

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ**

**GIOVANNA MACHADO BERGAMO**

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE AMOSTRAS  
DE CAFÉ TORRADO E MOÍDO E DE CAFÉ SOLÚVEL COMERCIAIS**

**LONDRINA**

**2022**

**GIOVANNA MACHADO BERGAMO**

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE AMOSTRAS  
DE CAFÉ TORRADO E MOÍDO E DE CAFÉ SOLÚVEL COMERCIAIS**

**EVALUATION OF MICROBIOLOGICAL QUALITY OF COMERCIALS SAMPLES FROM  
GROUND AND ROASTED COFFEE AND SOLUBLE COFFEES**

Trabalho de Conclusão de Curso 2, apresentado como requisito para obtenção do título de Licenciada em Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), campus Londrina.

Orientadora: Profa. Dra. Alessandra Stevanato.  
Co-orientador: Bruno Delafrente

**LONDRINA**

**2022**



4.0 Internacional

Esta licença permite compartilhamento, remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, mesmo para fins comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es). Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.

**GIOVANNA MACHADO BERGAMO**

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE AMOSTRAS  
DE CAFÉ TORRADO E MOÍDO E DE CAFÉ SOLÚVEL COMERCIAIS**

Trabalho de Conclusão de Curso 2 apresentado como requisito para obtenção do título de Licenciada em Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), campus Londrina.

Data de aprovação: 28 de junho de 2022.

---

Profa. Dra. Cristiana da Silva  
(UFGD – Faculdade de Ciência Exatas e Tecnologia)

---

Profa. Dra. Délia do Carmo Vieira  
(UTFPR – Departamento Acadêmico de Engenharia de Materiais)

---

Profa. Dra. Alessandra Stevanato  
(UTFPR – Departamento Acadêmico de Química)

**Londrina  
2022**

## RESUMO

O controle de qualidade nas indústrias visa garantir a segurança alimentar do produto durante e após o processo de fabricação e distribuição do mesmo, sendo o de controle microbiológico um dos mais relevantes, pois fornece informações quanto às condições de processamento, armazenamento e distribuição para o cliente, sua vida útil e risco à saúde da população. Segundo o site da Associação Brasileira da Indústria de Café Solúvel (ABICS), o consumo interno e a exportação de café obtiveram recordes históricos no ano de 2020, superando em 4,2% o ano de 2019. O presente trabalho teve como objetivo analisar e comparar a segurança microbiológica de nove amostras comerciais de café solúvel e torrado e moído, adquiridas no mercado, feira e produtor independente de Londrina-PR e uma amostra oriunda da cidade de Itaí-SP, quanto à presença ou não de colônias de bolor e levedura por meio da técnica de plaqueamento por superfície e a presença de *Salmonella* por meio da espectroscopia de fluorescência. Os resultados em todas as amostras foram negativos para a presença de *Salmonella*, os quais estão de acordo com a legislação brasileira, contudo, em duas amostras foram identificadas a presença de bolores e leveduras. Provavelmente, esta contaminação está relacionada ao processo de embalagem ou das condições de armazenamento das amostras.

Palavras-chave: Café em pó, Solúvel, Bolor, Levedura, *Salmonella*.

## ABSTRACT

The quality control in industry intend to offer food security of product during and after the manufacturing process and its distribution, the microbiological control is one of the most importants because it gives informations about the processing conditions, the storage and distribuiction to client, the lifespan and the risk to human health. The site Associação Brasileira da Industria de Café Solúvel (ABICS) confirms that the internal consume and theexportation of soluble coffee had historical records in 2020, overcoming 4,2 % from 2019. The present work had how objetc analyze and compare the microbiological security of ninesamples of commercials soluble coffees and roasted and ground coffee, from supermarket, free fair and independent producer in Londrina-PR and one sample from Itaip-SP, about the presence to colonies of mold and yeast using the technical of surface plating and the Salmonella presence ou absence using the fluorescence spectroscopy. The results in all samples were negative for the presence of *Salmonella*, which are in accordance with Brazilian legislation, however, in two samples the presence of molds and yeasts was identified. This contamination is probably related to the packaging process or the storage conditions of the samples.

Keyword: Powder coffee, Soluble, Mold, Yeast, *Salmonella*.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Café arábica (lado esquerdo) e robusta (lado direito) cru.	13
Figura 2. Gráfico que aponta a produtividade de café total (arábica e conilon) no Brasil em anos de bienalidade positiva e negativa.	15
Figura 3. Evolução do consumo interno de café no Brasil em 2020.	15
Figura 4. Torra do café.	17
Figura 5. Café verde cru e suas transformações durante a torra.	18
Figura 6. Aspectos dos diferentes tipos de cafés solúveis.	18
Figura 7. Resumo etapas de produção do café solúvel.	19
Figura 8. Café natural, café despulpado e café cereja descascado	20
Figura 9. Certificações do mercado de café solúvel.	22
Figura 10. Grãos estocados em sacas a céu aberto	23
Figura 11. Placa de petri com colônias de bolor.	25
Figura 12. Placa de petri com colônias de levedura	25
Figura 13. Milho infectado por Fumonisina, Zearalenona, Ocratoxina e Tricotezenos	26
Figura 14. Ilustração colorida da bactéria <i>Salmonella</i>	26
Figura 15. Cabine de Segurança Biológica – Fluxo laminar	32
Figura 16. Chapa aquecedora usada para dissolução do meio de cultura DG-18	32
Figura 17. Autoclave	32
Figura 18. Banho-maria (banho termostático)	33
Figura 19. Alça de Drigalski usada para espalhar o inóculo no meio de cultura	35
Figura 20. Contador de colônias	36
Figura 21. Barrete pertencente ao kit VIDAS@, no qual foi inserido a amostra para análise de <i>Salmonella</i>	38
Figura 22. Pipetagem da amostra preparada para o poço do barrete do kit VIDAS	38
Figura 23. VIDAS® HEAT AND GO, no qual foi realizado o aquecimento do barrete com a amostra	39
Figura 24. Aparelho VIDAS@ aonde foi feita a análise de <i>Salmonella</i>	39
Figura 25. Barretes dispostos no equipamento VIDAS@ após o aquecimento no HEAT AND GO	39

Figura 26. Cones SPR® inseridos no equipamento VIDAS® para análise de *Salmonella* 40

Figura 27. Lista das amostras dispostas no equipamento antes de iniciar a leitura 40

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Consumo interno de café em 2020.	16
Tabela 2. Identificação de amostras de cafés.	30
Tabela 3. Identificação dos erlenmeyers com as amostras pesadas em triplicatas	34
Tabela 4. Resultados obtidos na análise de quantificação de colônias de bolor e leveduras e ausência/presença de <i>Salmonella</i> .	41

## **LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS**

ABIC - Associação Brasileira da Indústria de Café  
ABICS - Associação Brasileira da Indústria de Café Solúvel  
APPCC - Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle  
CECAFE - Conselho dos Exportadores de Café do Brasil  
Conab - Companhia Nacional de Abastecimento  
DTA - Doenças Transmitidas por Alimentos  
ELFA - Ensaio fluorescente ligado à enzima  
IARC - Agência Internacional de Pesquisa em Câncer  
IOC - Organização Internacional do Café  
LAM - Laboratório de Análises Micotoxicológicas  
OMS - Organização Mundial da Saúde  
OTA - Ocratoxina  
PBS - Solução Tampão Fosfato  
SCS - Sacas  
UFC - Unidades Formadoras de Colônia

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	8
2 JUSTIFICATIVA.....	10
3 REFERENCIAL TEÓRICO.....	12
3.1 CAFÉ.....	12
3.1.1 Histórico.....	12
3.1.2 Espécies cultivadas.....	13
3.1.3 Produção.....	14
3.1.4 Consumo.....	15
3.2 Processamento industrial do café solúvel e seus produtos.....	16
3.3 Processo produtivo do café torrado e moído.....	20
3.4 Controle de Qualidade.....	22
3.5. Bolores e Leveduras.....	23
3.6 <i>Salmonella</i> .....	26
3.7 Riscos à saúde.....	28
4 OBJETIVOS.....	30
4.1 Objetivos específicos.....	30
5. METODOLOGIA.....	31
5.1 Aquisição de amostras.....	31
5.2 Análise de bolor e levedura.....	32
5.2.1 Preparo de soluções e de meio de cultura.....	32
5.2.2 Preparo das amostras.....	34
5.2.3 Técnica de inoculação por plaqueamento em superfície.....	36
5.2.4 Contagem das placas.....	36
5.3 Análise de <i>Salmonella</i> .....	37
5.3.1 Preparo de soluções (Água Peptonada Tamponada).....	38
5.3.2 Preparo das amostras.....	38
5.3.3 Método para análise.....	38
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
7. CONCLUSÃO.....	45
REFERÊNCIAS.....	46

## 1. INTRODUÇÃO

Atualmente o café é uma das bebidas mais consumidas no mundo, pois trata-se de uma bebida relativamente barata e muito apreciada devido suas características sensoriais. Segundo a pesquisa feita pela Associação Brasileira da Indústria de Café (ABIC) em 2020 houve um aumento de 1,34% no consumo interno de café no país, mantendo a posição de segundo maior consumidor de café do mundo. O consumo per capita em 2020 foi de 5,99 kg de café cru por ano e 4,79 kg de café torrado. Comisso, as empresas associadas a ABIC tiveram crescimento de 2,19% no período analisado.

A produção do café solúvel é baseada na seleção e limpeza dos grãos, extração do café já torrado e moído utilizando água e pressão, seguido da concentração através da centrifugação e/ou evaporação, e posterior secagem por liofilização (*freeze dried coffee*) ou pulverização (*spray dried coffee*) que pode posteriormente ser aglomerado com adição de água (ALVES, 1998).

A qualidade do café, atributo que tem o maior peso na determinação do preço e comercialização, pode ser definida como um conjunto de características físicas, químicas, sensoriais e de segurança que atendem os gostos dos diversos tipos de consumidores (BRASIL, 2003; SIMÕES et al., 2008).

O controle de qualidade nas indústrias visa garantir a segurança alimentar e nele estão presentes alguns parâmetros. Um dos mais importantes são os de controle microbiológico, pois fornece informações quanto às condições de processamento, armazenamento e distribuição para o cliente, sua vida útil e risco à saúde da população (FRANCO, LANDGRAF, 2003).

Micro-organismos quando presentes em alimentos podem ocasionar desde um simples mal-estar até a morte, assim sendo, são chamados de “patogênicos” afetando homens e animais. Sendo que, os micro-organismos podem chegar até alimento por meio de práticas precárias de higiene durante a produção, armazenamento, distribuição e/ou manuseio (FRANCO, LANDGRAF, 2003).

A contaminação microbiológica no processo de café costuma acontecer após a torrefação do grão de café, pois nessa etapa altas temperaturas são empregadas (em torno de 300 °C), o que impossibilita a presença da maioria dos contaminantes microbiológicos. Devido as inúmeras outras possibilidades de contaminações diretas

ou indiretas é que se faz necessário o controle minucioso da presença de determinados micro-organismos, como por exemplo a *Salmonella* e o bolor que pode também estar presente em amostras de café (CAMILETTI, 2018).

A presença de bolor, fungo aeróbico com hifas que auxiliam na fixação, pode produzir micotoxinas, um metabólico tóxico que se prolifera em grãos em determinadas condições físicas e são prejudiciais a homens e animais, causando a micotoxicose. Os gêneros de bolores toxigênicos mais importantes são *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* (SILVA et al., 2010). O gênero de fungo *Aspergillus* é amplamente distribuído na natureza e inclui mais de 200 espécies. Sua prevalência, facilidade de ser cultivado em meio de cultura e importância econômica o levou a ser um dos gêneros de fungos mais estudados (CAMILETTI, 2018). O *Aspergillus* geralmente cresce mais rápido do que o *Penicillium*, mas leva mais tempo para produzir esporos, e predomina em zonas temperadas, enquanto *Aspergillus* em zonas tropicais (PITT e HOCKING, 2009).

A atenção especial dada a estes metabólitos se deu a partir de 1960, quando houve um surto de aflatoxicose na Europa. A micotoxina mais conhecida é a ocratoxina (OTA), que tem recomendação (CE 22/12/1998, nº 26), de nível máximo 3,0 ppb em café torrado e moído e 8,0 ppb para o café verde. Pode causar lesões renais e hepáticas em animais, acúmulo de gordura no fígado e alteração nas mitocôndrias. No Brasil, a detecção de micotoxinas, como a ocratoxina A, mesmo em traços é rara (BATISTA, 2000). Medidas preventivas da ocorrência de micotoxinas têm sido recomendadas através da adoção de Boas Práticas Agrícolas, Boas Práticas de Fabricação e Boas Práticas de Higiene, estabelecidas com base no Programa de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC). O controle de bolor é feito através do plaqueamento de superfície e contagem de colônias presentes.

Já a *Salmonella* é uma bactéria do tipo Enterobactéria presente normalmente no intestino animal e humano e é eliminada através das fezes. A infecção pode causar doenças gastrointestinais denominadas Salmonelose, e os sintomas aparecem de 12 a 72 h após o contato com a bactéria (FOOD&DRUGS, 2022). Complicações com risco de vida também podem ocorrer se a infecção se espalhar além do intestino, sua detecção é feita por ensaio enzimático fluorescente ligado à enzima (ELFA).

Sendo assim, o presente trabalho visa analisar e comparar a presença de *Salmonella* e quantificar as colônias de bolor em seis amostras de café torrado e moído e em três amostras de café solúvel.

## 2 JUSTIFICATIVA

Dados da Organização Internacional do Café (IOC) apontam que o consumo mundial de café ultrapassa 150 milhões de sacas de 60 Kg por ano e registra crescimento anual de 2,5%. A projeção referente a produção total para o ano de 2020/21 é 8,6% superior à média dos últimos 10 anos cafeeiros. Segundo dados da última pesquisa realizada pela Euromonitor, em 2019, o Brasil possui o maior mercado mundial em volume total de café como bebida quente.

Há um consenso de que o problema mais importante, do ponto de vista da saúde pública, é a ingestão de alimentos contaminados por micro-organismos patogênicos (FRANCO, LANDGRAF, 2003).

Por conta disso, os parâmetros microbiológicos são estabelecidos por leis, o seu não atendimento constitui em uma violação e medidas legais devem ser tomadas pelos órgãos competentes. Esses parâmetros são estabelecidos em níveis municipais, estaduais, federais e internacionais, seu cumprimento é uma condição de acordo com futuros compradores (FRANCO, LANDGRAF, 2003).

Os Centros de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos estimam que aproximadamente 450 pessoas morrem anualmente de salmonelose aguda nos Estados Unidos. A infecção pode ocasionar diarreia, febre e cólicas abdominais, os casos mais graves de salmonelose podem incluir febre alta, dores de cabeça, letargia, erupção na pele, sangue na urina ou nas fezes e, em alguns casos, pode ser fatal (FOOD&DRUGS, 2022).

Já o controle da quantidade de colônias de bolor se faz necessário devido a possibilidade de diversos fungos produzirem toxinas. As principais micotoxinas de ocorrência em grãos e subprodutos utilizados na nutrição animal no Brasil são: aflatoxinas, fumonisinas, zearalenona, tricotecenos e ocratoxina A (LAM, 2022).

As aflatoxinas, micotoxinas produzidas pelo fungo *Aspergillus*, se ingeridas em altas proporções, frequência e dependendo da idade, podem estar relacionadas a problemas como cirrose, necrose do fígado, encefalopatia e aumento da susceptibilidade à hepatite B. As fumonisinas, micotoxinas produzidas pelos fungos tóxicos dos gêneros *Fusarium* e *Alternaria*, ocorrem em diversos cereais.

A zearalenona, metabólito produzido por várias espécies de fungos do gênero *Fusarium*, incluindo *F. culmorum*, *F. graminearum* e *F. crookwellense* é contaminante natural de diversos cereais, como trigo, cevada, arroz e particularmente o milho.

Os tricotecenos, produzidos por fungos dos gêneros *Fusarium*, *Cephalosporium*, *Myrothecium*, *Stachybotrys* e *Trichoderma*, contaminam grãos se em alta umidade, a ingestão em determinadas quantidades pode ocasionar recusa de alimentos, vômito, diminuição no ganho de peso, diarreia com sangue, dermatite, salivação, hemorragias, abortos e distúrbios do sistema nervoso. Já a ocratoxina, micotoxina produzida por espécies de fungos *Aspergillus* e *Penicillium* mais tóxica, por isso a mais relevante, apresenta propriedades carcinogênicas, nefrotóxicas, teratogênicas, imunotóxicas e neurotóxicas.

No leste europeu, suspeita-se que a ocratoxina é um dos fatores para a causa do câncer do trato urinário e danos aos rins. A ocratoxina A foi reclassificada pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) em 1993, como um possível carcinógeno para humanos (classe 2B) (IAMANKA; OLIVEIRA, TANIWAKI, 2010).

Outras micotoxinas, mesmo que ocorram em menor frequência, provocam importantes perdas econômicas quando contaminam os alimentos. Sendo algumas classificadas como termo resistentes. Por esses motivos, a possibilidade de toxinas no grão de café e o alto consumo do mesmo, faz com seja de extrema importância o seu controle e acompanhamento.

No Brasil é ainda mais necessário esse controle, pois o clima favorece a proliferação dos fungos produtores de aflatoxinas e devido ao fato do país ser o segundo maior consumidor da bebida do mundo, atrás apenas dos EUA, que consome anualmente 24 milhões de sacas. No ano passado, os brasileiros demandaram 20,5 milhões de sacas, uma ligeira alta em relação ao ano anterior, que computou 20,3 milhões de sacas (CECAFE, 2022).

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 CAFÉ

##### 3.1.1 Histórico

A história do café começa por volta do ano 800 na Abissínia, atual Etiópia. Segundo a lenda Kaldi, um pastor de ovelhas observou que seu rebanho ficava disposto e cheio de energia após comer um determinado fruto avermelhado. Com a ajuda de um monge testaram algumas infusões e obtiveram uma bebida final, provaram e perceberam que de fato o fruto garantia maior foco e energia para as atividades e estudos. Em pouco tempo, a notícia da bebida excitante se espalhou, gerando uma demanda pelo fruto. A disseminação do café pelos cultos religiosos na Arábia fez com que o fruto recebesse um nome, qawha, que significa vinho em árabe (CECAFE).

A chegada do café no Brasil atribui-se ao sargento-mor Franciso de Mello Palheta no ano de 1727. Francisco trouxe para Belém do Pará, uma muda de café de uma viagem feito para a Guiana Francesa. O cultivo se espalhou rapidamente devido as condições climáticas favoráveis. O ponto de partida foi o Rio de Janeiro, estendendo posteriormente para São Paulo, Minas Gerais e Paraná (CECAFE, 2022).

A exportação brasileira do café começou a crescer a partir de 1816. Na década de 1830-1840, o produto assumiu a liderança das exportações do país, com mais de 40% do total; o Brasil tornou-se, em 1840, o maior produtor mundial de café. Na década 1870-1880, o café passou a representar até 56% do valor das exportações. Começou então o período áureo do chamado ciclo do café que durou até 1930; no final do séc. XIX, o café representava 65% do valor das exportações do país, chegando a 70% na década de 1920 (ALMEIDA et al., 2018).

Foi na Primeira Guerra Mundial que o café solúvel começou a ser fabricado e utilizado. O Exército Americano comprou todo o café disponível, aumentando a produção em trinta vezes, de 1.400 para 43.000 lbs por dia. Em 1930, a Nestle começou a comercializar o café solúvel. No Brasil, o café solúvel chegou em 1953, a partir da década de 1960 foram feitos esforços para atrair e instalar fábricas de café solúvel. Desde então, o Brasil é líder mundial de produção e exportação de café solúvel (ABICS, 2022).

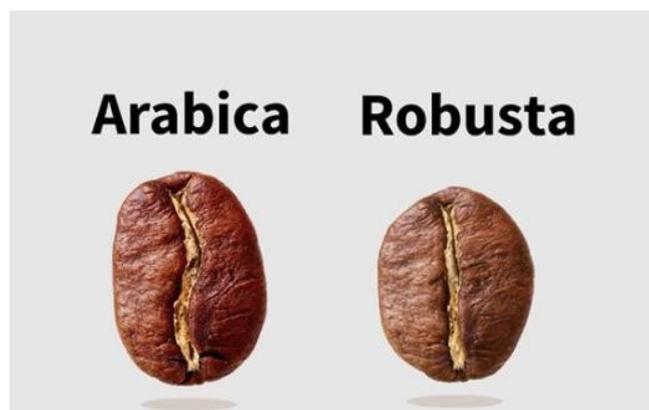
### 3.1.2 Espécies cultivadas

O café pertence à família Rubiace, gênero Coffea, no qual encontram-se mais de 90 espécies que se adaptam bem em regiões de clima tropical e altitudes entre 600 e 1200 m (BELTIZ; GROSCH; SCHIEBERLE, 2009).

O Brasil é o maior produtor e exportador de café do mundo e cultiva duas espécies de café: Coffea Arabica e Coffea Canephora (CECAFE, 2022). O primeiro, o café arábica, é demandado em blends (mistura de qualidades diferentes de café) de alta qualidade, é uma planta mais delicada, que se desenvolve em altas altitudes, é plantada entre os trópicos de Câncer e Capricórnio entre 18 e 21 °C. O segundo é o café robusta, também conhecido como conilon, no Brasil é muito utilizado na indústria de café solúvel (Figura 1) (ROSSETTI, 2007).

O café robusta tem um trato mais rude e pode ser cultivado ao nível do mar. Não apresenta sabores variados e refinados como o arábica, dizendo-se que tem um “sabor típico e único”. Sua acidez é mais baixa e, por ter mais sólidos solúveis, é utilizado intensamente nos cafés solúveis. Seu teor de cafeína é maior do que nos cafés arábicas (CAFÉ DAMASCO, 2008).

**Figura 1.** Café arábica (lado esquerdo) e robusta (lado direito) cru.



Fonte: HF Urbanismo (2017).

### 3.1.3 Produção

Em 2020, o Brasil foi responsável pela colheita de 63,06 milhões de sacas, e obteve um recorde de exportações de 36,80 milhões de sacas – crescimento de 1,3% em comparação ao ano anterior (CONAB, 2022). A produção de café arábica foi de 32,05 milhões de sacas e a de café conilon totalizou de 11,19 milhões de sacas. A produtividade média por hectare é de 22,49 sacas (CECAFE, 2022).

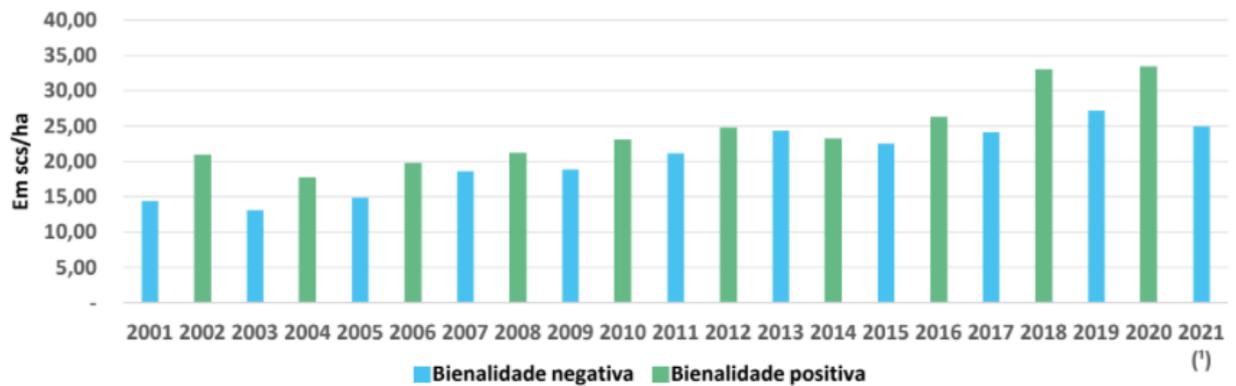
Segundo o levantamento da safra 2021 de café divulgado pela Conab em 25 de maio de 2021, estima que há uma expectativa de 49 milhões de sacas de café beneficiado, uma redução de 22,6% comparado à safra passada.

Quanto a produção regional, o estado de Minas Gerais possui estimativa de 23,3 milhões de sacas, redução de 32,6% em relação à safra anterior. No Espírito Santo, estima-se a produção de 13,63 milhões de sacas. Em São Paulo e na Bahia, cerca de 4 milhões de sacas de café. Enquanto o Paraná, 876 mil sacas de café beneficiado, seguido do Rio de Janeiro com 235 mil sacas, Goiás com 212 mil e sacas e Mato Grosso, com 199 mil sacas (CONAB, 2022).

O sistema cafeeiro é baseado em um ciclo bienal, ou seja, há alternância de um ano com grande produção seguido de outro menos intenso. Essa característica natural permite que a planta se recupere para produzir melhor na safra subsequente. A safra do ano passado foi marcada pela bienalidade negativa, especialmente o café arábica. Outro ponto que justifica a redução na produção deste ano se baseia nas condições climáticas que contou com estiagem em períodos importantes para o desenvolvimento do café (CECAFE, 2022). O gráfico da Figura 2 mostra como essa bienalidade do café impactou em sua produção anual.

A partir da década de 1960 quando as fábricas de café solúvel foram instaladas e iniciou suas atividades, o Brasil é líder mundial de produção e exportação (ABICS, 2022).

**Figura 2.** Gráfico que aponta a produtividade de café total (arábica e conilon) no Brasil em anos de bienalidade positiva e negativa.



Fonte: CECAFE, 2021.

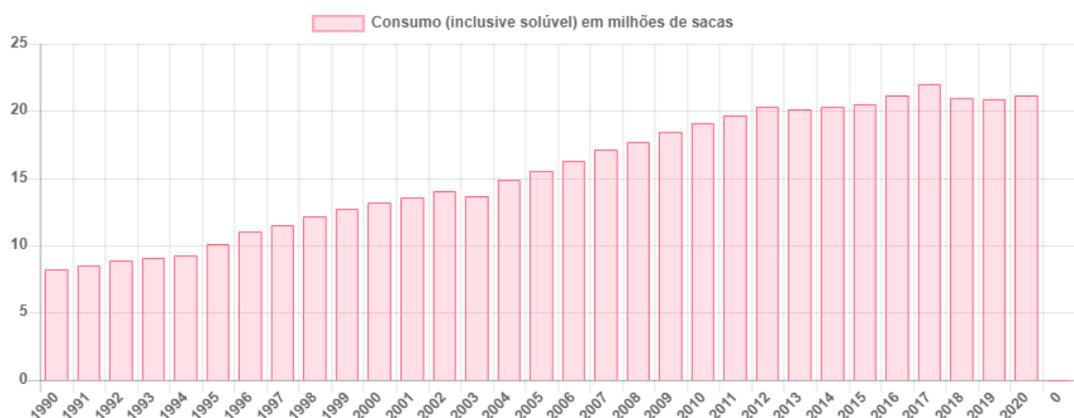
### 3.1.4 Consumo

No final do século XVIII, o café era considerado um produto para o consumo. Nos anos de 1840 a 1850, o produto avançou e conquistou o mercado mundial, tornando-se o principal produto de comercialização no Brasil (TAUNAY, 1939).

A cafeicultura no Brasil beneficiou-se da estrutura escravista do país, sendo incorporada ao sistema *plantation*, caracterizado basicamente pela monocultura voltada para a exportação, a mão de obra escrava e o cultivo em grandes latifúndios (PINTO, 2018).

O café está presente na mesa dos brasileiros e nas indústrias nacionais. A procura por café em 2020 teve aumento de 1,34% em relação ao mesmo período do ano anterior, como ilustrado na Figura 3 (ABIC,2022).

**Figura 3.** Evolução do consumo interno de café no Brasil em 2020.



Fonte: ABIC, 2021.

O Brasil manteve-se como segundo maior consumidor de café do mundo. Quando analisado o consumo per capita, observa-se que, em 2020, ele foi de 5,99 kg por ano de café cru e 4,79 kg por ano de café torrado (ABIC, 2020), como ilustrado na Tabela 1.

**Tabela 1.** Consumo interno de café em 2020.

<b>Categoria</b>	<b>Novembro de 2018 a Outubro de 2019 (scs/ ano)</b>	<b>Novembro de 2019 a Outubro de 2020 (scs/ ano)</b>	<b>Crescimento (%)</b>
<b>Total geral de café torrado e moído</b>	19.987.260	20.238.460	1,26
<b>Total nacional de consumo de café (scs/ano)</b>	20.901.260	21.181.530	1,34
<b>Consumo per-capita: café em grão cru (kg/hab.ano)</b>	5,95	5,99	0,7%
<b>Consumo per-capita: café torrado e moído (kg/hab.ano)</b>	4,76	4,79	0,6%

Fonte: ABIC, 2021.

### 3.2 Processamento industrial do café solúvel e seus produtos

O processo do café solúvel ou café instantâneo possui etapas que envolvem algumas tecnologias e padrões de qualidade que definem o preço do produto e seu tipo, como ilustrado na Figura 4. A matéria prima é o grão do café, das variedades Arábica e Robusta/Conilon e a fabricação resulta da desidratação do extrato aquoso de café torrado. Em sua composição há apenas café e água. Para ser comercializado em território nacional, o solúvel não pode conter nenhum aditivo ou conservante (ABICS, 2022).

As indústrias de café compram a sua matéria prima considerando o número de

defeitos e a qualidade da bebida. Se necessário realiza-se a mistura ou “*blend*” para obter uma padronização e características adequadas para o produto final, como aroma e sabor (RELVAS; PINTO; MONTEIRO, 1997).

O café é adquirido em sacas de 60 kg e essa etapa é muito importante, pois os sabores e aromas variam muito entre as qualidades de café. No Brasil há diversos produtores de café em diferentes locais, aproximadamente dois mil municípios, o que oferece uma grande gama de opções, qualidades e preços. Por isso é necessário conhecer o tipo do café cru que atenda as especificações do cliente de café solúvel (NEVES, 2009).

Após essa seleção dos grãos e a retirada de impureza dos mesmos, ocorre a torrefação, ilustrado na Figura 4. Os grãos do café cru são submetidos a uma temperatura controlada entre 180 e 250 °C, de oito a quinze minutos, o tempo também deve ser controlado para que não inicie o processo de carbonização.

**Figura 4.** Torra do café.



Fonte: HF Urbanismo (2017).

Esta etapa é a que garante a retenção do aroma e as intensidades de torras adequada para cada qualidade de café. Nela ocorrem reações que alteram o grão fisicamente e quimicamente, por exemplo, a cor que vai de verde para marrom (VIGNOLI, 2009), como mostrado na Figura 5.

**Figura 5.** Café verde cru e suas transformações durante a torra.



Fonte: HF Urbanismo (2017).

A etapa seguinte é a moagem dos grãos torrados. Em moinhos, o café é parcialmente fracionado, buscando-se evitar a perda do sabor através da mínima geração de calor no processo e o acúmulo de pós finos, pois podem acarretar em problemas na próxima etapa do processo. O café torrado e granulado vai então para a chamada coluna de extração pressurizadas aonde é obtido o extrato do café, um líquido escuro com aparência e textura de xarope que contém sólidos solúveis em água. Essa etapa gera um resíduo, a chamada borra, algumas indústrias utilizam como combustível nas caldeiras que geram vapor necessário para o processo (NEVES, 2009).

Após a extração, há a concentração do extrato por evaporação ou centrifugação, sendo que parte da água é retirada. Para a produção do café solúvel, este extrato deve ser seco. Podendo seguir por duas etapas de secagem, a liofilização para a produção do café liofilizado ou "*freeze dried coffee*", ou pela secagem por aspersão para o café solúvel em pó ou "*spray dried coffee*", que pode se tornar o café solúvel aglomerado se adicionado vapor de água (Figura 6).

**Figura 6.** Aspectos dos diferentes tipos de cafés solúveis.



Fonte: Cia Cacique de Café Solúvel, 2010.

A produção industrial de café solúvel está sumarizada no fluxograma da Figura 7.

**Figura 7.** Resumo das etapas de produção do café solúvel.

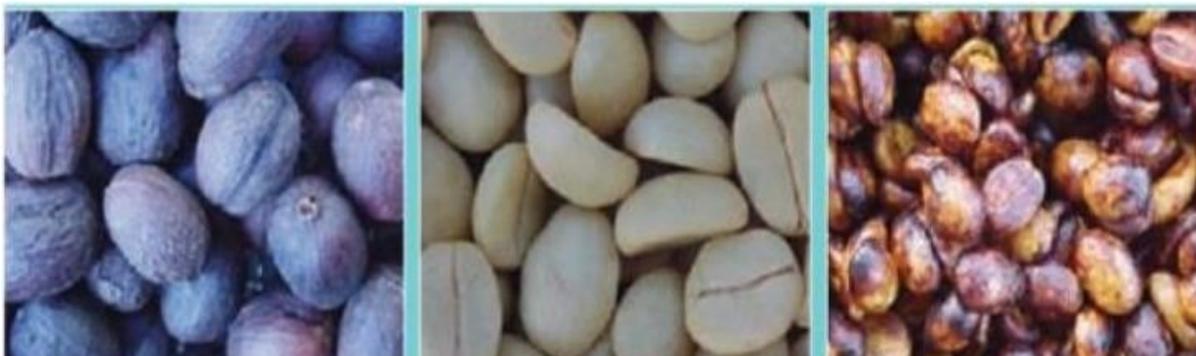


### 3.3 Processo produtivo do café torrado e moído

O processo do café torrado e moído conta com as seguintes etapas: recepção e seleção dos grãos, beneficiamento dos grãos, torrefação, moagem e embalagem/rotulagem.

A primeira etapa consiste na limpeza dos grãos pós colheita por via seca ou por via úmida, lavagem, separação e secagem. A separação da polpa do fruto consiste na produção de café natural, café cereja descascado ou despulpado. A secagem por sua vez pode ser feita naturalmente em terreiro ou artificialmente. (BASSETO; ESPIRITO SANTO, 2018). Na indústria, o café pode chegar de três diferentes maneiras, como pode ser analisado na Figura 8, e em seguida, é realizado o seu beneficiamento.

**Figura 8.** Café natural, café despulpado e café cereja descascado.



Fonte: SALVA, 2007.

De acordo com o Manual de Segurança e Qualidade para a Cultura do Café (2004) da Embrapa, o beneficiamento é uma operação pós-colheita que transforma, pela eliminação das cascas e separação dos grãos, o fruto seco (coco ou pergaminho) em grãos de café que passam a ter a denominação de café beneficiado ou café verde. A operação de beneficiamento deve ser realizada o mais próximo possível da época de comercialização, para que o produto possa manter suas características originais (EMBRAPA, 2004).

A limpeza visa eliminar impurezas como folhas, gravetos, torrões, pedras e metais. Para tanto, emprega-se máquinas ventiladoras por peneira (MVP) e os catadores de pedras. No descasque do café em coco ou em pergaminho têm-se os grãos de café cru e os subprodutos casca ou pergaminho, que são removidos por meio de um fluxo de ar aplicado por um ventilador centrífugo. Em sequência, procede-

se a seleção dos grãos empregando equipamentos, como separador circular oscilante (sururuca), coluna de ventilação, mesa densimétrica (mesa de gravidade) e selecionadora eletrônica por cores. O emprego deles em conjunto aprimora o processo de seleção. Segundo Gonzales (2004) primeiramente o café verde é colocado no elevador de grãos crus, o qual transportará a matéria-prima ao torrador. No torrador, o café passa pelo tratamento térmico a uma temperatura de 200° C, num tempo de torra de no máximo 25 minutos. O café após a torra passará por um sistema de resfriamento, um processo sucessivo e rápido que visa condensar no interior do grão as substâncias aromáticas, responsável pelo aroma e sabor do café. Depois dos grãos torrados e resfriados são depositados por sistema de elevador pneumático no silo para grãos torrados com capacidade para 1350 kg (GONZALES, 2004).

Segundo a ABIC (2010) para cada tipo de café há um grau de torra diferente e são classificados como claro, médio e escuro. O grau de torra claro possui acidez acentuada, suavidade do aroma e sabor e é menos amargo, ideal para máquinas de café expresso. O café com torrefação média tem como característica aroma e sabor acentuados, sendo ideal para coador de pano ou filtro de papel. Já o grau de torra escuro diminui a acidez, acentua o sabor amargo e deixa a bebida mais escura.

A moagem é o processo na qual os grãos secos são triturados até que se tornem um pó fino. Os grãos devem ser conservados inteiros e frios antes da moagem (MELITTA, 2008). Há diferentes graus de moagem do café, conforme a ABIC (2010): pulverizado, fino, médio e grosso. O tempo de preparação da bebida é influenciado pelo grau de moagem. O grau pulverizado é o mais fino e ideal para o preparo do café árabe, o qual o pó não é coado, o fino é utilizado em filtração (filtros de papel, coador de pano), do médio é feito o café expresso e a moagem grossa é indicada para o café preparado em cafeteiras italianas.

E por fim, a embalagem e a rotulagem do café moído, que são feitas em uma máquina empacotadeira automática. Para ser embalado a vácuo, e comprimido por uma pré-selagem o produto é encaminhado para uma câmara de vácuo que tem a função de retirar o ar da embalagem. Após isso ele passa por uma marcação de validade e em seguida vai para o encaixotamento.

### 3.4 Controle de Qualidade

O controle de qualidade presente nas indústrias diz respeito a um conjunto de atividades que são realizadas por pessoas treinadas e capacitadas para assegurar que o produto atende as especificações determinadas pelo cliente, indústria e leis vigentes. Envolve decisões relacionadas a qualidade do produto, o que interfere diretamente na produção. O controle de qualidade na indústria de café solúvel conta com os laboratórios: físico-químico, especiais, sensorial, microbiológico e de materiais de embalagem (FRANCO, LANDGRAF, 2003).

Devido ao grande alcance do café solúvel no Brasil e no mundo, sua produção é baseada no atendimento de algumas normas e certificações. As indústrias brasileiras de café solúvel, associadas da ABICS, detêm variadas certificações de qualidade e sustentabilidade, de processos e de produtos, concedidas pelas principais certificadoras mundiais e que atendem às exigências de mercados e clientes em todos os continentes (Figura 9) (ABICS, 2021).

Dentre elas estão: a ISO 9001/ ISO 140001/ ISO 180001, ISO 22000/ ISO 17025, FAIR TRADE, UTZ Certified, 4C, RainForeste Alliance, HALAL, Belarus Certificate, Rosted, British Retail Consortium, Jas Organic, USDA Organic.

**Figura 9.** Certificações do mercado de café solúvel.



Fonte: ABICS, 2021.

O controle microbiológico é necessário, pois a presença de determinados micro-organismos pode expor o consumidor a diferentes riscos relacionados a saúde. Ele fornece informações sobre as condições de processamento, armazenamento e distribuição que aquele produto está exposto durante sua produção e destinação (FRANCO, LANDGRAF, 2003).

O risco depende do tipo de micro-organismo presente e sua quantidade. Alguns apenas deterioram o produto (categorias 1, 2, e 3), outros são indicadores de possíveis presença de patógenos (categorias 4, 5 e 6), outros são patogênicos, mas causam doenças leves e são de difusão restrita (categorias 7, 8 e 9), outros são patogênicos e causam doenças leves, mas de difusão extensa (categorias 10, 11 e 12), outros são patogênicos e podem causar doenças graves (categorias 13, 14 e 15). O grau de risco é proporcional as chances de os micro-organismos se multiplicarem, ou seja, depende das condições de armazenamento (FRANCO; LANDGRAF, 2003). A Figura 10 representa um exemplo de más condições de armazenamento.

**Figura 10.** Grãos estocados em sacas a céu aberto.



Fonte: AGROADVISOR, 2017.

### 3.5. Bolores e Leveduras

Os bolores e leveduras constituem um grande número de micro-organismos, a maioria originárias do solo ou ar. Bolores são extremamente versáteis e algumas espécies são capazes de assimilar qualquer fonte de carbono derivada de alimentos (SILVA, N. *et al.* 2017). As leveduras são mais exigentes que os bolores, possuem limitação da gama de alimentos suscetíveis a deterioração, pois muitas são incapazes de assimilar nitrato e carboidratos complexos, algumas não conseguem utilizar a sacarose como única fonte de carbono (SILVA, N. *et al.* 2017).

São resistentes a condições mais exigentes, como pH ácido e atividade de água baixa. A atividade de água diz respeito a água do alimento que está disponível para interagir com o micro-organismo, ou seja, não está combinada quimicamente com outras substâncias e nem adsorvida por alguma macromolécula. Está presente nos espaços intergranulares e entre os poros do material. É eliminada com facilidade e atua como meio de dispersão e nutriente para o crescimento de micro-organismos ou reações químico-enzimáticas (FOOD SAFETY BRAZIL, 2016).

Os fungos não sofrem alteração se apresentados a variações de pH entre 3,0 a 8,0, vários bolores crescem abaixo de pH 2,0, diversas leveduras abaixo de pH 1,5. O pH ideal para o seu crescimento seria em torno de 5,0, quando se afasta disso, a velocidade de crescimento diminui e piora se a atividade de água for baixa (SILVA, N. et al. 2017).

A temperatura de crescimento ideal é entre 25 a 28 °C, porém seu crescimento não é incomum abaixo de pH 5, já abaixo de pH 10 é microbiologicamente estável. Algumas espécies de bolores, como *Byssochlamys*, *Neosartoria*, *Talaromyces*, *Penicillium*, *Hamigera* e *Monascus* são resistentes a altas temperaturas e estão associadas a deterioração de frutas e derivados processados termicamente. Bolores termo resistentes estão amplamente distribuídos no solo (SILVA, N. et al. 2017).

Bolores apresentam estrutura filamentosa, as chamadas hifas, que em conjunto formam o micélio. As hifas podem ser septadas, divididas em células, e se intercomunicarem através dos poros e não septadas, com núcleos dispersos ao longo da hifa. O micélio promove a fixação e a reprodução. Podem se reproduzir sexualmente (fungos perfeitos) ou assexualmente (fungos imperfeitos), ou ainda por ambas formas simultaneamente. São os responsáveis pelo aspecto característicos das colônias que formam, como ilustrado na Figura 11 (FRANCO, LANDGRAF, 2003).

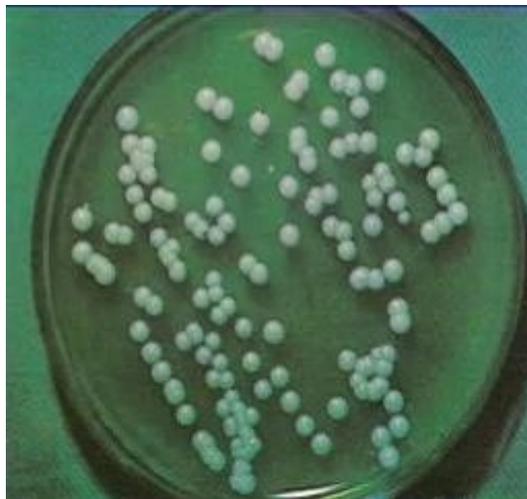
**Figura 11.** Placa de petri com colônias de bolor.



Fonte: Agroeno, 2021.

As leveduras são predominantemente unicelulares, podem ser esféricas, ovóides, cilíndricas ou triangulares, algumas são alongadas e com filamentos semelhantes às hifas dos bolores. A reprodução de leveduras de interesse em alimentos é dividida entre: leveduras verdadeiras que se reproduzem de forma sexuada, havendo formação de ascósporos e leveduras falsas, que não produzem ascósporos e se reproduzem de forma assexuada por brotamento ou fissão celular (FRANCO; LANDGRAF, 2003). Formam colônias bem determinadas visualmente, como ilustrado na Figura 12.

**Figura 12.** Placa de petri com colônias de levedura.



Fonte: SlideShare, 2011.

Para quantificar bolores e leveduras é feita a contagem em placas determinando as colônias formadas. O método mais indicado é plaqueamento em superfície que aumenta a exposição ao oxigênio e evita o stress causado pelo meio de cultura quente (SILVA, N. et al. 2017). A Figura 13 ilustra um alimento (milho) quando infectado por algumas micotoxinas geradas por bolores e leveduras.

**Figura 13.** Milho infectado por Fumonisina, Zearalenona, Ocratoxina e Tricotezenos.

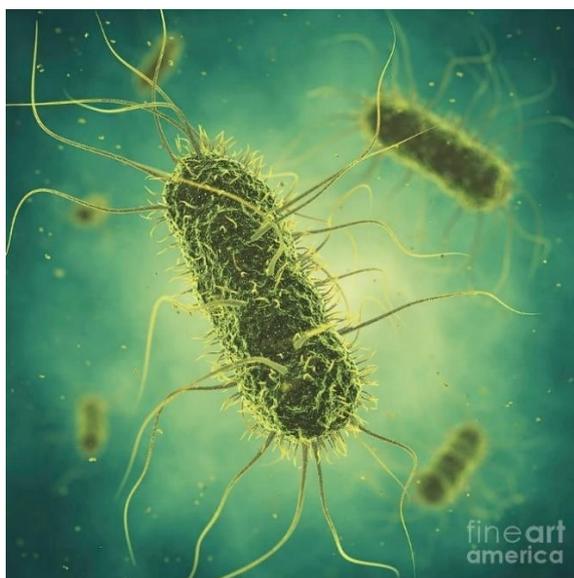


Fonte: LAMIC, 2021.

### 3.6 *Salmonella*

A *Salmonella* é um gênero da família Enterobacteriaceae, possui estrutura de bastonete. São anaeróbicos facultativos que produzem gás a partir de glicose e são capazes de utilizar o citrato com única fonte de carbono. Como ilustrado na Figura 14, a maioria é móvel, através de flagelos peritríquios (FRANCO; LANDGRAF, 2003).

**Figura 14.** Ilustração colorida da bactéria *Salmonella*.



Fonte: PÍXEIS, 2019.

De acordo com a Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde (MS/SVS, 2015) entre 2000 e 2015 10.666 surtos de doenças transmitidas por alimentos no país foram notificados, envolvendo 209.240 doentes. Dos surtos com etiologia identificados (41,5%) 37% foram devidos *Salmonella*, envolvendo 30.130 pacientes (SILVA, N. et al. 2017).

A classificação da *Salmonella* mais utilizada é a relacionada com a sorotipagem. A divisão foi feita por White-Kauffmann-Le Minor baseado nas diferenças em algumas estruturas superficiais da célula, que são antigênicas (SILVA, N. et al. 2017).

A maioria das infecções com *Salmonella* ocorrem ao ingerir alimentos contaminados por fezes. Alimentos comumente infectados são por exemplo, carnes cruas, aves, frutos do mar, ovos crus, frutas e vegetais. Alguns animais de estimação, principalmente pássaros e répteis, podem ser portadores da bactéria *Salmonella* (MAYO CLINIC, 2022)

O pH ideal para o crescimento é em torno de 7,0, valores superiores a 9,0 e inferiores a 4,0 são bactericidas. As *Salmonellas* não suportam concentração de sal superior a 9%. A temperatura ideal seria entre 35 - 37 °C, sendo a mínima de 5 °C e a máxima de 47 °C, dependendo do sorotipo e a atividade de água mínima para o crescimento é de 0,94 (FRANCO; LANDGRAF, 2003).

Investigações epidemiológicas e ambientais desses surtos sugerem que a contaminação cruzada é fato importante na contaminação de produtos por *Salmonella*. A fim de minimizar o risco de Salmonelose pelo consumo de alimentos com baixo teor de umidade é crucial que as indústrias apliquem esforços para controlar os fatores de risco que podem levar a contaminação cruzada, que seria a transferência de bactérias de uma superfície, objeto ou lugar para outro (FOOD SOLUTION, 2022).

O método tradicional de analisar *Salmonella* com limite de detecção de unidade formadora de colônias/25g de amostra é bastante sensível, porém é muito lento e trabalhoso (SILVA, N. et al. 2017). Neste trabalho será utilizado o método do ensaio fluorescente ligado à enzima (ELFA).

### 3.7 Riscos à saúde

A análise destes micro-organismos se faz necessária devido as implicações dos mesmos à saúde humana. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o gênero *Salmonella* é uma das principais causas de doenças transmitidas por alimentos em todo o mundo (CARDOSO; TESSARI, 2008).

A *Salmonella* spp. é um dos micro-organismos mais amplamente distribuídos na natureza, sendo o homem e os animais seus principais reservatórios naturais, com ocorrência de sorotipos regionais, reconhecidos como salmoneloses, e considerado como um dos principais agentes envolvidos em surtos de origem alimentar em países desenvolvidos. O aumento da incidência da salmonelose provocada por alimentos contaminados demonstra que, na atualidade, apesar dos avanços tecnológicos alcançados, este problema ainda ocorre mundialmente (CARDOSO; TESSARI, 2008).

A *Salmonella* pode causar dois tipos de doença, dependendo do sorotipo: salmonelose não tifoide e febre tifoide (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022). Os sintomas da salmonelose não tifoide podem ser bastante desagradáveis, mas a doença geralmente é autolimitada entre pessoas saudáveis (embora possa levar à morte em alguns casos). A febre tifoide é mais grave e tem uma taxa de mortalidade maior que a salmonelose não tifoide. A maioria dos casos de salmonelose não tifoide apresenta sintomas típicos de uma Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA), como vômito, dores abdominais, febre e diarreia, que geralmente duram alguns dias e diminuem em uma semana (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022).

As aflatoxinas, micotoxinas produzidas pelo fungo *Aspergillus*, se ingeridas em altas proporções, frequência e dependendo da idade, podem estar relacionadas a problemas como cirrose, necrose do fígado, encefalopatia e aumento da susceptibilidade à hepatite B. As fumonisinas, micotoxinas produzidas pelos fungos toxígenos dos gêneros *Fusarium* e *Alternaria*, ocorrem em diversos cereais (LAM, 2022).

Os tricotecenos, produzidos por fungos dos gêneros *Fusarium*, *Cephalosporium*, *Myrothecium*, *Stachybotrys* e *Trichoderma*, contaminam grãos se em alta umidade, a ingestão em determinadas quantidades pode ocasionar recusa de alimentos, vômito, diminuição no ganho de peso, diarreia com sangue, dermatite, salivação, hemorragias, abortos e distúrbios do sistema nervoso. Já a ocratoxina, micotoxina produzida por espécies de fungos *Aspergillus* e *Penicillium*, é a mais tóxica por isso a

mais relevante, apresenta propriedades carcinogênicas, nefrotóxicas, teratogênicas, imunotóxicas e neurotóxicas (LAM, 2021).

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo geral

Avaliar as características microbiológicas de nove amostras de café, dentre elas: três amostras de cafés solúveis comerciais, três de cafés torrados e moídos comerciais e três de cafés torrados e moídos não comerciais.

### 4.2 Objetivos específicos

- Analisar a quantidade colônias de bolor e levedura por meio do método de plaqueamento por superfície;
- Analisar a presença de *Salmonella* spp. pela espectroscopia de fluorescência;
- Analisar a segurança microbiológica das amostras analisadas.

## 5. METODOLOGIA

### 5.1 Aquisição de amostras

A primeira etapa para as análises feitas neste trabalho consistiu em definir e adquirir as amostras de café e identificá-las com um código, para posterior análise microbiológica. Para isso, foram adquiridas 09 amostras, sendo elas: uma amostra de café solúvel em pó (*spray dried coffee*), uma amostra de café solúvel aglomerado, uma amostra de café solúvel liofilizado (*freeze dried coffee*), três amostras de café torrado comercial e três amostras de café torrado não comercial. A identificação criada para cada uma dessas amostras está apresentada na Tabela 2, abaixo.

**Tabela 2.** Identificação de amostras de cafés.

Identificação	Amostras
A	Café solúvel em pó (Londrina-PR)
B	Café solúvel aglomerado (Londrina-PR)
C	Café solúvel liofilizado (Londrina-PR)
D	Café torrado e moído comercial 1 (Londrina-PR)
E	Café torrado e moído comercial 2 (Londrina-PR)
F	Café torrado e moído comercial 3 (Londrina-PR)
G	Café torrado e moído de feira (Londrina-PR)
H	Café torrado e moído de mercado de fabricação própria (Itaí-SP)
I	Café torrado e moído de vendedor independente (Londrina-PR)

Fonte: Própria autora.

## 5.2 Análise de bolor e levedura

Essa análise teve como objetivo quantificar as colônias de bolores e leveduras presentes nas amostras de café por meio de um meio de cultura específico, o Agar Dichloran Glicerol 18 – DG18.

De natureza sintética, o DG18 é recomendado para a contagem de leveduras e crescimento de fungos em produtos com baixa quantidade de atividade de água ( $a_w < 0,95$ ), sua consistência é sólida, pois possui o Agar (polissacarídeo seco extraído de algas vermelhas Rhodophyceae), sua função é de enriquecimento, permite o crescimento de micro-organismos exigentes, de crescimento lento, mas não inibem o crescimento de outro, pelo método do plaqueamento em superfície.

### 5.2.1 Preparo de soluções e de meio de cultura

Como meio de cultura, foi utilizado o Agar Dichloran Glicerol 18. – DG18. Para isso foram dissolvidos 31,6 g do meio DG18 em 1000 mL de água destilada. Esse processo ocorreu no interior da Cabine de Segurança Biológica (Marca: Veco - Modelo: Biosafe A2 – Figura 15) com exaustor ligado (com uso de jaleco limpo e luvas).

Em seguida o frasco foi levado para chapa de aquecimento (marca Fistom - modelo 502/2 – Figura 16) para a dissolução total. Em seguida, foram adicionados 220 g de glicerina P.A. e a mistura foi levada para autoclave (Marca - Phoenix - ModeloAV 75 Plus – Figura 17) a 121 °C por 15 minutos. Posteriormente, manteve-se em banho maria (marca Polyscience – modelo WB10 – Figura 18), até que a temperatura se estabilizasse em 45 °C.

Na sequência foram preparadas as placas para inoculação (que consistiu em verter cerca de 15 mL do meio em uma placa de petri esterilizada, aguardado o resfriamento e solidificação por completo). As placas preparadas foram estocadas sob refrigeração entre 2 e 8 °C.

Para a solução de diluição das amostras de café solúvel, foi utilizado a Solução Tampão Fosfato (PBS). Para isso, foram dissolvidas 10 pastilhas de PBS em água destilada em balão volumétrico de 1000 mL.

**Figura 15.** Cabine de Segurança Biológica – Fluxo laminar.



Fonte: BIOSAFE, 2022.

**Figura 16.** Chapa aquecedora usada para dissolução do meio de cultura DG-18.



Fonte: FISATOM, 2022.

**Figura 17.** Autoclave.



Fonte: LABDEL, 2022.

**Figura 18.** Banho-maria (banho termostático).



Fonte: GALILEO, 2022.

### 5.2.2 Preparo das amostras

A primeira etapa foi o preparo dos Erlenmeyer, no qual as amostras de café solúvel foram dissolvidas. Para isso, foi transferido 45 mL da solução de PBS e posteriormente coberta a boca do Erlenmeyer com papel alumínio. Feito isso, os 27 Erlenmeyers preparados foram autoclavados por 121 °C/15min.

Com o meio de cultura, erlenmeyer com PBS já autoclavados e as placas preparadas, foi feita a preparação da amostra para posterior inoculação na placa de petri. Este processo também ocorreu no interior da Cabine de Segurança Biológica após a verificação de todo material estar esterilizado e as superfícies limpas com etanol 70%.

A diluição da amostra de café solúvel foi de 1:10, ou seja, foram adicionadas 5 g de amostra em 45 mL de PBS e em seguida a amostra foi homogeneizada. A análise foi feita em triplicata. A identificação dos Erlenmeyers com as amostras já pesadas está indicada na Tabela 3.

**Tabela 3.** Identificação dos Erlenmeyers com as amostras pesadas em triplicata.

Identificação	Amostras
A1	Café solúvel em pó (Londrina-PR)
A2	
A3	
B1	Café solúvel aglomerado (Londrina-PR)
B2	
B3	
C1	Café solúvel liofilizado (Londrina-PR)
C2	
C3	
D1	Café torrado e moído comercial 1 (Londrina-PR)
D2	
D3	
E1	Café torrado e moído comercial 2 (Londrina-PR)
E2	
E3	
F1	Café torrado e moído comercial 3 (Londrina-PR)
F2	
F3	
G1	Café torrado e moído de feira (Londrina-PR)
G2	
G3	
H1	Café torrado e moído de mercado de fabricação própria (Itaí-SP)
H2	
H3	
I1	Café torrado e moído de vendedor independente (Londrina-PR)
I2	
I3	

Fonte: Própria autora.

### 5.2.3 Técnica de inoculação por plaqueamento em superfície

Após a identificação das placas com os códigos estabelecidos na Tabela 3, registrou-se o horário da inoculação e a sigla do meio de cultura utilizado.

Em seguida, foi pipetado 0,1 mL da solução de PBS com a amostra diluída e transferido para a placa de petri já preparada com o meio DG18, para isso a placa de petri foi aberta apenas o suficiente para inserir a ponta da pipeta (para evitar qualquer tipo de contaminação).

Para espalhar o inóculo pela superfície do meio, foi utilizada a alça de Drigalski (Figura 19). Para isso, a alça foi previamente esterilizada com etanol 70% e flambada em bico de Bunsen, após atingir temperatura ambiente foi espalhado o inóculo até que todo líquido fosse absorvido pelo meio.

Após as placas secarem por completo foram levadas para incubação em estufa de cultura a  $25 \pm 2$  °C por cinco dias.

**Figura 19.** Alça de Drigalski usada para espalhar o inóculo no meio de cultura.



Fonte: SPLABOR, 2022.

### 5.2.4 Contagem das placas

Após os cinco dias de incubação das placas foi feita a contagem das colônias formadas com o auxílio de um contador de colônias (Marca - Phoenix - Modelo CP 600 Plus – Figura 20). Cada colônia contida na placa inoculada representa 100 unidades formadoras de colônia (UFC) por grama (g) ou mililitro (mL).

**Figura 20.** Contador de colônias.



Fonte: TECNAL, 2022.

### 5.3 Análise de *Salmonella*

Essa análise tem por objetivo determinar a presença/ausência de *Salmonella* em 25 g de amostras por meio da análise qualitativa utilizando a espectroscopia de fluorescência, por meio do ensaio fluorescente ligado à enzima (ELFA).

O método VIDAS® baseia-se na tecnologia de proteínas recombinantes de fago, permitindo a detecção das estirpes móveis e imóveis de *Salmonella*. O teste permite a detecção de receptores de *Salmonella* pelo método ELFA, utiliza o cone (SPR®) que serve tanto de fase sólida como suporte de pipetagem, este está coberto por proteínas específicas de *Salmonella* e os reagentes para o teste estão prontos e pré-repartidos nos barretes seladas. Uma alíquota de 500 µL da amostra já preparada é colocada no berrete, os receptores de *Salmonella* fixam no interior do cone (SPR®), e as etapas de lavagem eliminam elementos não fixados.

Em seguida, as proteínas conjugadas com fosfatase alcalina são aspiradas e dispensadas no cone (SPR®) fixando-se aos receptores de *Salmonella*, na etapa de detecção final, o substrato (4-metil-umbeliferil fosfato) é submetido a um ciclo de aspiração e dispensação do cone (SPR®) ocorrendo a hidrólise deste substrato em um produto final fluorescente cuja medida foi realizada em 450 nm.

Os resultados são analisados e os valores são comparados com as referências internas (limiares) e interpretados como positivo ou negativo.

### 5.3.1 Preparo de soluções (Água Peptonada Tamponada)

Para a dissolução das amostras de café solúvel foi utilizada a água peptonada tamponada. Para a preparação da mesma foram dissolvidos 25,5 g de água peptonada tamponada em 1000 mL de água destilada. O frasco com a tampa “afrouxada” foi autoclavado a 121 °C durante 15 minutos, e levado para banho maria a aproximadamente 45 °C até a temperatura se estabilizar.

### 5.3.2 Preparo das amostras

Após a verificação dos materiais quanto a esterilização, limpeza da superfície com álcool 70%, uso de jaleco limpo, luvas e touca, no interior da Cabine de Segurança Biológica foi adicionado 25 g da amostra, um comprimido do reagente (SUPP TAB 25 g) que é parte do kit pertencente ao equipamento VIDAS@ para o pré enriquecimento da amostra e 225 mL da água peptonada tamponada em um saco plástico estéril já identificado com o código da amostra, data da preparação e horário.

Feito isso, a amostra foi levada para incubação por 18 – 24 h a 41,5 °C  $\pm$  1 em estufa de cultura.

### 5.3.3 Método para análise

Após o tempo de incubação, a amostra foi homogeneizada. Em seguida, pipetou-se 500  $\mu$ L da amostra e transferiu-se para o poço-amostra do barrete (Figura 21), conforme a Figura 22. O barrete foi previamente identificada com o código da amostra. Em seguida o barrete com a amostra foi levada para o VIDAS® Heat and Go (marca Techne- Figura 23) para aquecer durante 5  $\pm$  1 minutos a 131  $\pm$  2 °C.

Posteriormente foi transferida para o Sistema VIDAS@ (marca Biomérieux – Figura 24) para efetuar o teste, conforme a Figura 25. Antes de iniciar a análise, foi inserido no equipamento os cones (SPR®), conforme a Figura 26 e feito a lista no computador do equipamento com as codificações das amostras conforme foram dispostas nas seções, conforme se ilustra na Figura 27.

O resultado é interpretado como positivo ou negativo e expresso como “*Salmonella* Ausente em 25 g” ou “*Salmonella* Presente em 25 g”.

**Figura 21.** Barrete pertencente ao kit VIDAS®, no qual foi inserido a amostra para análise de *Salmonella*.



Fonte: BIOMERIEUX, 2022.

**Figura 22.** Pipetagem da amostra preparada para o poço do barrete do kit VIDAS.



Fonte: BIOMERIEUX, 2022.

**Figura 23.** VIDAS® HEAT AND GO, no qual foi realizado o aquecimento do barrete com a amostra



Fonte: BIOMERIEUX, 2022.

**Figura 24.** Aparelho VIDAS@ aonde foi feita a análise de *Salmonella*.



Fonte: BIOMERIEUX, 2022.

**Figura 25.** Barretes dispostos no equipamento VIDAS@ após o aquecimento no HEAT AND GO.



Fonte: BIOMERIEUX, 2022.

**Figura 26.** Cones SPR® inseridos no equipamento VIDAS® para análise de *Salmonella*.



Fonte: BIOMERIEUX, 2022.

**Figura 27.** Lista das amostras dispostas no equipamento antes de iniciar a leitura.



Fonte: BIOMERIEUX, 2022.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na análise de bolor e levedura, esperava-se que o número de colônias não ultrapassasse 100, pois é o limite da maioria dos clientes e consumidores de café solúvel.

Como dito anteriormente, a *Salmonella* é proveniente de animais contaminados ou maus hábitos de higiene, por isso, espera-se que nas amostras de café solúvel essa análise resulte em “ausente”, pois no processo de café solúvel e de café torrado e moído não há interferência de animais e as boas práticas de higiene são ou deveriam ser seguidas e controladas pelo setor da Qualidade.

Como pode-se observar na Tabela 4, os níveis encontrados estão dentro do limite estabelecido pela legislação vigente RDC 12/2001 listado no item doze que se refere a produtos consumidos após a adição de líquidos com emprego de calor, a qual estabelece tolerância para amostra indicativa de Coliformes a 45 °C sendo 10 UFC/g (Unidades Formadoras de Colônias por grama), e para *Salmonella* 25 g sendo expresso como presença ou ausência.

Apenas na amostra F (F1, F2 e F3) foi identificada a presença de colônias de levedura (14, 8 e 12 . 10<sup>2</sup> UFC/g), conforme indicado na Tabela 4, bem como a identificação de colônias de bolor na amostra H (H1, H2 e H3).

Estima-se algumas possibilidades para que essa contaminação tenha ocorrido: erro no processo de embalagem e falha no controle de qualidade que não identificou o problema caso tenha ocorrido dentro da indústria onde o café foi fabricado ou na estocagem feita pelo próprio mercado que vendeu a amostra.

Isso porque na amostra F, a mais contaminada, a embalagem apresentava má qualidade e pouca segurança quanto a vedação do produto, pois a mesma continha bastante ar no seu interior, enquanto as embalagens das demais amostras que não apresentaram contaminações eram a vácuo, e a ilustração da embalagem da amostra F apresentava falha na coloração em alguns pontos.

**Tabela 4.** Resultados obtidos na análise de quantificação de colônias de bolor e leveduras e ausência/presença de *Salmonella*.

<b>Amostras</b>	<b>Bolor e levedura (<math>10^2</math> UFC/g)</b>	<b><i>Salmonella</i> spp. (ausência/presença em 25g)</b>
A1	<1	Ausente
A2	<1	Ausente
A3	<1	Ausente
B1	<1	Ausente
B2	<1	Ausente
B3	<1	Ausente
C1	<1	Ausente
C2	<1	Ausente
C3	<1	Ausente
D1	<1	Ausente
D2	<1	Ausente
D3	<1	Ausente
E1	<1	Ausente
E2	<1	Ausente
E3	<1	Ausente
F1	14	Ausente
F2	8	Ausente
F3	12	Ausente
G1	<1	Ausente
G2	<1	Ausente
G3	<1	Ausente
H1	1	Ausente
H2	1	Ausente
H3	<1	Ausente
I1	<1	Ausente
I2	<1	Ausente
I3	<1	Ausente

Fonte: Própria autora.

Já a amostra H é oriunda de uma produção, empacotamento e distribuição de mercado local em uma pequena cidade localizada no interior do estado de São Paulo, sem qualificações e auditorias frequentes. Quanto a *Salmonella* spp. obteve-se o resultado esperado, ausente, em todas as amostras já que é uma obrigatoriedade para qualquer produto no Brasil ser dito seguro pela legislação vigente e poder ser comercializado.

Em uma das análises feitas para a amostra G (G1, G2 e G3) foi identificado um ponto escuro na placa, que se assemelhava a uma possível colônia de micro-organismos, porém ele não possuía características de bolor e nem de levedura, por isso não foi considerado nos dados obtido. O ponto encontrado se assemelhava a uma película do café que é solta no momento da torrefação do grão verde.

Nas amostras cujo resultado de bolor e levedura consta "<1" não foram identificadas colônias nas placas inoculadas, o número 1 se deve ao fato de que a análise foi feita com diluição de  $10^{-2}$ .

## 7. CONCLUSÃO

Os resultados microbiológicos obtidos no presente trabalho revelaram que a maioria das amostras de café solúvel e café torrado e moído analisados estão de acordo com a legislação vigente, obedecendo os parâmetros de controle de qualidade de maneira esperada. Contudo, também foi relevado falhas neste controle, visto que duas amostras apresentaram colônias de bolor e levedura, ou ainda, falha no processo de armazenamento do mercado revendedor. Enquanto a análise da presença ou ausência de *Salmonella* nas amostras de café, o resultado está de acordo com o resultado esperado, o qual é satisfatório e demonstra que os produtos estão seguros microbiologicamente para serem comercializados no Brasil.

A produção industrial exige atenção fiscalizadora, o mais importante é, antes de tudo, a orientação e o treinamento dos fabricantes, quanto aos métodos higiênico-sanitários a serem adotados no processo produtivo. Conclui-se que é necessário uma constante e efetiva fiscalização do produto, da matéria-prima, armazenamento e distribuição do mesmo visando assim, garantir a qualidade e segurança do produto disponibilizado ao consumidor.

## REFERÊNCIAS

ALVES, R. M. V.; BORDINE, M. R. **Estimativa da vida útil de café solúvel por modelo matemático**. Food Sci. Technol. v. 18, n. 1, 1998.

BORGES, L. R.; **ANÁLISE DE QUALIDADE MICROBIOLÓGICA (BOLORES E LEVEDURAS) EM ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis* St. Hil) E IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS POTENCIALMENTE MICOTOXIGÊNICOS**. Monografia, Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1999.

CAMILETTI, B. X. **ESTRATEGIAS DE MANEJO DE *Aspergillus flavus* Y *Penicillium* spp . PARA LA REDUCCIÓN DE LOS NIVELES DE MICOTOXINAS EN MAÍZ**. 2018. Tese de Doutorado, Ciências Agropecuárias, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, 2018.

CONTROLE de *Salmonella*. Disponível em:  
<<https://foodsolution.com.br/2020/08/04/controle-de-salmonella/>>. Acesso em: 20 jun. 2022.

CHALFOUN, S. M.; CORRÊA, T. B. **MICOTOXINAS EM CAFÉ - RISCOS E CONTROLE**. Palestras Embrapa Agroindústria de Alimentos. Poços de Calda, (MG) p. 237-256. Disponível em:  
<[http://www.sbicafe.ufv.br/bitstream/handle/123456789/540/166699\\_Art11f.pdf?sequence=1](http://www.sbicafe.ufv.br/bitstream/handle/123456789/540/166699_Art11f.pdf?sequence=1)>. Acesso em: 20 jun. 2022.

FRANCO, B. D. G; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. 1. ed. São Paulo:Atheneu, 2003.

IAMANAKA, B. T.; OLIVEIRA, I. S.; TANIWAKI, M. H. **Micotoxinas em alimentos**. Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica. Recife: 2010, p. 138-161. Disponível em:  
<<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/47815/1/18-Revisao-03.pdf>>. Acesso em: 21 jun. 2022.

INDICADORES da Indústria de Café. Disponível em:  
<<https://estatisticas.abic.com.br/estatisticas/indicadores-da-industria/>>. Acesso em: 12 jun. 2022.

MARTINEZ, H. E. et.al. **NUTRIÇÃO MINERAL DO CAFEEIRO E QUALIDADE DA BEBIDA**. Solos e Nutrição de Plantas, 2014. Disponível em:  
<<https://doi.org/10.1590/0034-737x201461000009>>. Acesso em 20 jun. 2022.

O café solúvel. Disponível em: <<https://www.abics.com.br/cafe-soluvel.php>>. Acesso em: 28 mai. 2022.

O QUE são micotoxinas. Disponível em: <<https://www.lamic.ufsm.br/site/micotoxinas/o-que-sao-micotoxinas/>>. Acesso em: 20 jun. 2022.

PIMENTA, C. J. Qualidade de café. 1. ed. Lavras: UFLA, 2003.  
SAFRA brasileira de café. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cafe>>. Acesso em: 19 mai. 2022.

SALMONELLA (Salmonelose). U. S. FOOD & DRUG, 2019. Disponível em: <<https://www.fda.gov/food/foodborne-pathogens/salmonella-salmonellosis>>. Acesso em: 11 mai. 2022.

SILVA, N. et al. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água. 5. ed. São Paulo: Blucher, 2017.

SOBRE o café. Disponível em: <<https://www.cecafe.com.br/#>>. Acesso em: 10 mai. 2022.