

PRODUÇÃO DE OCHRATOXINA A EM CAFÉS COM PERMANÊNCIA PROLONGADA SOLO NO CERRADO MINEIRO E BAIANO

Rodrigo da Silveira CAMPOS²; Otniel FREITAS-SILVA¹, E-mail: ofreitas@ctaa.embrapa.br; Antônio Xavier de FARIAS¹; Flávio Quitério da CUNHA¹; Maria de Lourdes Mendes de SOUZA¹; Bárbara Amorim da SILVA²; Sidnéa Cordeiro de FREITAS¹

¹Embrapa Agroindústria de Alimentos - Avenida das Américas, 29.501; Guaratiba, Rio de Janeiro – RJ; CEP: 23020-470; ²Bolsista Embrapa Café

Resumo:

O Brasil destaca-se na produção e consumo mundial de café. A região do Triângulo Mineiro é conhecido pelo expressivo volume produzido, enquanto a do Cerrado Baiano pela sua qualidade dos grãos. Apesar das exigências cada vez maiores por parte do mercado consumidor, ainda é comum a utilização de cafés de varrição na composição da safra a ser comercializada. O presente trabalho teve por objetivo estudar por um período de 90 dias, frutos de café com permanência prolongada no solo, avaliando a produção de ocratoxina A (OTA), e a dinâmica de umidade e atividade de água nos frutos colhidos periodicamente (a cada 30 dias) nas regiões produtoras, que apresentam características edafoclimáticas distintas. Os resultados demonstraram que o teor de umidade e, por consequência, a atividade de água dos grãos, variaram de acordo com a região. Após 90 dias, os frutos oriundos do Cerrado Mineiro, foram observados valores de 14,15% e 0,74 para a umidade e atividade de água respectivamente, enquanto os frutos do Cerrado Baiano apresentaram valores de 6,64% e 0,63. Os cafés com permanência prolongada no solo apresentaram contaminação por OTA frutos muito elevada, culminando aos 90 dias com valores médios correspondentes a 49,42 e 30,93 $\mu\text{g} \cdot \text{Kg}^{-1}$ de OTA para os frutos das regiões dos Cerrados Mineiro e Baiano, respectivamente. Constatou-se produção de OTA mesmo em grãos com atividade de água baixa, demonstrando que em campo, a complexidade do sistema interfere na dinâmica do desenvolvimento de fungos toxigênicos, e por consequência, na produção de OTA.

Palavras-chave: *Coffea arabica* L.; micotoxina; cromatografia líquida de alta eficiência; atividade de água; umidade

OCHRATOXIN A PRODUCTION IN GLEANING COFFEE FROM MINAS GERAIS AND BAHIA CERRADO

Abstract:

Brazil has an outstanding position in coffee production and consumption. The region named Triângulo Mineiro in Minas Gerais is known by the expressive production and the Cerrado Baiano in Bahia, present high quality of the grains. Despite crescent demands of consumers, it is still common the use of grains with long permanence on soil in crop composition. This work aims the study coffee fruits with exposition for 90 days in soil, evaluating ochratoxin A (OTA) levels, moisture content dynamic and water activity in fruits harvested every 30 days. It is important to notice that these regions have distinct edafoclimatic conditions. Results showed those differences had influenced grains moisture content and water activity consequentially. After 90 days, Cerrado Mineiro region, values of 14.15% and 0.74 were observed for moisture content and water activity, respectively. Whereas in Cerrado Baiano these values were 6.64% and 0.63. Coffee grains with long term soil permanence presented high OTA contamination, resulting within 90 days, in medium values of 49.42 and 30.93 $\mu\text{g} \cdot \text{Kg}^{-1}$ in Cerrado Mineiro and Cerrado Baiano, respectively. There was OTA production even in grains presenting low water activity, indicating how the complexity of field system interferes on the ochratoxigenic dynamic fungi growing and consequently in OTA production.

Key-words: *Coffea arabica* L.; mycotoxin; high performance liquid chromatography; water activity; moisture content

Introdução

O Brasil exportou em 2005 aproximadamente US\$2,5 bilhões em grãos de café (ABIC, 2007), um montante expressivo na comercialização mundial dessa *comoditie*. Ao mesmo tempo que caracteriza-se como um dos principais exportadores, o país destaca-se também como o segundo maior consumidor de café, com expressivas 16 milhões de sacas consumidas em 2005 (ABIC, 2007). Nesse sentido, alguns estados brasileiros se destacam no cenário produtivo nacional; onde a região do Cerrado Mineiro destaca-se pelo volume produzido, enquanto a região do Cerrado Baiano pela qualidade dos grãos produzidos.

No decorrer da safra, frutos cerejas, brocados e secos não colhidos oportunamente se destacam da planta e acumulam sob suas copas. Esses frutos podem permanecer por um período prolongado de permanência no solo, compondo muitas vezes parte da produção ao final da colheita (café de varrição) (Bartholo, 1988). Existem indicações de que esses frutos sejam fonte potencial de contaminação por ocratoxina A, contribuindo negativamente para a qualidade dos grãos produzidos e comercializados. As diferentes condições edafoclimáticas dessas regiões podem interferir na cinética de umidade dos grãos de café, ocasionando alterações na atividade de água, permitindo o desenvolvimento de fungos micotoxigênicos. Esses, por sua vez, sob condições favoráveis, podem iniciar a produção de ocratoxina A.

Estratégias eficientes de controle da presença de OTA em café devem ser adotadas, por representarem entraves na comercialização desse produto e também por colocarem em risco a saúde dos consumidores. Nesse sentido, os mercados importadores estão cada vez mais exigentes, reduzindo os níveis de tolerância de OTA (Furlani & Soares, 1999). Atualmente os países membros da Comunidade Européia toleram níveis de contaminação por ocratoxina A em café cru que variam entre 5 e 20µg.Kg⁻¹. Os níveis de tolerância variam conforme o país importador. A Itália, por exemplo, é o mais exigente adotando o limite mínimo. Esses valores obrigam os países exportadores a adotarem medidas cada vez mais eficazes de controle de qualidade de seus produtos, garantindo desse modo a sua presença no competitivo mercado internacional.

A qualidade do café vêm sendo o tema de esforços no âmbito nacional na tentativa de tornar o produto brasileiro mais competitivo frente a países como Colômbia e Vietnã; que juntos responderam em 2006 por 26% das exportações mundiais (Secretaria de Estado da Agricultura, Abastecimento, Aquicultura e Pesca do Espírito Santo, 2007). Nesse sentido, o presente trabalho teve por objetivo estudar a contaminação por ocratoxina A e fatores relacionados à sua produção, tais como umidade e atividade de água dos frutos de café; possibilitando dessa forma, o levantamento de informações relativas ao risco de utilização desses frutos na composição da safra a ser comercializada.

Material e Métodos

Local, Colheita e Material Vegetal

Os estudos pertinentes à permanência prolongada dos frutos de café no solo (café de varrição) foram conduzidos em fazendas produtoras de café arábica (*Coffea arabica* L.) situadas nos municípios de Patrocínio e Luiz Eduardo Magalhães (LEM), localizados no cerrado Mineiro (região do Triângulo Mineiro) e Baiano, respectivamente.

A colheita foi realizada durante a safra de 2005 e os frutos coletados foram depositados sobre a projeção das copas dos cafeeiros (“saia”), formando uma fina camada de modo que todos os frutos entrassem em contato com o solo. Nesse sentido os mesmos permaneceram em contato com o solo por até 90dias, sendo realizadas coletas de material para os ensaios a cada 30dias. Os materiais coletados nas respectivas regiões seguiram para análise nos laboratórios da Embrapa Agroindústria de Alimentos, localizada no Rio de Janeiro-RJ.

Processamento e Acondicionamento das Amostras

O café destinado às análises de atividade de água e OTA foi moído até a sua completa pulverização, e imediatamente enviado para a análise de atividade de água. As amostras destinadas à detecção de OTA foram acondicionadas em embalagens flexíveis aluminizadas e mantidas à -20°C até o momento da análise.

Análise de Atividade de Água (a_w), Umidade e Ocratoxina A (OTA)

Amostras de 5g de frutos de café pulverizados foram analisadas para Atividade de Água através de um analisador Novasina AW Sprint TH-500. A umidade, por sua vez, foi determinada através da secagem em estufa de 5g de café à 25mmHg segundo a AOAC, 2000 (Método: 968.11; 2000)

A extração de OTA foi realizada conforme o determinado pela Portaria n.49 de 3 set. 1999 (Diário Oficial da União, Brasília, n.177, 15 set. 1999. Seção I, p.27); onde 25g do material previamente pulverizado foi extraído em blender a 5000rpm durante 4min na presença de 100mL de metanol Tedia e 100mL de uma solução de Bicarbonato de Sódio 3% (30g de NaHCO₃ Quimex 99% em 1L de água destilada). O material extraído foi filtrado primeiramente em papel de filtro qualitativo de filtragem rápida, seguida da filtragem à vácuo em membranas de fibra de vidro de 1µm e de teflon de 0,45µm. Do filtrado foi tomada uma alíquota de 4mL e adicionado de 96mL de solução tampão PBS (2g de KH₂PO₄, 1,2g de Na₂HPO₄, 8,0g de NaCl e 0,2g KCl dissolvidos em 1L de água destilada) em erlenmeyer e agitado manualmente. A solução resultante foi transferida quantitativamente em colunas de imunoafinidade (Ochratest[®]) e eluída sob um fluxo de 2 a 3mL.min⁻¹. Terminada a transferência, as colunas foram lavadas com 10mL de água ultra pura, seguida da extração da micotoxina pela eluição de 4mL de metanol (Tedia[®] grau HPLC). O eluato foi levado à secura sob fluxo de N₂ ultra puro em banho-maria mantido à 50°C. Após secas, as amostras foram ressuspensas em 300µL da solução utilizada como fase móvel na corrida cromatográfica.

A OTA foi analisada por cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (CLAE-FR) em um sistema modular Waters composto por Degasser; Bomba W600; Injetor Automático W717 PLUS; Coluna XTerra[®] (25cm×3,8cm e 5µm de diâmetro de partícula), protegida por uma coluna guarda C₁₈ (2×1,8cm; Porapaq Q[®]) e Detector de Fluorescência 2495. Nesse sentido, 20µL da amostra ressuspensa foram injetadas sob fluxo isocrático de 0,8mL.min⁻¹ de uma solução de Acetonitrila:Metanol:Água:Ácido Acético (35:35:29:1; v/v/v/v) com posterior detecção por fluorescência à λexc.: 333nm e λem.: 476nm e verificação da presença de OTA pela comparação dos resultados com um padrão de calibração Sigma[®] (padronização externa) com posterior interpretação dos dados com auxílio do software Millenium[®] que acompanha o sistema cromatográfico.

Resultados e Discussão

Os frutos de café colhidos nos municípios de Patrocínio e Luiz Eduardo Magalhães (LEM) apresentaram inicialmente umidade de 7,27 e 5,90%, respectivamente, não diferindo entre si de acordo como limite de confiança (Figura 1).

A partir do tempo “0” verificou-se diferença entre as taxas de da umidade dos frutos em contato com o solo (Figura 1). Os colhidos em Patrocínio apresentaram médias maiores do que aqueles colhidos em LEM (Figura 1). Em Patrocínio os teores de umidade apenas variaram significativamente entre o 30º e o 60º dia (Tabela 1), quando a umidade saltou de 8,95% para 13,38% (Figura 1). As variações na umidade dos frutos de varrição colhidos em LEM foram menos expressivas. Apenas a amostra inicial apresentou diferença significativa dos demais tempos de exposição dos frutos ao solo. Nessa região, após 90 dias de exposição, os frutos apresentaram 6,87% de umidade (Figura e Tabela 1).

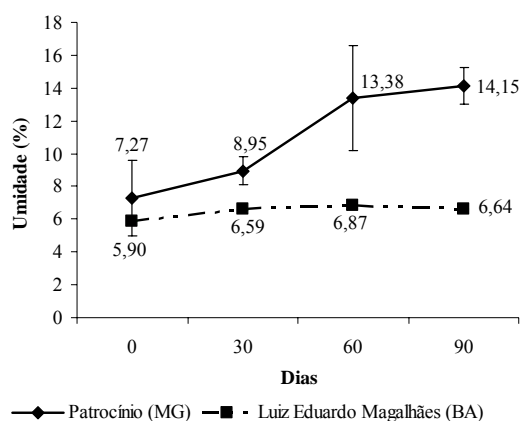


Figura 1 – Umidade em grãos de café com persistência prolongada no solo provenientes do Cerrado Mineiro (Patrocínio) e do Cerrado Baiano (LEM), com valores expressos em porcentagem (%). Barras verticais indicam os limites de confiança ao nível de 95% pelo teste “t”.

A atividade de água (a_w) seguiu o esperado, em vista da cinética de umidade apresentada pelos frutos colhidos nas diferentes regiões estudadas (Figuras 1 e 2). Em Patrocínio, o café de varrição apresentou a_w inicial de 0,61, permanecendo significativamente inalterada até 30 dias de exposição no solo (Tabela 1). A partir do 60º dia verificou-se aumento significativo na a_w (0,68), encerrando aos 90 dias com valores de 0,74 (Figura 2)

Contrário ao observado em Patrocínio, a a_w em LEM não diferiu significativamente durante o período de exposição dos frutos no solo; apresentando valores que variaram entre 0,61 e 0,64 durante o período estudado (Tabela 1 e Figura 2). Por sua vez, entre as regiões, ocorreu diferença significativa entre os valores de a_w somente a partir do 60º dia, devido ao aumento acelerado na a_w das amostras de café colhidas em Patrocínio, uma vez que em LEM esses valores permaneceram quase que constantes (Tabela 1 e Figura 2).

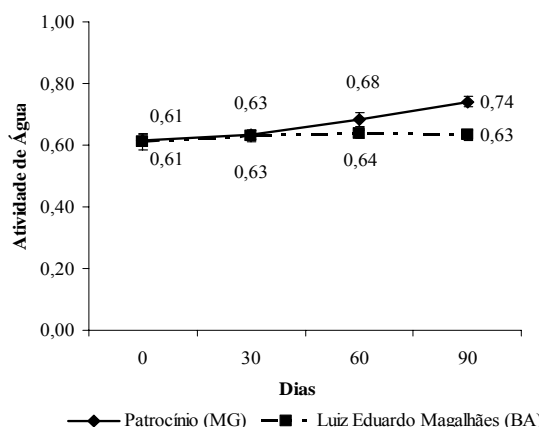


Figura 2 – Atividade de água (a_w) em grãos de café com persistência prolongada no solo provenientes dos Cerrados Mineiro (Patrocínio) e Baiano (LEM). Barras verticais indicam os limites de confiança ao nível de 95% pelo teste “t”.

Houve, no café de varrição, a detecção de níveis muito elevados de ocratoxina A, nas duas regiões estudadas (Figura 3). Porém, com maior destaque para os frutos provenientes de Patrocínio, onde a partir do 30º dia de contato com o solo, uma acelerada produção dessa micotoxina culminou com níveis de 47,98 e 49,42 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ aos 60 e 90 dias, respectivamente (Figura 3). Esses valores são pelo menos 2,4 vezes maiores do que o máximo permitido pela Comunidade Européia, que varia entre 5 e 20 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ de café verde. Em LEM a produção de OTA ultrapassou os limites internacionais após 60 dias de contato com o solo, atingindo aos 90, 30,93 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ de OTA (Figura 3).

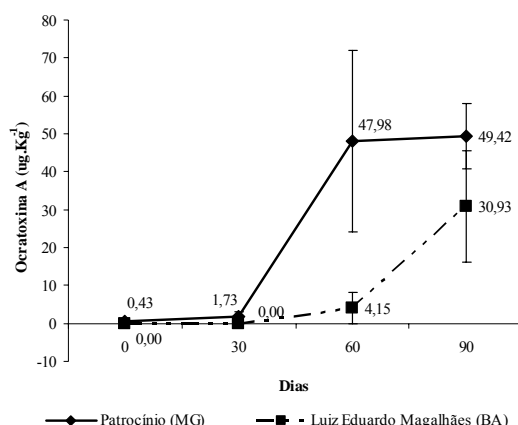


Figura 3 – Contaminação por ocratoxina A (OTA) em grãos de café com persistência prolongada no solo provenientes do Cerrado Mineiro (Patrocínio) e Baiano (LEM), com valores expressos em $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ de OTA. Barras verticais indicam os limites de confiança ao nível de 95% pelo teste “t”.

Os resultados demonstraram que o período de exposição do café no solo contribuiu para elevar os níveis de OTA nas amostras estudadas. Por sua vez as condições edafoclimáticas de cada região interferiram na dinâmica do fruto no solo, mesmo que os frutos tivessem sido colhidos ainda no período da seca. Na região do Cerrado Mineiro, por exemplo, a umidade média dos frutos foi superior ao encontrado no Cerrado Baiano, com a atividade de água dos frutos seguindo a mesma tendência. Independente da região estudada, os valores de a_w encontrados estavam abaixo do mínimo necessário para a produção de ocratoxina A conforme citado pela literatura (Pardo et al., 2004a e b; Ramos et al., 1998; Palácios-Cabrera, et al., 2004). Ressalta-se também, que nessa região houve um pico de produção de ocratoxina A aos 90 dias, mesmo com os frutos apresentando uma atividade de água de 0,64.

Tabela 1 – Umidade, atividade de água e ocratoxina A em cafés com persistência prolongada no solo colhidos em fazendas localizadas nas regiões de Cerrado Mineiro e Baiano.

Região:	Cerrado Mineiro (Patrocínio)			Cerrado Baiano (Luiz Eduardo Magalhães)			
	Exposição (Dias)	Umidade (%)	Atividade de Água (a_w)	Ocratoxina A (OTA) ($\mu\text{g.Kg}^{-1}$)	Umidade (%)	Atividade de Água (a_w)	Ocratoxina A (OTA) ($\mu\text{g.Kg}^{-1}$)
	0	7,27 a ¹	0,61 a ¹	0,43 a ¹	5,90 a ¹	0,61 a ¹	0,1 ² a ¹
	30	8,95 a	0,63 a	1,72 a	6,59 a	0,63 a	0,1 ² a
	60	13,38 b	0,68 b	47,98 b	6,64 b	0,63 b	4,15 b
	90	14,15 b	0,74 c	49,42 b	6,87 b	0,64 c	30,93 b

¹Médias seguidas de uma mesma letra não diferenciam entre si ao nível de 95% de significância pelo teste de Tukey.

²Valores referentes ao limite mínimo de detecção e quantificação do método utilizado

Desse modo, há indicação que sob condições de campo, durante a permanência prolongada do fruto no solo, outros fatores; sejam eles bióticos ou abióticos, influenciam decisivamente na dinâmica de produção de OTA. A complexidade do microambiente formado no local onde os frutos se depositam, contrastam com o ambiente controlado *in vitro* em que os estudos dessas interações são desenvolvidos. Isso demonstra que mesmo sob condições de estresse vinculadas à atividade de água, fatores bióticos (competição, por exemplo) ou mesmo abióticos aos quais os fungos ocratoxigênicos ficam expostos, são decisivamente importantes para a produção de OTA em café de varrição.

Conclusões

Os resultados apresentados confirmaram que o café de varrição é uma fonte potencial de contaminação por ocratoxina A, onde os níveis detectados ultrapassaram em até 2,4 vezes o máximo permitido por alguns países membros da Comunidade Européia. A região produtora influenciou no teor de umidade e, por conseqüência, na atividade de água dos grãos. Nesse sentido, os maiores teores de umidade e a_w foram encontrados nos cafés de varrição do Cerrado Mineiro. Mesmo o Cerrado Baiano apresentando umidade e a_w menores, aos 90 dias de permanência no solo, a quantidade de OTA produzida não diferiu significativamente da região Mineira. Houve produção de OTA mesmo em grãos apresentando a_w

baixa, demonstrando que, a campo, a complexidade do sistema interfere na dinâmica do desenvolvimento de fungos ocratoxigênicos e, por consequência, na produção de OTA.

Referências Bibliográficas

ABIC – Associação Brasileira das Indústrias de Café. Disponível em <<http://www.abic.com.br/estatisticas.html>>. Acesso em: 13 mar. 2007.

AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS INTERNATIONAL. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 17.ed. Gaithersburg: AOAC, 2000. Official Method nº 968.11.

Secretaria de Estado da Agricultura, Abastecimento, Aquicultura e Pesca do Espírito Santo. Disponível em <<http://www.seag.es.gov.br/cafe.htm>> Acesso em: 10 mar. 2007.

BARTHOLO, G. F. Cuidados na colheita, no preparo e no armazenamento do café. **Informe Agropecuário**, v. 14, n. 162, p. 33-44, 1988

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Portaria n.49 de 3 set. 1999. **Diário Oficial da União**, Brasília, n.177, 15 set. 1999. Seção I, p.27

FURLANI, R. P. Z.; SOARES, L. M. V. Revisão: Ocratoxina A em café. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 2, n. 1,2, p. 1-6, 1999.

PALACIOS-CABRERA, H.; TANIWAKI M. H.; MENEZES, H. C.; IAMANAKA, B. T. The production of ochratoxin A by *Aspergillus ochraceus* in raw coffee at different equilibrium relative humidity and under alternating temperatures. **Food Control**, v. 15; p. 531–535, 2004.

PARDO, E.; MARIN, S.; SANCHIS, V.; RAMOS, A. J. Prediction of fungal growth and ochratoxin A production by *Aspergillus ochraceus* on irradiated barley grain as influenced by temperature and water activity. **International Journal of Food Microbiology**, v. 95, p. 79-88, 2004.

PARDO, E.; MARÍN, S.; SOLSONA, A.; SANCHIS, V.; RAMOS, A. J. Modeling of germination and growth of ochratoxigenic isolates of *Aspergillus ochraceus* as affected by water activity and temperature on a barley-based médium. **Food Microbiology**, v. 21, p. 267–274, 2004.

RAMOS, A. J.; LABERNIA, N.; MARIN, S.; SANCHIS, V., MAGAN, N. Effect of water activity and temperature on growth and ochratoxin production by three strains of *Aspergillus ochraceus* on a barley extract medium and on barley grains. **International Journal of Food Microbiology**, v. 44, p. 133–140, 1998.