

ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DE CAFÉ EM DIFERENTES ETAPAS DE PROCESSAMENTO OBTIDO PELA ESPÉCIE ANIMAL JACU (*Penelope ochrogaster*)¹

Luiz Severo da Silva Junior²; Jane Mary Lafayette Neves Gelinski³; Carlos Ricardo Soccol⁴

¹ Fonte financiadora: CNPq

² Professor Doutor em Ciência dos Alimentos – Universidade Estadual de Feira de Santana-BA. Departamento de Tecnologia.severo@uefs.br

³ Professora Doutora em Ciência dos Alimentos - Universidade do Oeste de Santa Catarina – Núcleo de Biotecnologia, Videira-SC. jgelinski@yahoo.com.br

⁴ Professor Doutor em Bioprocessos - Universidade Federal do Paraná – Departamento de Engenharia Química, Curitiba-PR. soccol@ufpr.br

RESUMO: Atualmente os segmentos alimentícios buscam cada vez mais melhorar a qualidade de seus produtos, não apenas para atender as exigências das Legislações, como também para oferecer produtos mais seguros aos consumidores. Esta pesquisa apresenta a primeira investigação científica realizada para o café proveniente da espécie Jacu (*Penelope Ochrogaster*) com relação às propriedades microbiológicas. O estudo avaliou a ocorrência de bactérias do grupo dos coliformes, de amostras de café originário da espécie animal Jacu, sob diversas condições de processamento. Estes cafés têm sido alvos de muitos comentários pelos consumidores em geral, devido a sua forma de obtenção, totalmente diferentes dos padrões tradicionais, e desafiando os conceitos da segurança alimentar, até então conhecidos. Para se obter um perfil de segurança do produto, foram realizadas análises microbiológicas para pesquisa de aeróbios totais, bolores e leveduras e termotolerantes a 45°C (Número Mais Provável-NMP) com pesquisa de *Escherichia coli* também por plaqueamento direto em três diferentes ágar seletivos em cada uma das amostras do estudo. Teste IMViC e sorologia pela reação de aglutinação com antígenos polivalentes para *E. coli* clássica foram realizados para os isolados com características de *E. coli* em ágar seletivos. Não foi confirmada a presença de *E. coli* pela técnica de NMP, porém pelo plaqueamento direto usando *Fluorocult ECD Agar* foram detectadas algumas colônias típicas do microorganismo, para as amostras de grão e fezes. Conclui-se que quanto ao consumo dessas novas variedades de café, não há restrição quanto aos aspectos de segurança alimentar para coliformes totais e fecais com presença de *Escherichia coli*, pois as fases de processamento para obtenção da bebida, envolvem etapas que reduzem e eliminam este perigo microbiológico, a níveis aceitáveis.

PALAVRAS-CHAVE: Café, Jacu, segurança alimentar.

MICROBIOLOGICAL QUALITY OF GUAN (*PENELOPE OCHROGASTER*) COFFEE BEANS AT DIFFERENT PROCESSING STAGES

ABSTRACT: Currently the food segments are increasingly seeking to improve the quality of their products, not only to meet the requirements of the Regulations, as well as to provide safety products for consumers. This research presents the first scientific research carried out for the coffee from the Guan species (*Penelope ochrogaster*) regarding the microbiological properties. The study evaluated the occurrence of coliform bacteria from the group, originating coffee samples of animal species Guan under various processing conditions. These coffees have been the target of many reviews by consumers in general, due to its determination, totally different from the traditional standards, and challenging the concepts of food security, then known. To obtain a product safety profile, microbiological analysis for total aerobic research were carried out, molds and yeasts and thermotolerant at 45 ° C (Most Probable Number-MPN) with *Escherichia coli* also search by plating directly on three different selective agars in each of the study samples. IMViC and serology testing for agglutination reaction with polyvalent antigens classical *E. coli* were performed for the isolated features with *E. coli* selective agars. It was confirmed the presence of *E. coli* by MPN technique, but by direct plating using *fluorocult ECD Agar* were detected some typical colonies of the microorganism, for grain and faeces samples. It follows that as the consumption of these new varieties of coffee, there is no restriction regarding food safety aspects for total coliforms and fecal with *Escherichia coli*, because the processing phases for obtaining the beverage involve steps that reduce and eliminate this microbiological hazard to acceptable levels.

KEYWORDS: Coffee, Guan, Food safety.

INTRODUÇÃO

A segurança alimentar é um desafio atual e visa à oferta de alimentos isentos de agentes que possam colocar em risco à saúde do consumidor. Em razão da complexidade dos fatores que afetam esta questão, ela deve ser analisada do ponto de vista de toda cadeia alimentar, desde a produção primária até a distribuição final ao consumidor (SOLIS, 1999). Em

todas as etapas, desde o campo até o consumo, os riscos de contaminação dos alimentos necessitam de uma avaliação completa, que é estabelecida através de normas aceitáveis para as boas práticas de produção e prestação de serviços na área de alimentos (PANETTA, 1998). A produção de alimentos inócuos e de qualidade tem se tornado uma exigência crescente do mercado consumidor e das agências de fiscalização e controle. Todo alimento está sujeito a contaminações por perigos químicos, físicos e microbiológicos durante a etapa de obtenção da matéria-prima, produção, processamento, embalagem, transporte, armazenamento, distribuição e consumo. Atualmente o Brasil é o maior produtor mundial de café, sendo responsável por 30% do mercado internacional de café, volume equivalente à soma da produção dos outros seis maiores países produtores. É também o segundo mercado consumidor, atrás somente dos Estados Unidos. As áreas cafeeiras estão concentradas no centro-sul do país, onde se destacam quatro estados produtores: Minas Gerais, São Paulo, Espírito Santo e Paraná. A região Nordeste também tem plantações na Bahia, e da região Norte pode-se destacar Rondônia. A produção de café arábica se concentra em São Paulo, Minas Gerais, Paraná, Bahia e parte do Espírito Santo, enquanto o café robusta é plantado principalmente no Espírito Santo e Rondônia, conforme dados da Associação Brasileira da Indústria de Café (ABIC, 2009). Os cuidados na colheita, composição química dos grãos em diferentes estágios de maturação, e a forma de secagem, influenciam no tipo de café a ser obtido. Dessa forma, têm sido realizadas várias pesquisas com o objetivo de caracterizar quimicamente os grãos de café, relacionando a composição química com a qualidade da bebida. Estes estudos abrangem componentes como açúcares, proteínas, polifenóis, enzimas, lipídios, assim como umidade, condutividade elétrica, lixiviação de potássio, entre outros (PIMENTA et al., 1997). A qualidade do café depende de vários fatores, que influenciam diretamente no grão, tais como, adubação, tratamentos fitossanitários, tipo de colheita, maturação, secagem, beneficiamento e armazenamento. Deve-se considerar que devido à cultura do café ser considerada perene, fatores como temperatura, forma de precipitações e umidade relativa do ar, pode promover maturações fora dos padrões, resultando em perda de qualidade do fruto (VILELA, 1997). Com a publicação da Portaria 368/97 do Ministério da Agricultura e do Abastecimento, estabeleceram-se os princípios das Boas Práticas de Fabricação nos quais se definem como partes do processo produtivo: área de procedência das matérias-primas, condições higiênico-sanitárias dos estabelecimentos elaboradores/industrializadores de alimentos, requisitos de higiene (limpeza e sanitização) dos estabelecimentos, requisitos de higiene na manipulação dos alimentos, condições de armazenamento/transporte de matérias primas e produtos acabados. Sendo esta ação, uma etapa de grande importância que tem como objetivo estabelecer princípios que venham a assegurar não só a segurança como também a qualidade dos alimentos elaborados/industrializados, de forma que não ofereçam perigos à saúde do consumidor. A composição química do café em grão depende de fatores ambientais, genéticos, e condições de manejo pré e pós-colheita, sendo a torração uma etapa essencial para a produção de compostos que conferem as características sensoriais do café. Os açúcares e as proteínas do grão são os principais componentes que contribuem para estas características de sabor e aroma do café torrado (CARVALHO et al., 1994). Com relação a todos estes problemas enfrentados pelas indústrias, mudanças significativas têm ocorrido na comercialização e no consumo do café torrado e moído. Os consumidores estão cada vez mais conscientes sobre a importância dos aspectos higiênico-sanitários do produto, e de maiores conhecimentos sobre a qualidade sensorial da bebida. Dessa forma, observa-se uma tendência do setor industrial em acompanhar a evolução deste mercado, oferecendo produtos diferenciados e criando estratégias para a valorização das marcas que preservem os aspectos desejados pelo consumidor, como o selo de pureza criado pela Associação Brasileira da Indústria do Café (ABIC, 2003). Pesquisas sobre novas variedades de café, como os obtidos pelas espécies animais *Luwak* (*Paradoxus hermaphroditus*) e *Jacu* (*Penelope ochrogaster*), ainda são muito escassas, quando comparadas com as pesquisas com outras variedades de grãos, justificando-se a realização dessa pesquisa, para conseguir-se obter um perfil microbiológico, com relação à contaminação por coliformes fecais no produto sob diferentes condições de processamento, e comprovando dessa forma, sua qualidade higiênico-sanitária.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção das amostras: as amostras dos grãos de café incorporados nas fezes da ave Jacu foram adquiridas em uma fazenda do Brasil, localizada no Estado do Espírito Santo. A Figura 1 apresenta os grãos de café após serem expelidos pela ave Jacu (*Penelope ochrogaster*)

As amostras foram analisadas durante o primeiro mês de obtenção, sob os diversos métodos de processamento, sendo mantidas em recipiente fechado de vidro, até serem submetidas às análises posteriores, para evitar deterioração e contaminação.

Etapas de beneficiamento:

As amostras de café em grão foram submetidas aos tratamentos de beneficiamento, seguindo as seguintes etapas:

a) Limpeza do grão e lavagem, com remoção de impurezas, com o intuito de se obter um material homogêneo e de melhor qualidade. A amostra de grão de café e fezes foi separada para prosseguimento nas análises microbiológicas. Após esta primeira etapa, os grãos foram separados das fezes, retirando os resíduos remanescentes e lavados com água potável corrente.

b) Secagem do grão:

O café permaneceu à temperatura ambiente, para evaporação do excesso de umidade. A partir desse momento, a secagem continuou por alta temperatura (200°C) por 20 minutos, para simular o processo de torrefação.

De acordo com os padrões internacionais de torra, foi considerado para este estudo, o *estágio City*, onde a temperatura interna do grão, chega a atingir de 200° C a 213° C. Neste ponto, o café tem expansão devido ao escape de gases, marcando o ponto onde a água e o gás carbônico tomam caminhos separados. O intervalo de temperatura de 205 °C e 220°C representa a temperatura de torra do “pico do sabor”.

Preparo das Amostras:

Um *pool* de cada amostra foi homogeneizado e sub-amostras de 10g (unidades analíticas) foram separadas para análise:

- Amostras de fezes de Jacu associadas a grãos de café: material fecal seco contendo grãos de café foi acondicionado sob condições assépticas para retiradas de unidades analíticas de 10g cada para análises microbiológicas. Cada unidade analítica foi transferida para saco plástico estéril seguidos da adição (1:10) de solução diluente de peptona bacteriológica a 0,1% estéril (Himedia, Brasil) e homogeneizada suavemente para não quebrar os grãos.

- Amostras de grãos de café lavados em água potável corrente: das mesmas amostras de fezes contendo grãos de café foram separadas unidades analíticas de 10 g separando-se os grãos e estes lavados em água potável corrente usando-se peneira; as amostras foram novamente pesadas para formação de unidades analíticas de 10g cada.

Grãos de café torrados: as amostras utilizadas na etapa anterior (grãos limpos) foram retiradas da solução diluente, após utilização das alíquotas necessárias ao preparo das diluições decimais seriadas das análises microbiológicas. Os grãos foram então submetidos à torrefação em estufa de secagem modelo Q317M-13 (Quimis, Brazil) na temperatura de 200°C por 20 min.

Controle: água potável corrente: 100 mL de água potável foram utilizados para análise microbiológica da água utilizada na lavagem dos grãos, através da técnica dos tubos múltiplos-NMP (Feng Weagant & Grant, 2002;) em série de 10 tubos contendo caldo Lauril Sulfato Triptose LST em dupla concentração (Oxoid, England).

Análises microbiológicas:

Como critério microbiológico, foi utilizado um plano de amostragem, no qual se definiu o número de unidades a serem analisadas e o tamanho de cada unidade. A definição dos micro-organismos que deveriam ser estudados em cada amostra, indicou a definição da metodologia analítica a ser adotada, destacando-se os coliformes fecais, e o estabelecimento dos padrões, normas e especificações que definirão se o produto é considerado conforme ou não-conforme.

A metodologia para amostragem, coleta, acondicionamento, transporte e análise adequada a cada tipo de amostra, seguiu ao disposto nos métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Brazil, 2003) assim como o especificado pelo FDA's Bacteriological Analytical Manual (Feng Weagant & Grant, 2002;). Para os grãos limpos, a avaliação dos resultados das análises microbiológicas levou em consideração os padrões microbiológicos de acordo com a RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brazil, 2001). As análises microbiológicas foram realizadas para determinação e contagem de coliformes a 45°C, contagem total de aeróbios e de bolores e leveduras:

a) Coliformes Totais: procedimento de três tubo NMP para coliformes: uma amostra de 25 g foi removida e imediatamente diluídas 1:10 com 225 ml de solução salina esterilizada (0,85%) em um *Stomacher* estéril e homogeneizadas durante 1 min em homogeneizador. Toda a amostra foi diluída em 10 vezes em série, utilizados como inóculo para o procedimento NMP três tubo de coliformes, como acima descritos. Suspensão: 1 ml a partir de cada tubo foi transferida para ser diluída em caldo Lauril Sulfato de Triptose e incubada a 35 ° C durante 24-48 h. Inoculante: tubos com formação de gás, inoculados por 48 horas a 35° C foi transferido para um caldo Verde Brilhante Lactose (BGBL) incubadas a 35°C por 24-48 h e outros tubos com formação de gás, inoculados por 48 horas a 35° C foi transferido para Caldo EC. Tubos de Durham com turbidez e formação de gases, indicam a presença de coliformes totais e os mesmos tubos com turvação e formação de gases no tubo de Durham indica a presença de coliformes fecais. Os números para 1 g de amostra foram calculadas a partir da tabela de NMP.

b) Análises pela técnica de plaqueamento direto para pesquisa de *Escherichia coli*: seguiram-se baseadas na NBR 10204 da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, 1988), com modificações: as análises foram realizadas utilizando-se três diferentes meios seletivos: Agar Eosina Azul de Metileno-EMB, Agar MacConkey (ambos HiMedia, Índia) e ágar *Fluorocult ECD Agar* (Merck, Alemanha). Todas as diluições das amostras foram inoculadas em cada meio seletivo em triplicatas e incubadas por 48 h a 35°C, exceto para o ECD Agar que foi incubado por 24 h a 44° C. Neste último a visualização de colônias de *Escherichia coli* foi realizada através de lâmpada UV (366 nm). Considerando-se *E. coli* positiva quando observado luz azul fluorescente em cada colônia. Como prova bioquímica, 10-20 µL de reagente de Kovacs (Merck, Alemanha) foi posto sobre cada colônia em teste, e uma coloração rósea evidenciada em até 10 segundos foi indicadora de *Escherichia coli* indol positiva.

c) Contagem de aeróbios totais em placa e contagem de bolores e leveduras: plaqueamento direto em Plate Count Agar (HiMedia, Índia) e Potato Dextrose Agar (Acumedia, USA) respectivamente, a partir de diluições decimais seriadas das amostras. Todas as análises foram realizadas em duplicatas com uma repetição.

Cepas de *Enterococcus faecalis* ATCC 33186 e *Escherichia coli* ATCC 25922 foram utilizadas respectivamente como controles negativos e positivos de fermentação e produção de gás.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 apresenta as três fases do processamento para a obtenção do café Jacu, grãos impregnados com as fezes, grãos limpos e grãos torrados, respectivamente.



Figura 1. Fases do processamento para obtenção do café Jacu (*Penelope ochrogaster*): a) grãos associados a fezes de Jacu; b) grãos de café após lavagem em água portátil; c) grãos de café torrados.

Os resultados da ocorrência de coliformes a 45°C nas amostras de grão e fezes (GF), grão limpo (GL) e grão torrado (GT) estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Análise microbiológica em amostras de café sob diferentes estágios de processamento.

Pesquisa	Termotolerantes a 45°C		
	GF*	GL*	GT*
Coliformes Totais NMP*/g	$1,1 \times 10^2$	< 3,0	ausência
Coliformes Fecais NMP*/g	< 3,0	< 3,0	ausência
<i>Escherichia coli</i>	ausência	ausência	Ausência
Aeróbios totais em placa	$7,15 \times 10^6$ UFC/g	NR	NR
Bolores e leveduras	$1,9 \times 10^5$ UFC/g	NR	NR

NMP= Número Mais Provável; grão e fezes (GF); grão limpo (GL); grão torrado (GT).
NR= Não realizado

A ocorrência de coliformes a 45°C foi verificada nas amostras grão + fezes (GF) e grão limpo (GL) em todas as diluições pela contagem NMP/g. Não foram observadas ocorrências de coliformes a 45°C nas amostras do grão de café torrado (GT), certamente, pela alta temperatura (200°C) e tempo de exposição (20 min) que o grão de café foi submetido. Não foi detectada a presença de *E. coli* pela técnica de NMP, porém pelo plaqueamento direto usando o Agar Fluorocult ECD, conforme a Tabela 2, foram observadas colônias típicas do micro-organismo, para as amostras de grão e fezes (GF). O número reduzido de colônias de *E. coli* detectado nas amostras analisadas em relação ao número total de coliformes totais indica que a técnica do NMP deve ser acompanhada de outras técnicas de detecção de coliformes para amostras de fezes e grãos provenientes da alimentação da ave Jacu (*Penelope ochrogaster*). A legislação nacional (BRASIL, 2001) prevê um máximo de 10 UFC/g para coliformes a 45°C para grãos de café (torrado). Neste estudo mesmo antes de qualquer tratamento o NMP de coliformes termotolerantes ficou bem abaixo do permitido pela legislação para grãos limpos e torrados.

Tabela 2. Análise de coliformes totais e *Escherichia coli* por plaqueamento direto usando *Fluorocult ECD Agar*

Pesquisa	ANÁLISE POR PLAQUEAMENTO DIRETO EM MEIOS ESPECÍFICOS		
	GF*	GL*	GT*
Coliformes Totais UFC/g	$1,5 \times 10^3$	$2,9 \times 10^2$	ausência
<i>Escherichia coli</i> UFC/g	10	ausência	ausência

*grão e fezes (GF); grão limpo (GL); grão torrado (GT).

CONCLUSÕES

Com a pesquisa realizada, observou-se que os grãos de café do Jacu, após a etapa de torrefação, apresentaram resultados satisfatórios em termos de ausência de coliformes fecais, comprovando a inocuidade do produto, pela ausência desses microorganismos indicadores de condições higiênico-sanitárias inadequadas. Dessa forma, conclui-se que o consumo dessas novas variedades de café, não apresenta nenhuma restrição quanto aos aspectos de segurança alimentar para estes microorganismos, pois as fases de processamento para obtenção da bebida envolvem etapas que reduzem e eliminam este perigo microbiológico. Ressaltando-se o processo de torrefação, onde se consegue atingir temperaturas e tempo muito superiores àquelas que suportam estes micro-organismos, além da própria forma de preparação da bebida, onde o aquecimento da água atinge uma faixa sempre acima da temperatura de eliminação de bactérias patogênicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ. Anos 80 - Liberdade de preços e combate à fraude. *Jornal do Café, ABIC*: Rio de Janeiro, v.12, n.138, p. 8 - 9, maio, 2003.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 10204: Determinação do número de bactérias coliformes: contagem de coliformes em placas. Rio de Janeiro, 1988.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. "Official Methods of Analysis", 16th ed. Arlington, Virgínia, v. 2, cap. 49, p. 49-53, 1998.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. *Diário Oficial da União*. Brasília, DF, de 10 de janeiro de 2001. Disponível em < <http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>> Acesso em 11 março de 2015.
- BRASIL. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Aprova os Métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF: MAPA, 18 set. 2003. Seção 1, p. 14.
- BRASIL, Portaria nº 367, de 04 de setembro de 1997. Aprova o Regulamento Técnico sobre as condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Elaboradores / Industrializadores de Alimentos. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF: MAPA, 08 set. 1997. Seção 1, P. 1997.
- BRASIL. Portaria nº 377, de 26 de abril de 1999. Estabelece normas para fixar a identidade e as características mínimas de qualidade do café torrado em grão e café torrado e moído. *Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]*, Brasília., DF, 29 abr. 1999. Seção 1, nº 80-E.
- CARVALHO, V.D.; CHAGAS, S.J.R.; CHALFOUN, S.M.; BOTREL, N.JUSTE; JÚNIOR, E.S.G.. Relação entre a composição físico-química e química do grão beneficiado e a qualidade de bebida do café. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v; 29, n.3, p. 449-454, mar. 1994.
http://www.abic.com.br/scafe_historia.html#atualidade. Acesso em 21 de abril de 2015.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ (IAL). Normas Analíticas do Instituto... Métodos Químicos e Físicos para Análise de Alimentos. 4 ed. São Paulo: IAL, 1985. 1020 p.
- PANETTA, J.C. O Carater Educativo da Vigilância Sanitária. *Revista Higiene Alimentar*, São Paulo: DPI Studio e Editora, v.12, n.57, 1998.
- PIMENTA, C. J.; CHAGAS, S. J. de R.; COSTA, L. Polifenoloxidase, lixiviação de potássio e qualidade de bebida do café colhido em quatro estágios de maturação. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 32, n. 2, p. 171-177, fev. 1997.
- SCHMIDT, C.A.P.; MIGLIORANZA, E.; PRUDÊNCIO, S.H. Interação da torra e moagem do café na preferência do consumidor do oeste paranaense. *Ciência Rural*. Santa Maria, v.38, n.4, jul. 2008.
- SOLIS, C.S. Gestão e Certificação de Sistemas Alimentares Integrados. *Revista Higiene Alimentar*, São Paulo: DPI Studio e Editora, v.13, n.61, p. 91-98, 1999.
- VILELA, E.R. Secagem e Qualidade do Café. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, v.18, p.55-63, 1997.