

CURSO DE RESIDÊNCIA MULTIPROFISSIONAL EM SAÚDE NA ÁREA DE  
VIGILÂNCIA SANITÁRIA COM ÊNFASE NA QUALIDADE DE PRODUTOS,  
AMBIENTES E SERVIÇOS

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA  
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Bianca Gonçalves Medina

**AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO POR OCRATOXINA A EM AMOSTRAS DE  
CAFÉ TORRADO COMERCIALIZADAS NO BRASIL**

Rio de Janeiro

2015

Bianca Gonçalves Medina

**AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO POR OCRATOXINA A EM AMOSTRAS DE  
CAFÉ TORRADO COMERCIALIZADAS NO BRASIL**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Residência Multiprofissional em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do título de Especialista.

Preceptor: Maria Heloísa Paulino de Moraes

Tutor: Armi Wanderley da Nóbrega

Rio de Janeiro

2015

Catálogo na fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Medina, Bianca Gonçalves

Avaliação da contaminação por ocratoxina A em amostras de café torrado comercializadas no Brasil/ Bianca Gonçalves Medina. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2015.

47 f., il., tab.

Trabalho de conclusão (Residência em Vigilância Sanitária) – Programa de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. 2015.

Preceptor: Maria Heloísa Paulino de Moraes. Tutor: Armi Wanderley da Nóbrega

1. Café. 2. Ocratoxinas. 3. Contaminação de Alimentos. 4. Controle de Qualidade. I. Título



Bianca Gonçalves Medina

**AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO POR OCRATOXINA A EM AMOSTRAS DE  
CAFÉ TORRADO COMERCIALIZADAS NO BRASIL**

Trabalho de conclusão de curso  
apresentado ao Curso de Especialização em  
Controle da Qualidade de Produtos,  
Ambientes e Serviços Vinculados à  
Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de  
Controle de Qualidade em Saúde da  
Fundação Oswaldo Cruz para obtenção do  
título de Residente em Vigilância Sanitária

Aprovado em: 09/02/2015

Banca examinadora

---

MSc. Maria Heloísa Paulino de Moraes  
Instituto Nacional de Controle e Qualidade em Saúde

---

Dra. Silvana do Couto Jacob  
Instituto Nacional de Controle e Qualidade em Saúde

---

Dra. Lucia Helena Pinto Bastos  
Instituto Nacional de Controle e Qualidade em Saúde

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus por iluminar meu caminho e por me dar forças para seguir em frente.

Aos meus pais que nunca mediram esforços para que eu buscasse meus sonhos.

Às minhas irmãs que sempre estiveram ao meu lado me apoiando nos momentos difíceis e me alegrando nos momentos de tristeza.

Ao meu noivo que sempre tinha uma palavra de conforto e de incentivo nas horas de desânimo.

À Maria Heloísa, minha preceptora, por toda paciência e dedicação durante o curso de Residência.

Ao meu tutor, Armi Nóbrega, pela oportunidade de realizar o curso de Residência.

Aos amigos do Laboratório, André, Rosana, Yuri e Nínive, por todos os ensinamentos e companhia.

Às amigas da Residência, Ana, Cris, Débora, Pri, Julia e Shai pela companhia e pelos momentos de descontrações durante o curso.

## RESUMO

O Brasil destaca-se como maior produtor de café do mundo e também como grande consumidor. O café pode ser contaminado por micotoxinas principalmente a ocratoxina A (OTA). A OTA é um risco para a saúde dos consumidores, pois segundo a IARC essa toxina é considerada um provável carcinógeno humano, além de possuir propriedades de imunossupressão, teratogênica e nefrotóxica. O objetivo desse estudo é avaliar a contaminação de Ocratoxina A (OTA) em café torrado comercializados em diferentes estados do Brasil no período de Agosto de 2013 a Dezembro de 2014. A determinação da concentração de OTA foi realizada pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência com limpeza do extrato das amostras por coluna de imunoafinidade. Os limites de detecção e quantificação foram  $0,3 \mu\text{g kg}^{-1}$  e  $0,5 \mu\text{g kg}^{-1}$ , respectivamente. A recuperação do método variou de 78 a 94 % para os níveis de 0,7 a  $10,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ . Do total de 56 amostras analisadas 41 (73%) estavam contaminadas. A concentração da contaminação variou de 0,54 a  $11,97 \mu\text{g kg}^{-1}$ . Apesar de apenas uma amostra apresentar concentração de OTA acima do permitido pela legislação brasileira segundo RDC Nº 7 de fevereiro/2011 (LMT = 10ppb), foi possível observar um aumento da contaminação do café. A alta frequência de OTA nas amostras de café torrado demonstra a importância de um controle efetivo desse produto pelas autoridades governamentais e as indústrias.

Palavras chave: café. Ocratoxina. contaminação

## ABSTRACT

Brazil is the largest coffee producing country and its largest consumer. Coffee may be contaminated by mycotoxins mainly ochratoxin A (OTA). OTA is a risk to consumer health because according to The IARC classified it as a possible carcinogen for humans – 2B group. Several studies have shown OTA to be potent nephrotoxin, immune suppressant and teratogen. The aim of this study was to determine the Ochratoxin A (OTA) in roasted coffee samples sold in different states of Brazil from August 2013 to December 2014. OTA was isolated in a immunoaffinity column and quantified by HPLC with fluorescence detection. The established detection and quantification limits were  $0.3 \mu\text{g kg}^{-1}$  and  $0.5 \mu\text{g kg}^{-1}$ , respectively. The recoveries from spikes samples ranged 78 to 94 % at levels of ranged  $0.7$  to  $10.0 \mu\text{g kg}^{-1}$ . Of a total of 56 samples analysed 41 (73%) contained OTA at levels ranging from  $0.54$  to  $11.97 \mu\text{g kg}^{-1}$ . Although only one sample shows OTA concentration above that allowed by legislation under RDC 7 February / 2011 (LMT = 10 ppb), we observed an increase in coffee contamination. The high frequency of OTA in the roast coffee samples demonstrates the importance of an effective control of this product by governmental authorities and industries.

Keywords: coffee. Ochratoxin. contamination

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Estrutura Química de OTA.....	12
Figura 2 Princípio da coluna de imunoafinidade.....	19
Figura 3 Fluxograma do método para análise de café .....	24
Figura 4 Cromatograma padrão de OTA.....	27
Figura 5 Cromatograma de amostra de café torrado contaminada por OTA.....	28
Figura 6 Gráfico da porcentagem de amostras coletadas por regiões.....	29
Figura 7 Resultado das amostras analisadas no monitoramento 2013/2014.....	30

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Legislação de alguns países com Limites Máximos Toleráveis para OTA.....	17
Tabela 2 Quantitativo de amostras de café pactuadas em cada estado para o PROMAC (Agosto/2013 - Dezembro/2014).....	21
Tabela 3 Resultados da validação para os níveis de concentração estudados .....	26
Tabela 4 Número de amostras de café coletadas em cada Estado para o PROMAC.....	27
Tabela 5 Resultados das amostras de café torrado analisadas.....	29
Tabela 6 Resultado de cada região de onde foram coletadas as amostras.....	30
Tabela 7 Resultado das amostras coletadas expressas por região brasileira amostrada.....	31
Tabela 8 Incidência de OTA em café torrado no Brasil.....	32
Tabela 9 Incidência mundial de Ocratoxina A (OTA) em Café torrado.....	32

## LISTA DE SIGLAS

ABIC	Associação Brasileira de Indústrias de Café
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APPCC	Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE/F	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de fluorescência
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
IARC	International Agency of Research on Cancer
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
JECFA	Joint Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization Expert Committee on Food Additives
LACEN	Laboratórios Centrais de Saúde Pública
LMT	Limite Máximo Tolerável
OIC	Organização Internacional de Café
OTA	Ocratoxina A
VISA	Vigilância Sanitária

## LISTA DE SÍMBOLOS

ng	nanograma
µg	micrograma
µL	microlitros
g	grama
kg	quilograma
° C	graus Celsius
%	Porcentual
mL	mililitros
mm	milímetros
min	minutos

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	10
1.1 CAFÉ.....	10
1.2 OCRATOXINA A.....	11
1.2.1 Características químicas da OTA.....	11
1.2.2 Toxicidade da OTA.....	13
1.3 CONTAMINAÇÃO DO CAFÉ POR OTA.....	14
1.3.1 Prevenção e Controle.....	15
1.4 LEGISLAÇÃO PARA OCRATOXINA.....	16
1.5 PROGRAMAS DE MONITORAMENTO.....	17
1.5.1 PROMAC.....	17
1.6 METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DE OTA.....	18
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	20
2.1. OBJETIVOS GERAIS.....	20
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
<b>3. METODOLOGIA</b> .....	21
3.1. AMOSTRAGEM.....	21
3.2 EQUIPAMENTOS E MATERIAIS.....	22
3.2.1 Equipamentos.....	22
3.2.2 Padrões e Reagentes.....	22
3.2.3 Vidrarias.....	22
3.3 MÉTODO.....	22
3.3.1 Preparo da amostra.....	23
3.4 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.....	25
3.5 ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	25
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	26
<b>5. CONCLUSÃO</b> .....	35
<b>6. REFERÊNCIAS</b> .....	36

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 CAFÉ

O café é uma das bebidas mais apreciadas e consumidas no mundo. Segundo a Organização Internacional de Café (OIC), estima-se que mais de dois bilhões de copos de café são consumidos a cada dia em todo mundo a cada dia (OIC, 2014).

Segundo a Associação Brasileira da Indústria de Café (ABIC), o café é uma bebida natural, saudável com uma grande variedade de macro e micro nutrientes os quais contribuem com dieta e bem-estar. Pesquisas realizadas em diferentes países como Brasil, Estados Unidos, Europa e Japão revelam que o café pode fazer muito bem à saúde humana e que seu consumo diário e moderado (3 a 4 xícaras/dia) contribui na prevenção de diversas doenças, como a diabetes do adulto, o câncer de cólon, fígado e mama, doença de Parkinson entre outras (ABIC, 2014).

Além da cafeína, componente mais conhecido por seus efeitos estimulantes sobre o sistema nervoso central, o café possui ainda uma grande variedade de minerais, aminoácidos, lipídeos e ácidos graxos livres, açúcares, vitaminas e os ácidos clorogênicos que estão em maior quantidade. Esses componentes contribuem para a atividade antioxidante do produto trazendo benefícios à saúde dos consumidores (ABIC, 2014).

O café não é só uma bebida saudável e que traz o bem estar. A bebida de sabor e aroma incomparável também tem uma grande importância para a economia brasileira e mundial. O Brasil é responsável por produzir 49,2 milhões de sacas de 60 kg sendo o maior produtor do mundo e exporta mais de 30 milhões de sacas por ano (ABIC, 2014). Além de grande produtor e exportador mundial, o Brasil tem a fama de maior consumidor de café. (LEONI, et al, 2001; TOLEDO, 2000). Dados da ABIC, mostram que o consumo per capita foi de em 4,98 kg de café torrado/habitante.ano (6,23 kg de café verde.habitante.ano) (ABIC, 2013).

Os frutos de café podem ser contaminados por uma variedade de micro-organismos, principalmente os fungos, resultando em perda de rendimento, descoloração, redução do valor nutricional e contaminação por micotoxinas (SOUZA & CARVALHO, 1997).

A contaminação fúngica junto com a produção de metabólitos tóxicos são fatores inevitáveis e de difícil controle, os quais vão interferir na qualidade do café, economia do país e na saúde do consumidor (PETRACCO, 1998; ABIC, 2002).

Diante desses fatos, existe uma grande atenção voltada para esse produto, já que a busca por produtos de maior qualidade vem aumentando tanto por parte dos consumidores quanto dos países importadores.

## 1.2 OCRATOXINA A

Micotoxinas são metabólitos tóxicos produzidos por fungos filamentosos que podem contaminar muitos alimentos e causar danos à saúde do homem e dos animais. Dentre as micotoxinas conhecidas destaca-se a ocratoxina A (OTA) por ser um possível carcinógeno humano (BENNET, 2003).

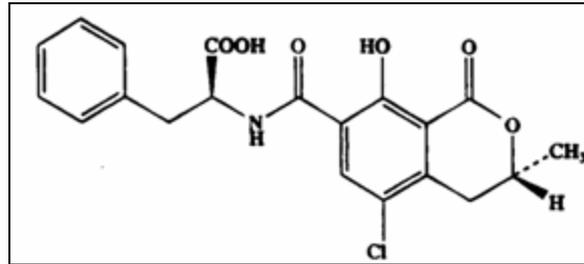
A ocratoxina A vem merecendo atenção e destaque no cenário mundial devido a sua alta toxicidade e ocorrência. Essa micotoxina tem sido encontrada em diversos alimentos e bebidas diariamente consumidas pela população e ainda pode ser uma barreira na comercialização de produtos entre os países (DUARTE, 2010).

A OTA pertence ao grupo de metabólitos secundários produzidos por fungos toxigênicos que contaminam diversos alimentos (MOSS, 1996; LARSEN et al, 2001). Os fungos produtores de OTA pertencem ao gênero *Aspergillus* e *Penicillium* (CODEX ALIMENTARIUS, 2009).

### 1.2.1 Característica química da OTA

O grupo das Ocratoxinas é classificado em Ocratoxina A, Ocratoxina B e Ocratoxina C. São compostos que apresentam  $\beta$ -fenilalanina ligada a uma isocumarina por ligação amida. A OTA apresenta fluorescência verde e um átomo de Cloro na fórmula (radical R1), responsável pela sua toxicidade (SCUSSEL, 1998). A Figura 1 representa a estrutura química de OTA.

Figura 1 - Estrutura Química de OTA



Fonte: pt.wikipedia.org

A solubilidade de OTA é alta em solventes orgânicos polares e moderada em solução aquosa de bicarbonato de sódio. Insolúvel em éter de petróleo e hidrocarboneto saturado. Estável a temperatura de cozimento, sendo necessárias temperaturas acima de 250°C por tempo prolongado para reduzir a contaminação no café (CODEX ALIMENTARIUS, 1999).

A OTA também tem uma característica importante que é a resistência ao tratamento térmico. A OTA é fotosensível, porém o efeito da luz sobre as toxinas aderidas aos cereais tem pouca importância. Essas características indicam que a remoção das ocratoxinas de alimentos e bebidas pode ser muito difícil, sendo assim a prevenção a melhor forma de proteção para evitar a formação da toxina (KRUGER, 2006).

### 1.2.2 Toxicidade da OTA

OTA destaca-se pela alta toxicidade e pela ocorrência natural em produtos vegetais, causando intoxicações clínicas e subclínicas em animais e humanos (FINK-GREMMELS, 2001; MOSS; 1996).

A principal via de contaminação da OTA é o trato gastrointestinal, sendo a micotoxina absorvida lentamente ao longo do percurso. Na maioria das espécies a absorção ocorre primeiramente no estômago, seguindo-se uma absorção lenta no intestino. No sangue a OTA encontra-se fortemente ligada às proteínas plasmáticas e essa ligação que irá determinar a persistência da micotoxina no sangue, e consequentemente a sua toxicidade (NOGUEIRA & OLIVEIRA, 2006).

Os órgãos alvo da OTA são a princípio os rins correspondendo, portanto, a uma nefrotoxina e em segundo lugar o fígado (SCUSSEL, 1998). Em 1993 a International Agency of Research on Cancer (IARC) lançou um documento que classificou a Ocratoxina A como “provável carcinógeno para humanos” - Grupo 2B, neste mesmo documento a Agência também cita diversos estudos que apontam a OTA como mutagênica, teratogênica, imunossupressora, fetotóxica, potente nefrotóxica e possivelmente envolvida com a etiologia da nefropatia endêmica dos Balcãs, doença degenerativa dos rins. Também é abordada pela literatura a ação genotóxica da OTA induzindo danos ao DNA e aberrações cromossômicas tanto in vitro quanto in vivo, entretanto os mecanismos desta genotoxicidade não estão bem delineados e não há provas de que é mediada por ação direta sobre o DNA (IARC, 1993; PRADO et al, 2000; SEKIYAMA et al, 2005).

Baseado em estudos, levando em conta a toxicologia de OTA e a sua presença em alimentos, em 2001, O Joint Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization Expert Committee on Food Additives (JECFA) definiu uma ingestão semanal tolerável provisória de 100 ng/kg de peso corporal (p.c.), correspondendo cerca de 14 ng/kg de p.c. por dia (JECFA, 2001).

Em 2002, uma avaliação da ingestão alimentar de OTA pela população da Comunidade Europeia foi realizada e o café representou 10% do consumo total, enquanto cereais e produtos de cereais contribuiu com 50% para a exposição humana à OTA. Para a população em geral, a ingestão de OTA por café variou 0,06-0,42 ng/kg de peso corporal/dia (MIRAGLIA & BRERA, 2001).

SABINO et al avaliaram a contribuição do café para a ingestão semanal tolerável provisória de OTA e observaram que, com a média de contaminação de 1,24 ng g<sup>-1</sup> em café instantâneo no estudo, OTA contribuiu com 1,24% da ingestão semanal tolerável provisória de OTA. Quando foi levado em consideração o maior valor encontrado de contaminação, o consumo de café pode ser responsável por 6,29% da ingestão semanal tolerável provisória de OTA. Esse estudo levou em consideração o consumo de cinco xícaras de café por dia que corresponde a 10g de café instantâneo (SABINO et al, 2007).

PRADO et al, avaliaram a contribuição do café para a ingestão semanal tolerável provisória de OTA e observaram que considerando a ingestão de 4 xícaras de café por dia (24g de café torrado e moído ou 8g de café solúvel) que é o consumo europeu por pessoa, e o valor médio encontrado de OTA em seu estudo que foi de

0,73 ng g<sup>-1</sup> e 1,75 ng g<sup>-1</sup>, respectivamente, a ingestão de ocratoxina A corresponderia a 5,84 ng/dia e 42 ng/dia contribuído com cerca de 0,68% e 4,9%, respectivamente, da fonte de OTA na dieta (PRADO, 2000).

### 1.3 CONTAMINAÇÃO DO CAFÉ POR OTA

O café tem sido alvo de contaminação por micotoxinas, principalmente a ocratoxina A (OTA) durante as fases de pré e pós-colheita (SOUZA & CARVALHO 1997, FUJII, 2002).

Desde 1940, tem sido observada a influência dos fungos sobre as características sensoriais do café. Além das características sensoriais, os fungos toxigênicos podem alterar a qualidade do café e colocar em risco a segurança do produto (KRUG, 1940; CHALFOUN & BATISTA, 2007).

Diversos fungos estão relacionados aos frutos e grãos de café durante todo o ciclo reprodutivo e podem, sob condições específicas, causar perdas na qualidade, produzindo odores e sabores indesejáveis além da produção de metabólitos indesejáveis comprometendo a segurança alimentar do produto (VELMOUROUGANE, 2000).

No café, apenas espécies de *Aspergillus*, especificamente *A. ochraceus* (*A. westerdijkiae* e *A. steynii*), *A. niger*, e *A. carbonarius* estão envolvidos na produção de OTA (CODEX ALIMENTARIUS, 2009).

O desenvolvimento de fungos é um dos mais sérios responsáveis pelas perdas pós-colheita, associadas a condições ambientais que prevalecem nas regiões produtoras durante o ciclo produtivo (URBANO et al., 2001).

As mudanças climáticas de temperatura afetam significativamente a produção de OTA por fungos toxigênicos (PATIÑO, et al, 2014).

Dentre os fatores que contribuem para a presença de fungos no café e consequentemente a contaminação por ocratoxina A estão a umidade relativa do ambiente e do alimento sendo a faixa ótima entre 80 e 85%, a temperatura em que o clima tropical e semi-tropical favorece a produção de fungos toxigênicos e a atividade de água que pode estar na faixa de 0,70 - 0,90. (TANIWAKI E SILVA, 2001; SCUSSEL, 1998).

Durante a fase de colheita e secagem os grãos entram em contato prolongado com o solo favorecendo a colonização fúngica podendo ser a principal via de contaminação (NOGUEIRA & OLIVEIRA, 2006; MORAES, et al, 2003).

A torrefação pode reduzir os teores dessa micotoxina, mas mesmo após esse processo a OTA pode continuar presente no café já que a degradação de OTA durante a torra pode variar muito, devido à distribuição de OTA dentro de um mesmo lote de café beneficiado (SOUZA & CARVALHO 1997, FUJII, 2002, NOGUEIRA & OLIVEIRA, 2006).

Atento a este contexto, a Organização Internacional do Café (OIC), desde 2002, incentiva elaborações de estudos e diretrizes para reduzir a preocupação do mercado e os efeitos da presença de OTA na cadeia produtiva do café. Como líder mundial na produção de café, o Brasil tem assumido o domínio e o conhecimento sobre as condições que podem levar a ocorrência de OTA no campo e pós-colheita. (CCCRJ, 2008).

Assim, no Brasil, uma importância maior tem sido dada para a pesquisa de OTA já que a cafeicultura tem grande importância no mercado interno e externo e a presença de OTA repercute impacto na qualidade do produto, na economia do país e na saúde do consumidor (LEONI et al, 2001, OTTENEDER E MAJERUS, 2001).

O alto consumo do café junto com as implicações de OTA na saúde pública e comércio exterior justificam a importância da pesquisa desta toxina no café brasileiro (FUJII, 2002).

### 1.3.1 Prevenção e Controle

A adoção de Boas Práticas Agrícolas, Boas Práticas de Fabricação e Boas Práticas de Higiene com base no programa de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) têm sido recomendadas como medidas preventivas para a ocorrência de micotoxinas. Assim é possível prevenir e minimizar o risco de contaminação e desenvolvimento de fungos toxigênicos e conseqüentemente a produção de micotoxinas (CHALFOUN & BATISTA, 2007).

Diante de preocupação mundial com a contaminação do café por OTA, a FAO desenvolveu as Diretrizes para a prevenção da formação de mofos no café como uma estratégia para permitir que os países produtores de café desenvolvam e

implementem seus próprios programas nacionais para a prevenção e redução da contaminação por OTA. Esse documento do CODEX ALIMENTARIUS é de grande importância já que está de acordo com as normas internacionais para prevenção da contaminação por OTA em café (CODEX ALIMENTARIUS, 2009).

A contaminação por fungos produtores de OTA pode ser minimizada com técnicas adequadas de preparo, secagem, transporte e estocagem dos grãos de café. Para isso, torna-se fundamental o incentivo às soluções tecnológicas e às ações que privilegiem a adoção de boas práticas agrícolas, como forma de prevenção e de exercício de uma cafeicultura sustentável, atenta à qualidade do produto e à segurança da saúde humana. (CCCRJ, 2008).

#### 1.4 LEGISLAÇÃO PARA OCRATOXINA

Normas têm sido implementadas em diversos países a fim de evitar os efeitos nocivos causados pelas micotoxinas sobre os consumidores de alimentos *in natura* e processados, (FREIRE, et al, 2007).

Desde 1970 os contaminantes de alimentos têm sido avaliados pelos comitês dos órgãos mundiais. A partir desses encontros são estabelecidos os níveis a serem seguidos pela comunidade internacional para o comércio dos seus produtos (RIBEIRO, 2007).

A contaminação de café por ocratoxina A se torna um entrave na comercialização desse produto já que os países importadores estão cada vez mais exigentes com os Limites Máximos Toleráveis (LMT) para a presença de OTA em café (FURLANE E SOARES, 1998, CAMPOS, 2009)

Diversos países já possuem Limites Máximos Toleráveis para ocratoxina A de modo a minimizar seus riscos. No Brasil, a ANVISA estabelece para OTA o limite máximo tolerável de  $10 \mu\text{g kg}^{-1}$  em café torrado (ANVISA, 2011). Já a União Europeia determina LMT de  $5 \mu\text{g kg}^{-1}$  para café torrado e  $10 \mu\text{g kg}^{-1}$  para café instantâneo (COMUNIDADE EUROPEIA, 2005).

Na tabela 1 constam os limites máximos toleráveis para OTA em alguns países.

Tabela 1 - Legislação de alguns países com Limites Máximos Toleráveis para OTA

Países	Produtos	Limite $\mu\text{g Kg}^{-1}$
Uruguai	Café	50,0
Grécia	Café cru	20,0
Finlândia	Café cru	10,0
Itália	Café cru	8,0
Brasil	Café torrado/ moído e solúvel	10,0
Itália	Café torrado/ moído e solúvel	10,0
Suíça	Café torrado/ moído e solúvel	4,0

Fonte: GOLLUCKE & TAVARES, 2004; ANVISA, 2011.

## 1.5 PROGRAMAS DE MONITORAMENTO

### 1.5.1 Programa de Monitoramento de Aditivos e Contaminantes em Alimentos

Até hoje não foi realizado nenhum programa nacional de monitoramento para ocratoxina em café, o que se tinha até então eram monitoramentos de café que representam de forma mais expressiva a produção agrícola de São Paulo e Minas Gerais (região Sudeste), estados produtores de café dito “exportação”.

Em 2013, foi pactuado um Programa Nacional de Monitoramento de Aditivos e Contaminantes em alimentos (PROMAC) entre a ANVISA e as Vigilâncias Sanitárias Estaduais (VISAs) para a coleta de amostras locais de cada estado. As amostras coletadas seriam enviadas aos Laboratórios Centrais Estaduais (LACEN) e ao INCQS para análise de OTA.

## 1.6 METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DE OTA

O perigo potencial de OTA na saúde pública e a sua inevitável presença em alimentos, requer o desenvolvimento de métodos sensíveis e eficientes para monitorar a exposição a esse contaminante. (CHU, 1984, FURLANI et al., 1998).

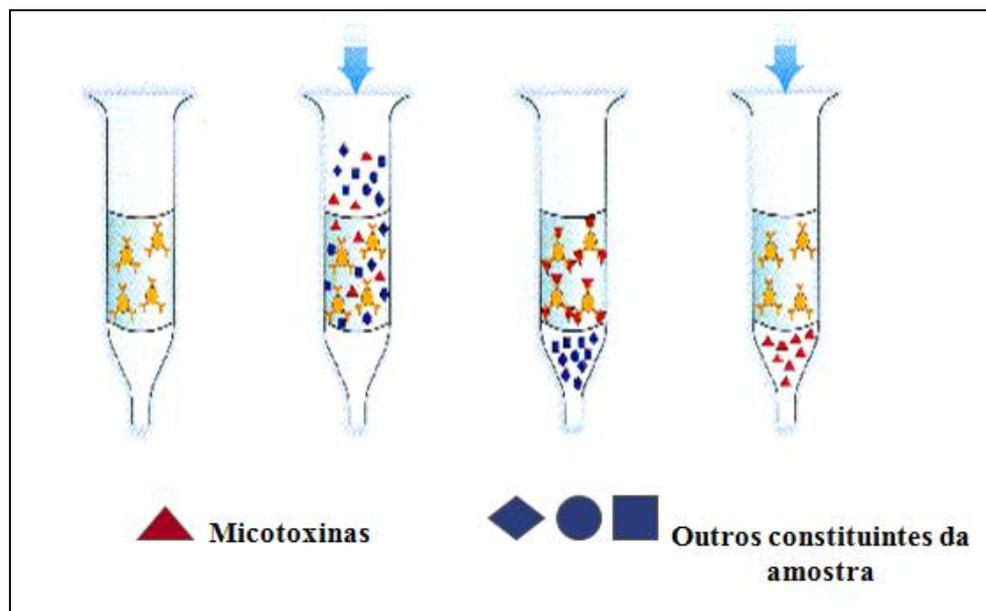
Várias metodologias vêm sendo usadas para detecção e quantificação de OTA em café. Nessas metodologias predominam as técnicas de Cromatografia em Camada Fina, Cromatografia de Afinidade e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (AOAC, 1995; MARTINS et al.; 2000; TRUCKSESS et al., 2000; LARSEN et al., 2001).

Atualmente a metodologia oficialmente aceita baseia-se na extração com solventes orgânicos, purificação da toxina com coluna de imunoafinidade e a detecção e quantificação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (SHARMAN et al., 1992).

A CLAE é uma técnica de separação tradicional destinada à análises quantitativa. É uma metodologia sensível de alta resolução, e sua eficiência está diretamente relacionada à etapa de pré-limpeza da amostra, tornando o uso de minicolunas para remoção de impurezas e concentração de OTA no estrato bruto indispensável (GUIMARÃES & COLLINS, 1993).

As colunas de imunoafinidade (CIA) são preparadas com anticorpos anti-micotoxinas que possibilitam a extração da toxina de interesse em diferentes matrizes. As colunas de imunoafinidade conferem rapidez, simplicidade, alta especificidade e recuperação, melhorando os limites de detecção (FUJII et al., 2002; SHARMAN et al., 1992). A Figura 2 ilustra o princípio da coluna de imunoafinidade.

Figura 2: Princípio da coluna de imunoafinidade



A confirmação química de micotoxinas detectadas em amostras é essencial para minimizar resultados falsos positivos. A coincidência dos aspectos visíveis ou das propriedades cromatográficas não garantem, que o composto isolado do extrato seja quimicamente idêntico à referência (padrões). Entre as técnicas disponíveis destacam-se a espectrofotometria de massa de alta resolução, ressonância magnética nuclear, mudança de fase móvel, derivatização e co-cromatografia (JIAO et al., 1992; INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1998).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Esse trabalho tem como objetivo avaliar pela primeira vez em nível nacional a contaminação por OTA em café torrado consumido no Brasil.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Detectar e Quantificar Ocratoxina A nas amostras de café torrado comercializadas no território nacional;
- Comparar as médias de contaminação de OTA em café deste monitoramento com os resultados de monitoramentos anteriores realizados neste Instituto e com estudos da literatura;
- Calcular a contribuição do café para a ingestão máxima semanal permitida de OTA preconizada pelo JECFA;
- Avaliar as informações da embalagem verificando a possibilidade da rastreabilidade do produto final com a região produtora.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 AMOSTRAGEM

As amostras analisadas de Agosto de 2013 à Dezembro de 2014 foram obtidas através do Programa de Monitoramento de Aditivos e Contaminantes (PROMAC/ANVISA). No planejamento do programa, o quantitativo de amostras a ser coletadas pelas VISAs estaduais foi de 68 amostras, preferencialmente de marcas diferentes. A modalidade de análise foi fiscal, necessitando que um mínimo de 1 kg do mesmo lote do produto fosse apreendido.

A quantidade total do produto contido na embalagem foi homogeneizada, quarteada até a obtenção de uma quantidade adequada à análise (cerca de 150g), e em seguida alíquotas de 25 g foram pesadas.

Na Tabela 2 consta o quantitativo de amostras pactuadas com a VISA dos estados para o programa de monitoramento

Tabela 2 - Quantitativo de amostras de café pactuadas em cada estado para o PROMAC (Agosto/2013 – Dezembro/2014)

<b>Estados</b>	<b>Número de amostras previstas</b>
Acre	4
Amapá	8
Amazonas	1
Rondônia	11
Pará	5
Tocantins	7
Pernambuco	3
Santa Catarina	19
Paraná	10
Total	68

## 3.2 EQUIPAMENTOS E MATERIAIS

### 3.2.1 Equipamentos

Os equipamentos usados foram capela de exaustão, Blender (WARRING), centrífuga com refrigeração (HITACHI, CF 7D2), bomba de vácuo (MILLIPORE), ultrassom (BRANSON, 2510) cromatógrafo líquido com detector por fluorescência (Shimadzu UPLC-20AD), coluna de imunoafinidade (R-BIOPHARM, RHÔNE), dentro do prazo de validade estabelecido de um ano e conservada a 2 – 8 °C até 30 minutos antes da análise, membrana para filtração PVDF com 0,22 µm de poro (MILLIPORE).

### 3.2.2 Padrões e Reagentes

O padrão de OTA usado foi da marca Sigma & Aldrich (St. Louis, MO, EUA) e os solventes orgânicos e reagentes usados foram: acetonitrila grau HPLC; metanol grau HPLC, bicarbonato de Sódio PA, ácido acético glacial PA e tolueno PA.

Foram preparadas as seguintes soluções para análise das amostras: solução de ácido acético/ tolueno 9:1 v/v, acetonitrila para CLAE, água deionizada, Bicarbonato 3 %, metanol, tampão fosfato para análise das amostras.

### 3.2.3 Vidrarias

Foram usadas pipetas volumétricas de 50mL, 10mL, 15mL e 5mL, seringa com volume de 20mL, balão de 10 mL, vials próprios para cromatografia líquida. As pipetas e balões usados estavam calibrados com certificado de calibração rastreáveis à NBR/ISO/IEC 17025.

## 3.3 MÉTODO

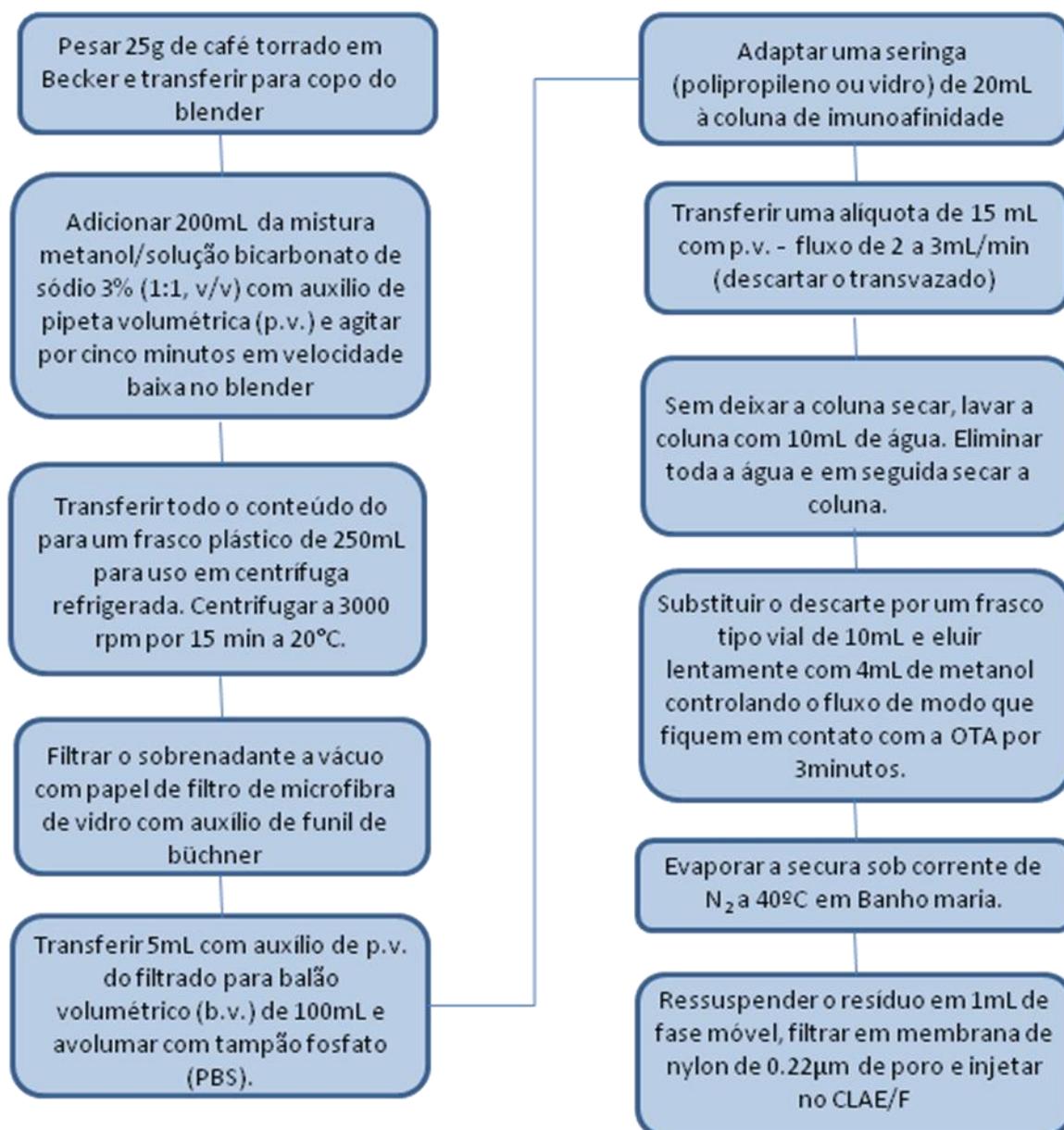
O método para determinação de Ocratoxina A em café (PITTET et al., 1996 com modificações) baseia-se na extração de OTA em fase sólida e a técnica de determinação e quantificação utilizada foi a cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência (CLAE/F) utilizando fase reversa. O método (POP 65.3120.162) validado intralaboratorialmente, segundo protocolo de validação de

métodos de análise para micotoxinas em alimentos, (POP 65.3120.145) ambos estão no manual da qualidade do INCQS. O resumo da validação está descrito nas tabelas 3 e 4 em resultados e discussão.

### 3.3.1 Preparo da amostra

Foram pesadas 25 gramas da amostra e adicionado 200 mL o solvente orgânico para extração da ocratoxina em Blender por cinco minutos em velocidade baixa. Após a extração a amostra foi centrifugada e filtrada para eliminar as sujidades. Foi retirada uma alíquota de 5 ml e transferida para balão de 100 ml e avolumado com Solução tampão. Dessa solução foi adicionada uma alíquota de 15 ml à seringa e após passar todo o extrato pela a coluna, foi lavada com água. Na extração da ocratoxina da coluna usou-se 4 ml de metanol. O extrato foi seco e avolumado com fase móvel para então ser injetada no equipamento.

Figura 3: Fluxograma do método para análise de café



Todas as amostras foram processadas em duplicata e submetidas a três injeções cromatográficas consecutivas.

### 3.4 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

A separação e quantificação de ocratoxina A foi realizada em um sistema de Cromatografia com detector de fluorescência (excitação: 336 nm e emissão: 468 nm) com coluna C18 (WATERS) 4,6 X 250mm, precedida de pré-coluna (WATERS) 4,6 X 25mm.

A fase móvel utilizada consiste em uma solução contendo ácido acético 2% e acetonitrila 1:1 v/v. A fase foi eluída isocraticamente em um fluxo de 1 mL/min de fase móvel. Nestas condições o tempo de retenção da OTA foi de aproximadamente 8,5 minutos.

Os solventes utilizados foram os recomendados para cromatografia líquida e a água foi purificada pelo sistema de ultrafiltração (MILLI-Q). O volume de injeção foi de 20 ou 50  $\mu\text{L}$ , dependendo da concentração da Ocratoxina A presente na amostra.

### 3.5 ANÁLISE DOS RESULTADOS

Na quantificação das amostras foi levada em consideração a área dos picos, o resultado final obtido da média das três injeções e a concentração expressa em  $\mu\text{g kg}^{-1}$  ( $\text{ng g}^{-1}$ ). As planilhas de cálculo foram construídas com auxílio do programa Microsoft Excel 2010 para análise estatística dos dados obtidos.

#### 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os parâmetros estudados na validação do método foram: linearidade, faixa de trabalho, repetitividade, precisão intermediária, recuperação, Limite de Detecção (LD), Limite de Quantificação (LQ). O LD e LQ foram calculados pela razão sinal/ruído. Os resultados obtidos foram validados pelos critérios de aceitação do documento da Comunidade Europeia nº 401(CE, 2006), específico para micotoxinas. Na tabela 3 consta os níveis de fortificação avaliados na validação com seus respectivos valores de média, coeficiente de variação (CV) e a recuperação.

Tabela 3 - Resultados da validação para os níveis de concentração estudados, em  $\mu\text{g kg}^{-1}$

Níveis de fortificação *	Média da concentração	CV(%)	Média da Recuperação%
0,7	0,7	14,6	94
1,4	1,2	5,5	80
2,5	2,2	5,6	89
5,0	4,2	4,1	81
7,5	6,2	2,8	83
10,0	8,1	2,1	78

Foram avaliados cinco níveis de concentração variando de 0,7 a 10,0  $\mu\text{g kg}^{-1}$  com CV entre 2,1 a 14,6 e recuperação variando de 78 a 94 %.

Na tabela 4 estão os resultados obtidos na validação para os cinco níveis de fortificação estudados.

Tabela 4 - Dados da validação	
<b>Faixa de trabalho</b>	0,3 - 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$
<b>Recuperação</b>	78 - 94 %
<b>Limite de Detecção</b>	0,3 $\mu\text{g kg}^{-1}$
<b>Limite de Quantificação</b>	0,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$

Nas figuras 4 e 5 estão representados os cromatogramas do padrão de OTA e de amostra naturalmente contaminada do produto, nas condições cromatográficas descritas acima.

Figura 4: Cromatograma padrão de OTA.

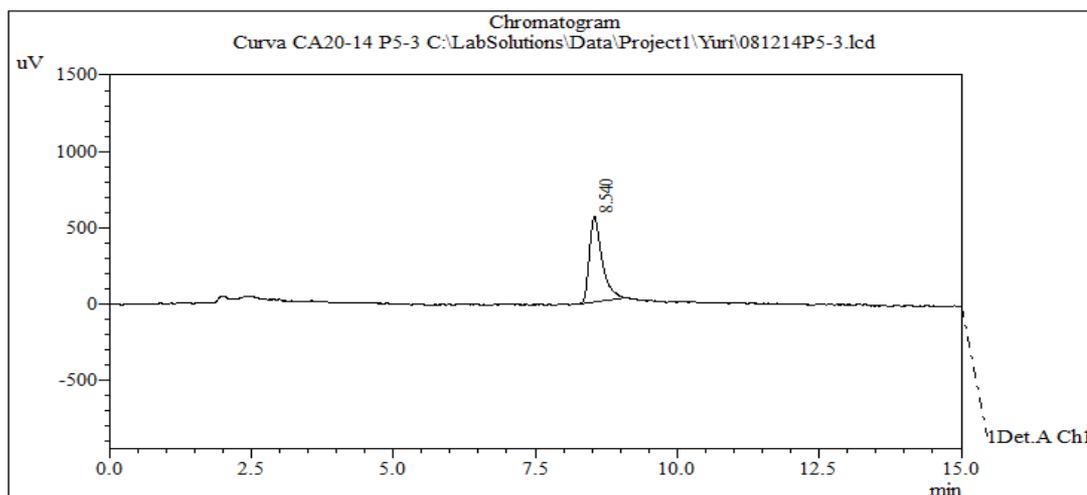
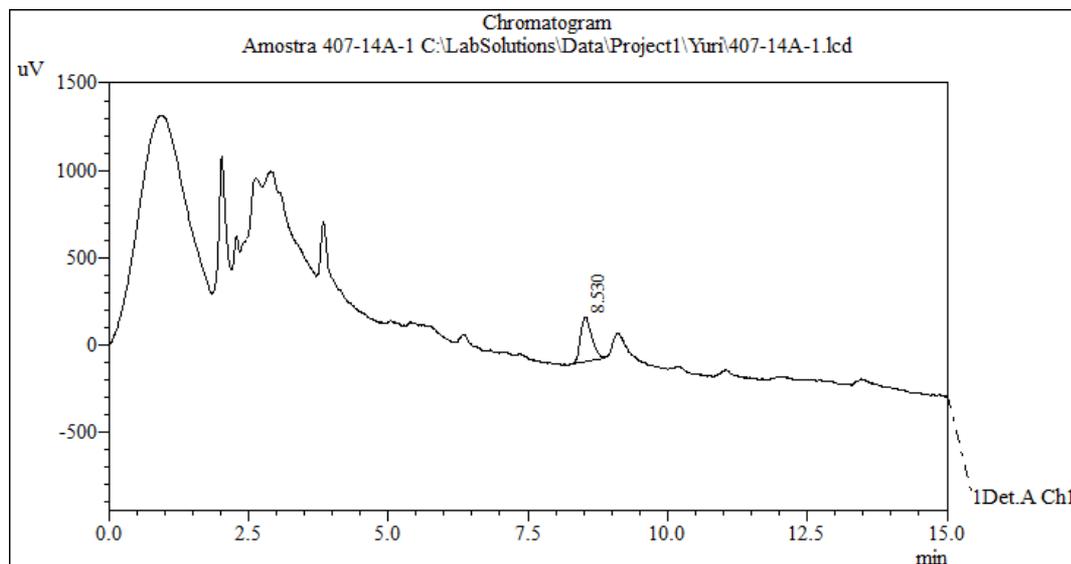


Figura 5: Cromatograma de amostra de café torrado contaminada por OTA.



No monitoramento realizado durante os meses de Agosto/2013 a Dezembro/2014, das 68 amostras previstas no planejamento apenas 56 foram coletadas e analisadas sendo estas de 33 marcas diferentes. As embalagens de todas as marcas analisadas foram avaliadas buscando obter informações relativas a rastreabilidade da origem do produto. Das 33 marcas avaliadas, apenas três apresentaram a região produtora de origem, contudo todas as embalagens continham a torrefadora ou a indústria produtora.

Na tabela 5 encontra-se o número de amostras coletadas por Estado no período de agosto de 2013 a dezembro de 2014.

Tabela 5 - Número de amostras de café coletadas em cada Estado em cada estado para o PROMAC

Estados	Número de amostras coletadas
Acre	4
Amapá	3
Amazonas	1
Rondônia	9

Tabela 5 (continuação) - Número de amostras de café coletadas em cada Estado em cada estado para o PROMAC

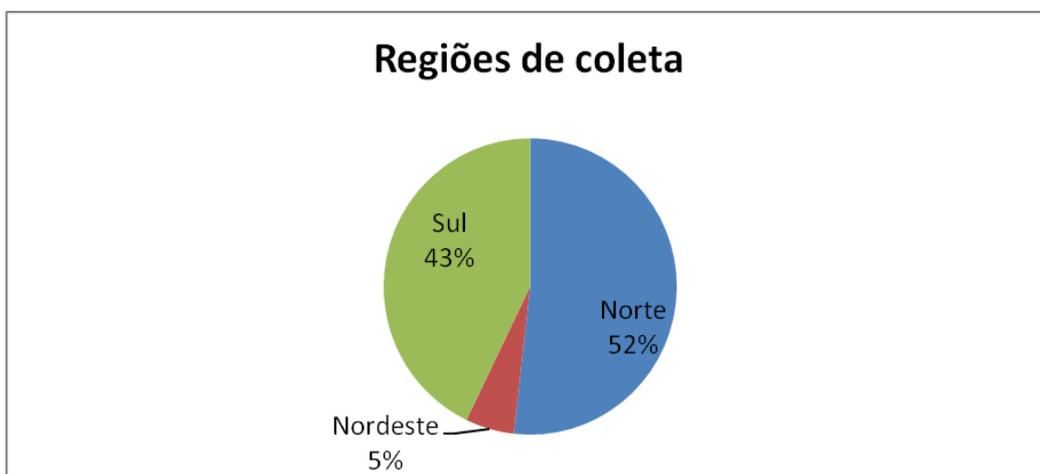
Pará	5
Tocantins	7
Pernambuco	3
Santa Catarina	17
Paraná	7
Total	56

Comparando a tabela 2 com a tabela 5, podemos verificar que 82,4% das amostras pactuadas foram coletadas.

Uma das dificuldades encontradas foi a mobilização das VISAS dos estados na coleta das amostras e o fato que corroborou para isso foi de se tratar do ano de Copa do Mundo, período que as VISAs estaduais ficaram com as atividades voltadas para o evento. Outro problema foi relacionado à quantidade de amostra para a modalidade de análise fiscal. Nem sempre chegava ao laboratório 1Kg do produto, assim a modalidade de análise era alterada para “orientação”.

O gráfico da figura 6 representa as a porcentagem de amostras coletadas das regiões participantes do PROMAC.

Figura 6: Gráfico da porcentagem de amostras coletadas por regiões



Das 56 amostras analisadas 73% apresentaram contaminação por OTA e a concentração variou na faixa de 0,53 - 11,97  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , com média de 2,94  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . Na tabela 6 estão representados os resultados das amostras de café torrado analisadas.

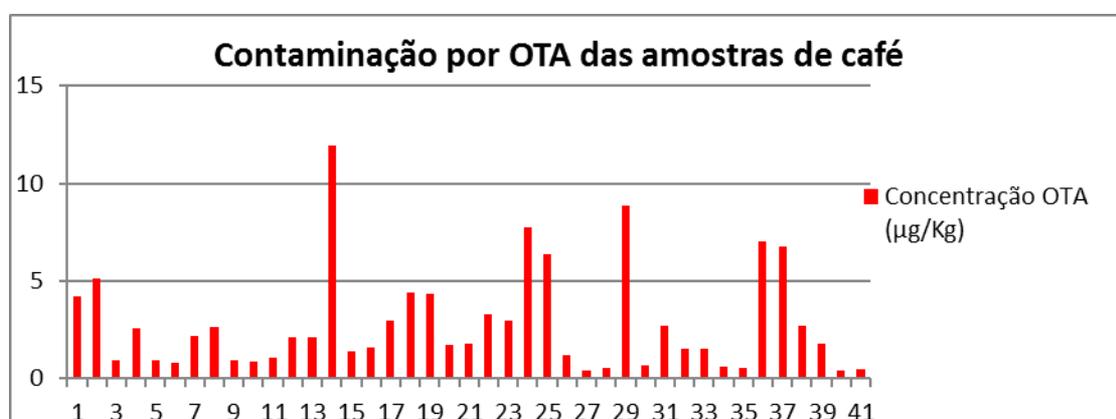
Tabela 6 - Resultados das amostras de café torrado analisadas

Amostras	Amostra Contaminadas por OTA ( $\mu\text{g Kg}^{-1}$ )		
	Total	Contaminadas	Média
56	41	0,54 - 11,97	2,94

Essas 56 amostras representam 33 marcas diferentes. Todas as embalagens foram avaliadas buscando obter informações sobre a região produtora do café. Apenas três embalagens continham essa informação que seria um dado a mais para ações de Vigilância Sanitária já que poderia ser feita uma relação dos dados do monitoramento com a região produtora. Essa correlação não pode ser feita devido a ausência desses dados nas embalagens.

Na figura 7 o gráfico apresenta os resultados obtidos das amostras de café torrado contaminadas por OTA em  $\mu\text{g/Kg}$ .

Figura 7: Gráfico com os resultados das amostras analisadas no monitoramento 2013/2014. .



Das três regiões de onde as amostras foram coletadas, a região Sul contribuiu com 75,0 % de amostras contaminadas, seguida da região Nordeste que contribuiu com 33,3 %. As amostras da região Norte tiveram a maior média de concentração que foi de  $3,71 \mu\text{g kg}^{-1}$  enquanto a região Nordeste apresentou uma média de  $1,05 \mu\text{g kg}^{-1}$ . Na tabela 7 consta os resultados obtidos em cada região de onde as amostras foram coletadas.

Tabela 7 - Resultado de cada região de onde foram coletadas as amostras.

Região	Total de amostras analisadas	% de Amostras contaminadas por OTA	Média da concentração ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Faixa de concentração ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )
Norte	29	70,0	3,71	ND (LD) – 11,97
Nordeste	3	33,3	1,05	ND (LD) – 1,05
Sul	24	75	2,72	ND (LD) – 8,84

No Brasil já foram realizados diversos estudos para avaliação e determinação de OTA em amostras de café torrado e moído. Prado e colaboradores avaliaram diferentes marcas de café torrado e moído e em café solúvel consumidos na cidade de Belo Horizonte/MG e obtiveram contaminação de OTA para o café torrado e moído na faixa de  $0,99 - 5,87 \mu\text{g kg}^{-1}$  com média de  $1,75 \mu\text{g kg}^{-1}$ . Leoni e colaboradores analisaram 132 amostras de café verde brasileiro e 27 estavam contaminadas por OTA com média de contaminação de  $7,1 \mu\text{g kg}^{-1}$ . Sabino e colaboradores analisaram 82 amostras de café instantâneo, 81 (98,8%) das amostras foram positivas para OTA, com a faixa de variação de  $0,17 - 6,29 \mu\text{g kg}^{-1}$ , usando a mesma metodologia para determinação e quantificação de OTA usada neste trabalho. Na tabela 8 encontra-se os resultados obtidos de monitoramentos e estudos no Brasil.

Tabela 8 - Incidência mundial de Ocratoxina A (OTA) em Café torrado

País	Nº positivas/amostras	Faixa de Conc. OTA ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Referências
Brasil	23/34	0,3 – 6,5	Leoni et al. (2000)
Brasil	41/47	0,99 – 5,9	Prado et al.(2000)
Brasil	18/29	0,65 – 5,7	INCQS/FIOCRUZ (2003)
Brasil	17/33	< 1 – 13,2	Moraes, et al.(2006)
Brasil	37/37	0,34 – 3,1	INCQS/FIOCRUZ (2013)

Na tabela 9 está descrita a incidência de contaminação por ocratoxina A no café torrado comercializado em diferentes países do mundo.

Tabela 9 - Incidência mundial de Ocratoxina A (OTA) em Café torrado

País	Nº positivas/amostras	Faixa de Conc. OTA ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Referências
Japão	58	3,2 – 17,0	<i>Tsubouchi et al. (1988)</i>
Reino Unido	17/20	0,2 – 2,1	Patel et al. (1997)
Europa	?/484	< 0,5 – 8,2	Van der Stegen et al. (1997)
Dinamarca	11/11	0,1 – 3,2	Jorgensen (1998)
Espanha	29/29	0,22 – 5,64	Burdespal e Legarda (1998)
Estados Unidos	9/13	0,1 – 1,2	Trucksess et al. (1999)
Alemanha	22/67	0,3 – 3,3	Wolff (2000)

Tabela 9 ( continuação) - Incidência mundial de Ocratoxina A (OTA) em Café torrado

Alemanha	273/490	0,21 – 12,1	Otteneder & Majerus (2001)
Canada	42/71	0,1 – 2,3	Lombaert et al. (2002)
Hungria	33/50	0,17 – 1,3	Fazekas et al. (2002)
Japão	3/9	0,11 – 0,33	Kumagai et al. (2008)
Japão	18/49	? – 2,75	Aoyama et al. (2010)

Fonte: CODEX ALIMENTARIUS, PATERSON, 2014.

Observando as tabelas que mostram monitoramentos realizados no Brasil e no mundo observamos que no Brasil poucos estudos foram realizados e se levarmos em conta o consumo e a importância econômica desse produto. Já em relação ao mundo observamos um maior número de estudos. No Brasil os estudos realizados também apresentaram um quantitativo que não ultrapassa 50 amostras e em muitos anos não foram realizados monitoramentos ou não foram publicados. No mundo o quantitativo de amostras dos estudos é maior, no entanto não foram realizados estudos em diversos anos. Observamos também tanto no Brasil quanto no mundo um percentual bastante significativo de amostras positivas em relação ao número de amostras analisadas.

Nos monitoramentos de 2003 e 2012 realizados neste Instituto as amostras não ultrapassaram o valor relativo ao LMT de  $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ . Porém nesse último monitoramento (2013/2014) foi possível observar um aumento da contaminação de café torrado por OTA tendo uma amostra apresentado contaminação acima do LMT. A diferença entre esse monitoramento para os demais realizados nesse instituto é a realização de um monitoramento que envolveu outros estados, sendo possível avaliar outras marcas de produtos não encontradas no mercado da região sudeste. Considerando estar a contaminação por micotoxinas relacionada com fatores climáticos essa pode ter sido a causa de uma maior frequência de contaminação do produto monitorado.

Como o nível seguro aceitável estimado pelo JECFA de ingestão de ocratoxina A é de 100 ng/peso corpóreo/semana, levando em consideração uma pessoa de 60

Kg essa ingestão máxima aceitável é de 857 ng por dia. Se considerarmos o consumo de quatro xícaras de café por dia (24g de café torrado e moído) e o valor médio de contaminação por OTA encontrado nesse estudo que é de 2,79 ng g<sup>-1</sup>, uma pessoa de 60 Kg estaria ingerindo por dia 67,0 ng de OTA o que corresponde a 7,9% de OTA do total preconizado pelo JECFA. Já se considerarmos a maior concentração encontrada que é de 11,97 ng g<sup>-1</sup> a ingestão corresponde a 287,3 ng de OTA por dia ou 33,5 %. Podemos concluir que a concentração OTA presente nas amostras de café torrado desse estudo não ultrapassa o valor aceitável definido pelo JECFA, mas vale ressaltar que o café não é a única fonte de OTA na dieta.

## 5 Conclusão

A técnica validada para obter a concentração de ocratoxina A em café torrado foi adequada para a análise, atendendo aos critérios de avaliação presentes nos documentos do INMETRO, IUPAC e CE.

Os resultados obtidos nesse monitoramento contribuirão para um panorama da real situação do Brasil a contaminação por OTA em café torrado e uma melhor avaliação da exposição do consumidor brasileiro a essa micotoxinas neste produto, uma vez que existem outras fontes que contribuem a ingestão de OTA.

Como as condições climáticas variam de ano para ano, é importante que os monitoramentos continuem sendo realizados para que se tenha uma avaliação da extensão da contaminação por OTA neste produto em todo o território nacional e para que ações de Vigilância Sanitária possam ocorrer para melhorar a qualidade desse produto, uma vez que a legislação para OTA no Brasil começou a vigorar somente em 2011.

## 6 Referências

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE INDÚSTRIAS DE CAFÉ (ABIC). Disponível em: [www.abic.com.br](http://www.abic.com.br). Acessado em Agosto de 2014.

Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists International (AOAC), Edited by Cunniff, 16<sup>th</sup> Ed, V.II, Chapter 49, p. 37-41, 1995.

Bennett, J. W.; Klich, M. Mycotoxins. **Clin. Microbiol. Rev.** v.16, n.3, p. 497–516, 2003.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL). Resolução nº 7, de 18 de fevereiro de 2011. Dispões sobre os limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. **Diário Oficial da União**. 9 março 2011. Seção 1:66.

CAMPOS, R. S., et al. Fungos Micotoxigênicos e ocratoxina A em cafés com permanência prolongada na planta e no solo, colhidos nas regiões do cerrado mineiro e baiano. **Coffee Science**, v. 4, n. 2, p. 136-148, Lavras, jul/dez, 2009.

CENTRO DO COMÉRCIO DE CAFÉ DO RIO DE JANEIRO (CCCRJ). **Revista do Café**. Ano 87 - Nº 828, Dezembro 2008. Disponível em: <http://www.cccrj.com.br>

CHALFON, S. M.; BATISTA, L. R. Incidência de ocratoxina A em diferentes frações de grãos de café (*Coffe arábica* L.). **Ciênc. Agrotec**, v. 31, n.3, p. 804-813, Lavras, maio/jun, 2007.

CHU, F. S. Imunoassays for analysis of micotoxins. **Journal of Food Prtotection**, Des Moines, v.47, p. 562-569, 1984.

CODEX ALIMENTARIUS. Código de prática, 2009 PREVENTION AND REDUCTION OF FOOD AND FEED CONTAMINATION 1st Edition, 2009.

CODEX ALIMENTARIUS, Joint FAO/WHO Food Standards Programme Codex Committee on Contaminants in Food. Discussion paper on Ochratoxin A in coffee. First Session, April 16-20, China, 2007

CODEX ALIMETARIUS, Joint FAO/WHO Food Standards Programme Codex Committee on Food Additives and Contaminants. Position Paper on Ochratoxin A. Thirty-first Session, March 22-26, 1999, The Hague, The Netherlands.

COMMISSION REGULATION. Commission Regulation (EC) n. 123/2005 of 26 January 2005 amending Regulation (EC) No 466/2001 as regards Ochratoxin A. **Official Journal of European Union**, L.25/3-L.25/5.,2005.

DUARTE, T. L. **Ocratoxina A em alimentos e bebidas: uma revisão bibliográfica**. 2010. Tese (Graduação em Engenharia de Alimentos – Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2010.

European Communities (EC). 2006. Commission Decision (EC) No. 401/2006 of February, 2006. Official Journal of the European Communities L70/12.

- FAZENKAS B., et al. Ochratoxin A contamination of cereals grains and coffee in Hungary in the year 2001. **Acta Veterinaria Hungarica**. v. 50, n. 2, p.177-188, 2002.
- FEIRE, F. C. O., et al. Micotoxinas: Importância na alimentação e saúde humana e animal. **EMBRAPA**, p. 24-25, 2007.
- FINK-GREMMELS, J.; JAHN, A.; BLOM, M. J. Toxicity and Metabolism of Ochratoxin A. *Natural Toxins*. New York, n.23, p.32-37, 2001.
- FUJII, S., et al. **Ocratoxina A em café: controle e metodologia analítica com ênfase a inovação no contexto de segurança alimentar**. Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 23, n.2, p.273-292, jul./dez. 2002.
- FURLANI, R. P. Z.; OLIVEIRA, P. L. C.; SOARES, L. M.V. **Incidência de ocratoxina A em café verde proveniente de várias regiões produtoras brasileira**. In: IX Encontro Nacional de Micotoxinas. Livro de Resumos. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Maio, 1998.
- GOLLUCKE, A. P. B., TANIWAKI, M. H., TAVARES, D. Q. Survey on Ochratoxin A in Brazilian Green Coffee Destined for Export. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 4, p. 641-645, out/dez. 2004.
- GOLLUCKE, A. P. B., TAVARES, D. Q. Efeito do processo sobre a ocratoxina A, em café, **Higiene Alimentar**, v. 18, n. 118, p. 38-46, 2004.
- GUIMARÃES, L. F. L.; COLLINS, C. H. Cromatografia líquida de alta eficiência. **Introdução a métodos cromatográficos**, p. 183-238, Campinas, 1993).
- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). 1993. Some naturally occurring substances: items and constituents, heterocyclic aromatics amines and mycotoxins. Lyon: IARC. **Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans** n. 56, p. 489-521.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Secretaria de Estado da Saúde. Secção de Química Biológica/Bioquímica. **Micotoxinas**, p.1-42, São Paulo, 1998.
- JIAO, Y. et al. Identification of ochratoxin A in food samples by chemical derivatization and gas chromatography-mass spectrometry. **J. Chromatogr. Sci**, v. 595, 363-367, 1992.
- JOINT FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS/WORLD HEALTH ORGANIZATION EXPERT COMMITTEE ON FOOD Additives (JECFA). 2001. **Safety evaluation of certain mycotoxins in food**. WHO Foods Additives series 47; FAO food and nutrition paper 74.
- KRUG, H. P. Cafés duros III. **Revista do Instituto do Café do Estado de São Paulo**, v. 15, n. 165, p. 1827-1831, Campinas, nov. 1940.

KRUGER, C. D. **Ocratoxina A em suínos abatidos no estado do Rio de Janeiro sob inspeção sanitária**, Tese (Pós Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal Fluminense. Niterói, Rio de Janeiro, 2006.

LARSEN, T. O.; SVENDSEN, A.; SMEDSGAARD, J. Biochemical characterization of ochratoxin A producing strains of the genus *Penicillium*. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 8, p. 3630-3635, 2001.

LEONI, L. A. B. Ochratoxin A in brazilian green coffee. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 21, n. 1, p. 105-107, jan.-abr. 2001.

MORAES, M. H. P., LUCHESE, R. H. Ochratoxin A on Green Coffee: Influence of Harvest and Drying Processing Procedures. **J. Agric. Food Chem.**, v. 51, p. 5824-5828, Brasil, 2003.

MORAES, M. H. P., et al. **Micotoxinas e Legislação**. Simpósio Brasil de Vigilância Sanitária – SIMBRAVISA. Florianópolis, Brasil. Nov., 2006.

MARTINS, D. O. **Use of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay (Elisa) for detection and quantification of ochratoxin A in green coffee**. In: International IUPAC Symposium on Mycotoxins and phycotoxins, Resumos, v. 10, p. 19, Guarujá, 2000.

MIRAGLIA, M.; BREBA C. Report on tasks for scientific co-operation “Assessment of dietary intake of Ochratoxin A by the population of EU Members States”, January , 2001.

MOSS, M. O. Mode of formation of ochratoxin A. **Food Additives and Contaminants**, London, v.13, p.5-9, 1996.

NOGUEIRA, S.; OLIVEIRA, M. B. P. P. Prevalência de Ocratoxina A em alimentos e consequentes problemas de segurança alimentar. **Alimentação humana**. v. 12. n.2, 2006.

ORGANIZAÇÃO INTERNACIONAL DE CAFÉ (OIC), Disponível em: [www.ico.org](http://www.ico.org). Acessado em: Dezembro/2014.

OTTENEDER, H.; MAJERUS, P. Ochratoxin A (OTA) in coffee: nation wide evaluation of data collected by German food Control. **Food Additives and Contaminants**. London, v.18, n.5, p.431-435, 2001.

PATEL, S., et al. Survey of ochratoxin A in UK retail coffee. **Food Addit. Contam.** n. 14, p. 217-222, 1997.

PATERSOM, M.; LIMA. N.; TANIWAKI, H. Coffee, mycotoxins and climate change. **Food Research International**. v. 61, p. 1-15, 2014.

PATIÑO, B., et al. Evaluation of growth and ochratoxin A producing by *Aspergillus steynii* and *Aspergillus westerdijkiae* in Green-coffee based medium under different environmental conditions. **Food Research International**, 61, p. 127-131, Spain, 2014.

- PETRACCO, M. **Melhoramento da Qualidade do Café pela Redução do Crescimento de Fungos**. In: Encontro Nacional de Micotoxinas. n. 9., Florianópolis, 1998.
- PITTET, A. et al. Liquid chromatographic determination of ochratoxin A in pure and adulterated soluble coffee using an immunoaffinity column cleanup procedure. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Easton, v. 44, p.3564-3669, 1996.
- PRADO, G. et al. Incidência de ocratoxina a em café torrado e moído e em café solúvel consumido na cidade de Belo Horizonte, MG, **Ciência Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 20, n. 2, p. 192-196, ago. 2000.
- RIBEIRO, E. A. R. **Contaminação Toxicológica de Resíduos Vitivinícolas – Ocratoxina A**. Tese (Mestrado em Engenharia do Ambiente). FEUP-Faculddae de Engenharia Universidade do Porto, 2007.
- SABINO, M. et al. Ochratoxin A in Brazilian Instant Coffee. **Brazilian Journal of Microbiology**, vol. 38, n. 2, São Paulo, Abril/Junho 2007.
- SEKIAMA, B. L., et al. Aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in maize-based food products. **Braz. J. Microbial**, v. 36, p. 289-294, 2005.
- SHARMAN, M.; MacDONALDS, S.; GILBERT. J Automated Liquid Cromatographic Detremination of Ochratoxin A in Cereals and Animal Products Using Immunoaffinity Column Clean-up. **Journal of Chromatography**, v. 603, p.285-289, Amsterdam, 1992.
- SOUZA, S. M. C.; CARVALHO, V. L. Efeitos de micro-organismos na qualidade da bebida do café. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.18, n.187, p.21-23, 1997.
- SCUSSEL, V. M. **Micotoxinas em alimentos**, Florianópolis: Insular, 1998.
- TANIWAKI, M. H., SILVA, N. Fungos em alimentos: ocorrência e detecção. **Núcleo de Microbiologia/ITAL**, 82p., 2001.
- TOLEDO, L. Os diferentes sabores e preços do café brasileiro. **Revista Exportar & Gerência**, Brasília, n. 20. P.18-24, maio 2000.
- Trucksess, M. W., et al. Determination and survey of ochratoxin A in wheat, barley and coffee. **J. Assoc. off Anal. Chem. Int.** n. 82, p. 85-89, 1999.
- URBANO G. R. et al,. Occurrence of ochratoxin A producing fungi in raw Brazilian coffee. **Journal Food Protection**, Des Moines, v. 64, n. 8, p. 1226-1230, 2001.
- VAN DER Stegen, et al. Screening of European coffee final products for occurrence of ochratoxin A (OTA) . **Food Addit. Contam.**, v. 14, n.3, 211-216, 1997.
- Velmourougane K, Panneerselvam P, Shanmukhappa DR, Srinivasan CS, Naidu R **Microbiological and biochemical aspects of robusta fermentation**. In: The proceedings of the 'International Scientific Symposium on Coffee', Bangalore, India, p. 172–178, 2000.