

INFLUÊNCIA DOS FUNGOS NO AROMA DO CAFÉ

FELIPE NAKANO¹; BEATRIZ T. IAMANAKA²; DANIEL P. LEMES¹; MARTA H. TANIWAKI³

Nº 0801023

1. RESUMO

O presente estudo teve como objetivo avaliar a influência dos fungos presentes nos grãos de café cru, no aroma e sabor final da bebida. No total foram avaliadas 29 amostras e 521 fungos foram isolados e identificados. Três foram às espécies escolhidas para serem estudadas neste trabalho, *Aspergillus foetidus*, *Penicillium brevicompactum* e *P. crustosum*. Com o objetivo de avaliar a influência dessas espécies na qualidade da bebida, foi otimizado um método para a inoculação das mesmas no café, seguida da análise sensorial. Os metabólitos voláteis produzidos por essas espécies no café também foram avaliados e identificados. Para a extração e identificação dos voláteis do café cru, foram empregadas as técnicas Headspace/SPME (Microextração em Fase Sólida), Cromatografia Gasosa e Espectrometria de Massas.

2. ABSTRACT

The present study had the objective to evaluate the influence of the fungi present at the raw coffee beans, on the flavor and taste of the coffee beverage. In totally 29 samples were analyzed and 521 fungi were isolated and identified. Three species were chosen to be studied in this work, *Aspergillus foetidus*, *Penicillium brevicompactum* e *P. crustosum*. With the objective to evaluate the influence of these species on the beverage quality, a method was optimized to inoculate the fungi on the coffee, followed by sensorial tests. The volatile metabolites produced by these species on the coffee were analyzed and identified. To extract and identify the volatiles from the inoculated coffee, Headspace/SPME (Solid Phase Micro Extraction), Gas Chromatography and Mass spectrometry were used.

3. INTRODUÇÃO

A qualidade da bebida é decorrente da somatória de inúmeros fatores e dentre eles sabe-se que o problema da contaminação microbiana do fruto e a intensidade de sua proliferação

1. BOLSISTA CNPq: Graduação em Eng. de Alimentos, UNICAMP, Campinas-SP, ✉ nakano@fea.unicamp.br

2. ORIENTADOR: Pesquisadora, CCQA /ITAL, Campinas-SP

3. COLABORAR: Pesquisadora, CCQA /ITAL, Campinas-SP

nas etapas cruciais de secagem em condições naturais ou artificiais, são componentes fundamentais na definição da qualidade final da bebida. Esta contaminação dos grãos é bastante diversificada e complexa, envolvendo a participação de bactérias, bolores e leveduras, com a predominância de um ou outro grupo, dependendo da etapa do processo e das condições ambientais.

O sabor característico do café deve-se à presença e aos teores de vários constituintes químicos voláteis, destacando-se, entre eles, os ácidos, aldeídos, cetonas, açúcares, proteínas, aminoácidos, ácidos graxos, compostos fenólicos, entre outros, e também à ação de enzimas que alguns destes constituintes irão formar. Os fungos são conhecidos como produtores de uma larga quantidade de metabólitos voláteis. Vários metabólitos voláteis como ácido tricloroanisol (TCA), geosmina e terpenos têm sido encontrados na bebida do café, e estes metabólitos dão um sabor indesejável conhecidos como “off flavours”.

Os metabólitos voláteis são produzidos pelos fungos no substrato durante sua fase de crescimento (Borjesson *et al.*, 1994); sendo mais comuns a 3-octanona, o 1-octeno-3-ol, o 3-metil-1-butanol e o 3-metilfuran (Kaminski *et al.*, 1974, Borjesson *et al.*, 1992).

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

Vários aromas como chocolate, rosa, floral, baunilha, fruta, cítrico podem ser encontrados em cafés de boa qualidade (Illy, 2002). O termo “riado” foi primeiramente usado nos cafés provenientes do Estado do Rio de Janeiro. Os compostos responsáveis pelo aroma “riado” foram caracterizados por diversos autores (Spadone *et al.*, 1990; Spadone & Liardon, 1988) e o ácido tricloroanisol (TCA) foi um importante contribuidor do aroma “riado”. Embora o café “riado” seja conhecido por gerações, o conhecimento da origem e a causa do aroma ainda é limitado. De acordo com Spadone *et al.* (1990) cerca de 20% da produção de café do Brasil apresenta o aroma “riado”. TCA foi encontrado em todas as amostras “riadas”, em concentrações de 1 a 100 µg/kg. Após a torração, mais de 50% do TCA ainda estava presente no café.

3. OBJETIVOS

- Avaliar a microbiota fúngica de cafés de duas regiões do Brasil, Minas Gerais e São Paulo.

- Isolar os fungos predominantes e avaliar os principais metabólitos voláteis produzidos por ele no meio de cultura e no café cru
- Realizar análise sensorial da bebida e avaliar a correlação entre os metabólitos voláteis do café com a presença dos fungos

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Coleta do café

Amostras de café (*Coffea arabica*) foram coletadas de Pirajú-SP e Patrocínio-MG.

4.2 Análises Micológicas

4.2.1 Isolamento dos fungos do café

Os grãos foram desinfectados em solução de hipoclorito de sódio 0,4%, plaqueados em Ágar DG18 e incubados à 25°C por 5 a 7 dias.

4.2.2 Identificação dos fungos

Os fungos foram isolados de acordo com as chaves de identificação de Pitt (1988), Klich & Pitt (1988), Pitt & Hocking (1997) e Samsom et. al. (1996).

4.3 Análise dos voláteis presentes no café inoculado com os fungos

4.3.1 Irradiação do café

Para garantir o somente o crescimento das espécies fúngicas em estudo, o café foi esterilizado utilizando radiação ionizante (raios gama – Co-60) na empresa CBE (Companhia Brasileira de Esterilização). O dose utilizada foi de 3 KGray.

4.3.2 Inoculação dos fungos no café

Para o preparo do inóculo, foi realizada uma raspagem de todo o micélio fúngico da placa das cepas testadas e diluição do material em água peptonada com 0,1% de tween 80 e pérolas de vidro. Para a contaminação dos grãos foi utilizada uma alíquota da diluição 10^6 esporos/mL em 150g de café verde.

4.3.3 Análise sensorial

O café foi extraído em três formas: infusão, percolação e expresso. E avaliado segundo: corpo, aroma, acidez, amargor, adstringência e doçura além de outros aspectos positivos e negativos de sabor e aroma.

4.3.4 Análise de voláteis

A extração foi realizada conforme a técnica de Headspace-Microextração em Fase Sólida (SPME) utilizando a fibra (DVB/CAR/PDMS) da Supelco. A fibra foi exposta ao café por 30 min a 65°C.

4.3.5 Condições cromatográficas e identificação dos compostos voláteis

A técnica utilizada foi a cromatografia gasosa (CG 6890 Agilent) e espectrometria de massas (MS 5973 Agilent). Os voláteis foram dessorvidos da fibra diretamente no injetor a 270°C, modo splitless, com tempo exposição de 0.7min. As condições cromatográfica foram as seguintes: coluna Supelcowax 60m x 0.25mm x 0.25µm (polar), com programação de temperatura de 40°C (3 min) a 250°C e gradiente de 5°C/min. Os compostos voláteis foram identificados pelo seu espectro de massas e tempo de retenção e comparados com os espectros da biblioteca Nist 98.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O total de fungos isolados dos cafés de Patrocínio/MG encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1. Fungos isolados de amostras de café cru da região de Patrocínio no estado de MG.

Nº	Prepar o	Total	%	<i>Eurotium</i>	<i>Eurotium</i>	<i>Eurotium</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Fusarium</i>
				<i>rubrum</i>	<i>repens</i>	<i>Chevalieri</i>	<i>sp</i>	<i>lateritium</i>
1	Desc	4	8	3(6)			1(2)	
2	Desc	3	6			1(2)	2(4)	
3	Desc	2	4	1(2)			1(2)	
4	Desc	4	8	3(6)		1(2)		
5	Desc	3	6	1(2)		1(2)	1(2)	
6	Desc	1	2				1(2)	
7	Desc	3	6	2(4)				
8	Desc	2	4	2(4)				
9	Nat	5	10	4(8)				
10	Nat	9	18	2(4)			6(12)	
11	Desc	5	10	5(10)				
12	Nat	10	20	1(2)				9(18)
13	Nat	2	4	1(2)	1(2)			
14	Nat	1	2					1(2)
15	Nat	6	12	4(8)	1(2)			1(2)
16	Nat	10	20	3(6)		1(2)		3(6)
17	Nat	1	2					1(2)
18	Nat	4	8					3(6)
19	Nat	3	6					3(6)

Na região de Minas Gerais, dois tipos de cafés foram analisados segundo o tipo de preparo: natural e descascado. Em geral, as amostras de Minas Gerais não apresentaram elevada contaminação fúngica (inferior a 20%) e as principais espécies isoladas foram *Eurotium spp* e *Fusarium spp*, fungos comumente encontrados em grãos de cafés verdes. A baixa contaminação fúngica em amostras provenientes de Minas Gerais (Cerrado Mineiro) foi também verificada em estudos realizados por Taniwaki et al. (2003) que encontraram a presença de fungos em apenas 23% das amostras analisadas e as porcentagens de infecção obtidas foram menores que 4%.

Apesar da baixa infecção, foi possível verificar que os cafés preparados naturalmente apresentaram contaminação fúngica ligeiramente maior do que os descascados. Esse fato pode ser explicado pela alta carga microbiana na casca do café onde podem estar presentes os fungos xerofílicos. Estas espécies são capazes de sobreviver ao processo de secagem, sendo responsáveis pela contaminação posterior dos grãos, como por exemplo, as espécies de *Eurotium*.

É possível verificar na tabela 2 uma alta incidência de fungos em todas as amostras analisadas provenientes dessa região (Piraju) e a microbiota se diferiu bastante dos cafés de Minas Gerais. Metade das amostras apresentou 100% de infecção fúngica, mesmo aquelas consideradas de alta qualidade, cujo resultado da avaliação sensorial no espresso foi positivo. As principais espécies isoladas foram *Penicillium brevicompactum*, *Penicillium crustosum*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus westerdijkiae* e *Fusarium lateritium*.

Tabela 2. Fungos isolados de café cru de café da região de Pirajú, São Paulo.

nº	Origem	Total	%	<i>P.</i>	<i>P.brevicompactum</i>	<i>A.westerdi</i>	<i>A.</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Fusarium</i>
				<i>crustosum</i>		<i>jkiae</i>	<i>foetidus</i>	<i>lateritium</i>	<i>oxysporium</i>
1	Tulha	51	100	4(8)	13(26)	2(4)	3(6)	14(28)	13(26)
2	Tulha	67	100		35(70)	1(2)	3(6)	19(38)	6(12)
3	Varreção	74	100		24(48)	15(30)	8(16)	25(50)	
4	Bóia	15	30		4(8)	2(4)	9(18)		
5	Cereja	32	64	4(8)	25(50)		2(4)	1(2)	
7	Tulha	15	30		5(10)		8(16)	2(4)	
8	Tulha	69	100	14(28)	31(62)		15(30)	6(12)	1(2)
9	Varreção	54	100	17(34)	5(10)		32(64)		
10	Bóia	28	56	5(10)	7(14)		11(22)	5(10)	
11	Verde	38	76		9(18)	2(4)	20(40)	5(10)	1(2)

Três foram os fungos escolhidos para serem estudados, *Penicillium*

brevicompactum, *Penicillium crustosum* e *Aspergillus foetidus*, todos isolados de cafés da região de Piraju. Em relação à presença de metabólitos tóxicos, as cepas testadas *Aspergillus foetidus* e *Penicillium crustosum* não foram produtoras de ocratoxina A, penitrem A e nem de possíveis micotoxinas relacionadas com essas espécies.

O café utilizado no teste foi submetido à irradiação ionizante Co-60. A dose utilizada foi de 3KGray. Esta foi capaz de esterilizar os grãos e não promover influência nas características sensoriais finais da bebida. Para a inoculação do café foi preparado um inóculo de concentração 10^6 esporos/mL.

A Tabela 3 apresenta os resultados da análise sensorial das amostras de cafés inoculados com os fungos. A presença de características indesejáveis como fermentado, mofo e terra estiveram presentes na amostra inoculada com *Aspergillus foetidus*; e fermentado forte e imaturo na amostra inoculada com *Penicillium crustosum*, conferindo a essas bebidas, resultados negativos na avaliação sensorial final. O contrário ocorreu com o café inoculado com *Penicillium brevicompactum*. Este apresentou avaliação final positiva e características desejáveis como presença de aroma floral, caramelo e doçura. A presença do aroma floral também foi detectada no café cru.

Tabela 3. Resultados da análise sensorial dos cafés inoculados com os fungos

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

Paralelamente aos ensaios de análise sensorial, foram avaliados os metabólitos voláteis tanto do café inoculado quanto dos fungos no meio de cultura, utilizando a técnica Headspace/SPME e CGMS. Quando os mesmos fungos foram inoculados no café cru, houve uma modificação na composição dos voláteis presentes como mostra a Tabela 4.

Tabela 4. Compostos voláteis presentes nas amostras de café cru inoculado com os fungos.

CAFÉ CRU + FUNGOS	COMPOSTOS VOLÁTEIS
<i>P. brevicompactum</i>	

Cetona	3-octanone; 2 -pentadecanone
Álcool	1-propanol 2-metil; 1-hexanol,
Outros	Phenol 2,6 bis 1,1 dimetil 4 eth, Myrcene
<i>P. crustosum</i>	
Cetona	2-pentadecanone; 5,9 undecadien 2-one 6,10 dimetil
Álcool	6-octen 1-ol 3, 7 dimetil; 4-hexen 1-ol 5-metil 2-1 metiletenil; 6-hepten 1-ol; 1-hexanol, 1-propanol 2- metil
Derivado de benzeno	1,2, 3,4 tetrahidronaphthalene
<i>Aspergillus foetidus</i>	
Álcool	1-propanol 2-metil; 1-octen 3-ol; 1-butanol 3-metil
Outros	Furan 2-metil

No café inoculado com *Penicillium brevicompactum* foi detectada a presença de cetonas como 3-octanone (odor herbal) e 2-pentadecanone caracterizado por apresentar aroma floral. Este composto pode ser um dos responsáveis pelas características positivas da bebida, detectadas na análise sensorial. Além desses compostos foram identificados também álcoois como 1-propanol 2 –metil e 1-hexanol e outros compostos como phenol 2,6 bis 1,1 dimetil 4 th e mycene. Este último apresenta odor agradável, é encontrado em plantas e utilizado em indústria de perfumaria. No café inoculado com *Penicillium crustosum* foi detectada a presença predominante de álcoois e 1,2,3,4 tetrahidronaphthalene que apresenta odor de mistura de benzeno e mentol e também identificado como aguarrás. No café inoculado com *Aspergillus foetidus*, foi detectada somente a presença de álcoois como 1-propanol 2-metil, 1 octen 3-ol e 1-butanol 3-metil. O composto 1-octen 3-ol é caracterizado por apresentar odor de terra. Além desses foi identificado neste café o furan 2-metil, com odor de chocolate.

Compostos com a característica características negativas, também foram detectados, principalmente nas amostras relacionadas com o *Aspergillus foetidus*. São eles 2-butenal (aroma pungente), benzeno 1,3 bis (1,1 dimetil etil) (odor de vegetal estragado), 2-nonanol (odor de pimenta), ácido acético, 2- pentil furano (odor de terra), dimetil dissulfito (odor sulfuroso) e 1-octen 3-ol (odor de terra). Esses resultados estão de acordo com os resultados da análise sensorial, cuja presença de características negativas como fermentado, mofo e terra, foi detectada pelos avaliadores.

A alteração das características sensoriais da bebida nas amostras inoculadas com o fungo pode também ser decorrente não somente dos compostos voláteis como também dos compostos químicos não voláteis, que após o processo de torração, sofrem modificações e/ou interações químicas com outros compostos, dando origem àqueles responsáveis pelas características finais da bebida.

6. CONCLUSÕES

A presença de compostos voláteis produzidos por fungos e a influência destes na qualidade de grãos do café cru foram confirmadas no presente trabalho. Contudo mais estudos são necessários para avaliar a influência da alta temperatura decorrente do processo de torração, nesses compostos identificados, avaliando se sofrem alguma modificação química ou se persistem nos grãos, conferindo à bebida as características descritas até o presente momento. Este trabalho encontra-se em andamento a fim de que sejam esclarecidos esses questionamentos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Borjesson, T.; Stollman, U. & Schnurer, J. 1992. Volatile metabolites produced by six fungal species compared with other indicators of fungal growth on cereal grains. **Appl. Environ. Microbiol.**, **58**: 2599-2605.
- Borjesson, T.; Stollman, U. & Schnurer, J. 1994. Adsorption of volatile fungal metabolites to wheat and subsequent desorption. **Cereal Chem.**, **71**: 16-20.
- Hubbal, J.A. & Collins, R.P. 1978. A study of factors affecting the synthesis of terpenes by *Ceratocystis variispora*. **Mycologia**, **70**: 117-129.
- Illy, E. 2002. The complexity of coffee. **Scient. Am.**, (June): 72-77.
- Kaminski, E.; Stawicki, S. & Wasowicz, E. 1974. Volatile flavour compounds produced by *Aspergillus*, *Penicillium* and fungi imperfect. **Appl. Microbiol.**, **27**: 1001-1004.
- Klich, M.A. & Pitt, J.I. A Laboratory Guide to Common *Aspergillus* species and their Teleomorphs. Sydney: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, 1988, 115p.
- Pitt, J.I. & Hocking, A.D. 1997. Fungi and food spoilage. London: Blackie Academic & Professional, 593p.
- Pitt, J.I. 1988. A Laboratory Guide to Common *Penicillium* Species. Sydney: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, 187p.
- Samson, R.A.; Hoekstra, E.S.; Frisvad, J.C. & Filtenborg, O. 1996. Introduction to Food-borne Fungi. 5th. ed. Baarn, Centraalbureau voor Schimmelcultures, 322p.
- Spadone, J.C. & Liardon, R. 1988. Identification of specific volatile components in Rio coffee beans. **Proc. 12th Intern. Col. Coffee**, Montreux, 1987, Paris: ASIC.
- Spadone, J.C.; Takeoka, G. & Liardon, R. 1990. Analytical investigation of Rio off-flavor in green coffee. **J. Agric. Food. Chem.**, **38**: 226-233.
- Taniwaki, M. H., Pitt, J. I., Teixeira, A. A., and 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.