordo com diferentes teores de PVA. No geral, a resposta dos sensores aumentou com o aumento do teor de PVA nas amostras de café.

Referências Bibliográficas

- Blanc, M.; Pittet, A.; Munoz-Box, R. & Viani, R. 1998. Behavior of ochratoxin A during green coffee roasting and soluble coffee manufacture. **J. Agric. Food Chem.**, **46**: 673-675.
- Bucheli, P. & Taniwaki, M.H. 2002. Research on the origin, and the impact of postharvest handling and manufacturing on the presence of ochratoxin A in coffee. **Food Addit. Contam.**, **19**: 655-665.
- Frisvad, J.C.; Frank, J.M.; Houbraken, J.A.M.P.; Kuijpers, A.F.A. & Samson, R.A. 2004. New ochratoxin A producing species of *Aspergillus* section *Circumdati*. **Stud. Mycol.** **50**: 23-43.
- Iamanaka, B.T.; Souza, J.L. & Taniwaki, M.H. 2005. Incidência de ocratoxina A em café cru, solúvel e torrado brasileiro. **Anais do 3º Simpósio em Ciência de Alimentos (Simpocal) 2005**. Florianópolis –SC, Brasil, 2 a 3 de junho de 2005. ISBN 85 89436-02-0. CD room 5 pp.
- Joosten, H.M.L.J.; Goetz, J.; Pittet, A.; Schellenberg, M. & Bucheli, P. 2001. Production of ochratoxin A by *Aspergillus carbonarius* on coffee cherries. **Intern. J. Food Microbiol.** **65**: 39-44.
- Patel, S.; Hazel, C. M.; Winterton, A. G. M. & Gleadle, A.E. 1997. Survey of ochratoxin A in UK retail coffees. **Food Addit. Contam.**, **14**: 217-222.
- Pitt, J.I. & Hocking, A.D. 1997. **Fungi and Food Spoilage**. Blackie Academic & Professional: London, 593p.
- Pittet, A.; Tornare, D.; Huggett, A. & Viani, R., 1996, Liquid chromatographic determination of ochratoxin A in pure and adulterated soluble coffee using an immunoaffinity column cleanup procedure, **J. Agric. Food Chem.**, **44**:3564-3569.
- Samson, R.A.; Houbraken, J.A.M.P.; Kuijpers, A.F.A.; Frank, J.M. & Frisvad, J.C.. 2004. New ochratoxin A or sclerotium producing species of *Aspergillus* section *Nigri*. **Stud. Mycol.** **50**: 45-61.
- Santos, E.A.; Vargas, E.A.; Silva, F.B. & França, A.S. 2005. Avaliação da degradação da ocratoxina A em café durante a torra. **Anais do IV Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil. Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café, Londrina-PR, Brasil, 2 a 5 de maio de 2005**. CD room 3p.
- Taniwaki, M.H.; Pitt, J.I.; Teixeira, A.A. & Iamanaka, B.T. 2003. The source of ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to processing methods, **Int. J. Food Microbiol.**, **82**: 173-179.
- Tsubouchi, H.; Yamamoto, K.; Hisada, K.; Sakabe, Y. & Udagawa, S. 1987. Effect of roasting on ochratoxin A level in green coffee beans inoculated with *Aspergillus ochraceus*. **Mycopathol.**, **97**: 111-115.
- Urbano, G.R.; Taniwaki, M.H.; Leitão, M.F.F. & Vicentini, M.C. 2001. Occurrence of ochratoxin A producing fungi in raw Brazilian Coffee. **J. Food Prot.**, **64**: 1226-1230.
- Vargas, E.A.; Santos, E.A. & Pittet, A. 2005. Determination of ochratoxin A in green coffee by immunoaffinity column cleanup and liquid chromatography collaborative study. **J. AOAC Intern.**, **58**: 773-779.
- Viani, R. 1996. Fate of ochratoxin A during processing of coffee. **Food Addit. Contam.**, **13**: 5-9.
- www.europa.eu**: EU rules on ochratoxin A extended to coffee, wine and grape juice (acesso em 31/07/2006).