

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia

Leonardo Henrique Azevedo Tavares

OCORRÊNCIA DE OCRATOXINA A EM CAFÉ

Belo Horizonte
2011

Leonardo Henrique Azevedo Tavares

Ocorrência de ocratoxina A em café

Versão Final

Monografia de especialização apresentada ao Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Especialista em Microbiologia.

Orientador: Luiz Henrique Rosa

Belo Horizonte
2011

043

Tavares, Leonardo Henrique Azevedo.

Ocorrência de ocratoxina a em café [manuscrito] / Leonardo Henrique Azevedo Tavares. – 2011.

79 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Luiz Henrique Rosa.

Monografia apresentada ao Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Especialista em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. Ocratoxinas. 3. Fungos. 4. Café. 5. Poluentes Ambientais. 6. Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle. 7. Segurança alimentar. I. Rosa, Luiz Henrique. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 579



**Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia**

Às 16:00 horas do dia 24 de março de 2011, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG a Banca Debatedora constituída pelas Dras. Carla Pataro (UNIFENAS) e Susana Johann (Pós-doutoranda do Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG) e o Prof. Luiz Henrique Rosa- orientador, para avaliar a Monografia intitulada "Ocorrência de ocratoxina em café", do aluno Leonardo Henrique Azevedo Tavares. Após a apresentação oral pública seguida de uma argüição, o aluno foi APROVADO, considerando as sugestões feitas pela Banca debatedora. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata, que será assinada pelos membros participantes da Banca Debatedora. Belo Horizonte, 24 de março de 2011.

Dra. Carla Pataro

Dra. Susana Johann

Prof. Luiz Henrique Rosa

Profa. Erna Geessien Kroon
Coordenadora do Curso de Especialização em Microbiologia
ICB/UFMG

RESUMO

O café é um dos maiores geradores de riquezas do planeta. É responsável pela geração de empregos em todos os setores da economia. A produção brasileira de café é uma das maiores do mundo, respondendo por mais de um terço de toda a produção mundial. Além de ser um dos principais produtos agrícolas exportados pelo Brasil, o café é também uma das bebidas mais consumida no país, sendo assim um produto de grande importância em todos os segmentos da sociedade brasileira. As barreiras sanitárias, principalmente aquelas referentes aos contaminantes químicos como a ocratoxina A, são um dos maiores problemas da agropecuária brasileira. Tais contaminantes, muitas vezes silenciosos, estão cada vez mais presentes no dia a dia dos consumidores, em função da crescente e vertiginosa escala global de produção, comércio, distribuição e consumo de produtos e alimentos. A ocratoxina A quando presente acima de determinados níveis pode representar uma ameaça para a saúde humana e tornar-se uma barreira sanitária de grande impacto. Assim, para que o Brasil possa garantir a conformidade dos cafés comercializados internamente e dos cafés exportados é imperativo o envolvimento de toda cadeia produtiva cafeeira na implantação de uma política de boas práticas agrícolas (BPA) associada ao sistema de análise de perigos e pontos críticos de controle (APPCC) e o envolvimento dos órgãos públicos no monitoramento, através de análises laboratoriais, dos requisitos de identidade e qualidade do café como forma de obtenção de um produto sanitariamente seguro e livre de fraudes econômicas.

Palavras-chaves: ocratoxina A, fungos, café, contaminantes, boas práticas agrícolas, análise de perigos e pontos críticos de controle, segurança alimentar, qualidade.

ABSTRACT

Coffee is one of the biggest generators of wealth on the planet. It is responsible for generating jobs in all sectors of the economy. Brazilian coffee production is one of the largest in the world, accounting for more than a third of all world production. In addition to being one of the main agricultural products exported by Brazil, coffee is also one of the most consumed beverages in the country, thus being a product of great importance in all segments of Brazilian society. Sanitary barriers, especially those related to chemical contaminants such as ochratoxin A, are one of the biggest problems for Brazilian agriculture. Such contaminants, often silent, are increasingly present in the daily lives of consumers, due to the growing and dizzying global scale of production, trade, distribution and consumption of products and food. Ochratoxin A, when present above certain levels, can pose a threat to human health and become a major health barrier. Thus, in order for Brazil to guarantee the conformity of domestically traded coffees and exported coffees, it is imperative that the entire coffee production chain be involved in the implementation of a policy of good agricultural practices (BPA) associated with the hazard analysis system and critical points of control (APPCC) and the involvement of public agencies in monitoring, through laboratory analysis, the identity and quality requirements of the coffee as a way to obtain a sanitary product that is safe and free from economic fraud.

Keywords: ochratoxin A, fungi, coffee, contaminants, good agricultural practices, hazard analysis and critical control points, food safety, quality.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	7
1.1 Justificativa	10
2 OBJETIVOS	12
2.1 Objetivo geral	12
2.2 Objetivos específicos	12
3 METODOLOGIA	13
4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
4.1 Produção mundial de café	14
4.2 Cenário atual da cafeicultura brasileira	15
4.3 Maiores regiões produtoras de café no brasil	17
4.4 Histórico das micotoxinas	18
4.5 Características da ocratoxina A	19
4.6 Fungos produtores de ocratoxina A no café	20
4.7 Estudos sobre toxicidade	23
4.7.2 Nefrotoxicidade	23
4.7.3 Genotoxicidade	25
4.7.4 Teratogênese, mutagênese e carcinogênese	26
4.8 Principais fatores que influenciam na atividade de fungos produtores de OTA	27
4.8.1 Atividade de água (Aw)	27
4.8.2 Temperatura.....	28
4.9 Relação da qualidade da bebida do café e ocratoxina A	28
4.10 Influência da torrefação e do preparo da infusão nos níveis de OTA	29
4.11 Influência da radiação gama na microbiota fúngica de café	30
4.12 Avaliação da ingestão de OTA devido ao consumo de café	33
4.13 Identificação de Perigos e Pontos Críticos de Controle na cadeia produtiva do café	34
4.13.1 Limites Críticos.....	35
4.13.2 Ações Corretivas	35
4.13.3 Verificações e Registros.....	35
4.14 Princípios do Sistema APPCC aplicado ao processamento pós-colheita do café	36
4.15 Adequação às Boas Práticas Agrícolas	37
4.15.1 Boas Práticas Agropecuárias antes da Colheita	37
4.15.2 Boas Práticas Agropecuárias na Colheita	38
4.15.3 Boas Práticas Agropecuárias no Processamento Pós-Colheita	41
4.16 Manejo Integrado de Pragas	43
4.17 Metodologia analítica para determinação de ocratoxina A em café	46
4.18 Limites máximos permitidos de ocratoxina A em café	49
5 CONCLUSÃO	50
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
ANEXO A – FLUXOGRAMAS DE PRODUÇÃO	57
ANEXO B – FLUXOGRAMA DECISÓRIO PARA IDENTIFICAÇÃO DE PONTOS CRÍTICOS DE CONTROLE	58
ANEXO C - ANÁLISE DE PERIGOS	59
ANEXO D – DETERMINAÇÃO DOS PC/PCC	62
ANEXO E – RESUMO DO PLANO APPCC	64

ANEXO F – AVALIAÇÃO DA INGESTÃO DE OTA DEVIDO AO CONSUMO DE CAFÉ	67
ANEXO G – RESUMO DOS DOIS PRINCIPAIS MÉTODOS ANALÍTICOS PARA A OCRATOXINA A EM CAFÉ.....	68
ANEXO H – PRINCIPAIS MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE OCRATOXINA A EM CAFÉ.....	74

1 INTRODUÇÃO

O café é um produto de grande importância socioeconômica. Segundo Castilho (2001), de acordo com a *FAO (Food and Agriculture Organization)* a cafeicultura gera, nos países produtores, cerca de 25 milhões de empregos diretos no campo e 100 milhões no setor industrial, envolvendo o processamento, a comercialização, a torrefação e o transporte do café. Atualmente o Brasil é o maior produtor de café, respondendo por 39,6% da produção mundial de café dos tipos arábica e robusta. Somente na variedade café arábica, a produção brasileira atinge 48,6% da produção global, e em seguida a produção da Colômbia responde pela parcela de 10,5¹. O Brasil também é atualmente o segundo maior consumidor de café, ficando atrás apenas dos Estados Unidos. A produção brasileira, segundo dados da CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento) em 2010, é estimada em 47,02 milhões de sacas, 19,2% maior que o volume registrado na safra anterior. O estado de Minas Gerais é o maior produtor no Brasil e responde por 50,9% da produção nacional, equivalente a 23,94 milhões de sacas de 60 kg. Sabe-se, atualmente, que cerca de 25% de todos os produtos agrícolas produzidos no mundo estão contaminados com alguma micotoxina. O Brasil, a exemplo de outros celeiros mundiais, deverá enfrentar, em breve, dificuldades cada vez maiores para exportação de seus produtos agrícolas.

As micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por uma variedade de fungos, especialmente por espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*. Na posição de um dos países líderes na produção de alimentos agrícolas e de *commodities*, o Brasil possui condições ambientais excelentes para o crescimento de todos esses fungos micotoxigênicos. No caso específico do café, a micotoxina mais importante é a ocratoxina A (OTA), produzida por fungos do gênero *Aspergillus* (regiões tropicais) e *Penicillium* (regiões temperadas). A OTA é de grande importância na saúde pública devido a suas propriedades carcinogênicas, nefrotóxicas, teratogênicas, imunotóxicas e provavelmente neurotóxicas (KUIPER-GOODMAN, 1996; HEILMANN *et al.*, 1999; MANTLE & CHOW, 2000; PETZINGER & ZIEGLER, 2000). Os primeiros relatos de contaminação por OTA associaram a micotoxina à presença de *Aspergillus ochraceus* (LEVI *et al.* 1974). Estudos

¹ <http://www.cncafe.com.br/capa.asp?id=10334>

recentes avaliando a ocorrência e a distribuição de fungos toxigênicos da colheita à secagem do café, constataram que *A. ochraceus* foi a espécie mais relevante para a produção de OTA (TANIWAKI *et al.*, 2003). Embora prescindam de estudos adicionais, outras pesquisas vêm indicando que *A. carbonarius* e *A. niger* são fontes potenciais de produção de OTA em café (MISLEVIC *et al.*, 1983; TÉREN *et al.*, 1997; BUCHELI *et al.*, 2000; JOOSTEN *et al.*, 2001; URBANO *et al.*, 2001).

Independentemente da região e da espécie cultivada, as informações disponíveis demonstram que as condições impróprias de colheita, a precariedade dos sistemas de secagem e a inadequação dos sistemas de armazenamento são fatores relevantes no processo de contaminação de café por OTA (URBANO *et al.*, 2001). A Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle – APPCC, conhecida internacionalmente como HACCP, é um sistema de controle recomendado pela FAO, cujos princípios baseiam-se na determinação e avaliação sistemática dos perigos nos alimentos, mediante a identificação dos Pontos Críticos de Controle (PCC) e a adoção de medidas para controlá-los (FRANK, 1999; FRANK & FRISVARD, 1999; CASTILHO, 2001; CORRÊA & SILVA, 2002; MABBET, 2002). A utilização do sistema APPCC pelo setor cafeeiro depende de um completo entendimento do sistema de produção, mediante o estabelecimento de um modelo prévio, que requer o amplo conhecimento sobre os métodos e parâmetros de processamento, aspectos biológicos e as interações entre os diversos componentes do sistema. Para atingir tais objetivos, os segmentos envolvidos no agronegócio do café, juntamente com a FAO e a OIC (Organização Internacional do Café) vêm investindo nos últimos cinco anos, cerca de 6 bilhões de dólares em projetos de melhoria da qualidade do café, enfocando sobretudo a redução dos índices de contaminação por OTA, que é o grande desafio a ser vencido pelos países produtores (MABBET, 2002; OIC, 2004).

Atenta e este contexto de crescente preocupação com a segurança alimentar e exigência cada vez maiores dos países importadores de café, em 26 de janeiro de 2005, a União Europeia juntamente com a Organização Internacional do Café, publicaram o Regulamento da Comissão Europeia (CE) N° 123/2005, no qual foram fixados limites máximos de OTA no café torrado e moído e no café solúvel, com a intenção de reexaminar a legislação com o objetivo de estabelecer limites para o café verde até o fim de 2006 (OIC, 2005). Os países produtores de café da OIC, no entanto, consideraram que a introdução de tais limites para o café verde não se

justificava e constituiria uma barreira técnica não-tarifária, desproporcional aos objetivos de assegurar a saúde pública. Entretanto, em 2007, a OIC publicou um documento sobre a revisão do Regulamento da CE N° 1881/2006, fixando limites máximos para a presença de ocratoxina A e outros contaminantes nos gêneros alimentícios, que entrou em vigor em 1º de março de 2007. No caso do café torrado e do café solúvel, respectivamente, não foram alterados os limites máximos de 5 e 10 ppb para o teor de OTA, não havendo, contudo, limites em relação ao café verde. Convém notar que a situação do café verde continua em exame e que existe a orientação para a comunicação anual da ocorrência da OTA, e medidas de prevenção.

A Autoridade Europeia de Segurança dos Alimentos (EFSA), por meio de estudos recentes, relatou que cada europeu adulto está exposto, em média, a níveis entre 5 e 60 ng/Kg de massa corpórea (EFSA, 2006). Essa mesma autoridade indica ainda que o valor máximo de ingestão semanal deve ser de 120 ng/kg de massa corpórea (EFSA, 2006). Em 21 de dezembro de 2009, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) publicou a proposta de regulamento técnico de limites máximos tolerados de micotoxinas em alimentos (Consulta Pública N° 100) com o objetivo de estabelecer os limites máximos das aflatoxinas, ocratoxina A, desoxinivalenol (DON), fumonisinas (B1 + B2) e patulina, admissíveis em alimentos, bem como os planos de amostragem e métodos de análise correspondentes. No caso do café torrado e moído e do café solúvel os limites máximos estabelecidos para a OTA foi de 10 µg/kg. Considerando as legislações atuais, os níveis da exposição de OTA em café não oferecem risco ao consumidor, desde que estejam dentro do limite tolerável.

1.1 Justificativa

O café é reconhecido mundialmente pela grande receptividade que tem sua bebida, sendo considerado um dos produtos de maior comercialização no mercado internacional. Este grão possui particular importância para o Brasil, pois seu cultivo e industrialização geram um grande número de empregos e divisas para o país. Ainda hoje, o Brasil é reconhecido como um dos maiores produtores e exportadores de grãos de café e de café processado. Hoje, o Brasil objetiva se manter como principal produtor mundial, melhorar a qualidade de seus produtos e aumentar a sua participação no mercado internacional de café torrado e moído. Porém a oferta de cafés de má qualidade, com alta concentração de defeitos, e procedimentos operacionais inadequados ainda fazem parte de uma realidade a ser vencida. A qualidade do café vem sendo o tema de esforços de âmbito nacional na tentativa de tornar o produto brasileiro mais competitivo frente a países como Colômbia e Vietnã.

As micotoxinas são contaminantes naturais produzidas por fungos que são ubíquos; e o homem sempre esteve exposto a estes metabólitos em sua dieta. Os fungos, como todos os organismos heterotróficos, precisam de água e de certos nutrientes essenciais para viver. A OTA, micotoxina com ação nefrotóxica e carcinogênica, produzida principalmente por algumas espécies de *Aspergillus* e *Penicillium*, representa uma barreira comercial em produtos alimentícios, principalmente o café. As micotoxinas têm atraído a atenção mundial também por causa dos prejuízos econômicos significativos associados com o seu impacto na saúde humana, animal e produtividade tanto no comércio nacional e internacional. Segundo estimativas da FAO, as perdas mundiais de alimentos devido às micotoxinas estão na faixa de 1000 milhões de toneladas por ano. A maioria das micotoxinas é quimicamente estável, por isso elas tendem a sobreviver no armazenamento e processamento, mesmo quando mantidas a temperaturas bastante elevadas.

Estratégias eficientes de controle da presença de OTA em café devem ser adotadas, por representarem entraves na comercialização desse produto e também por colocarem em risco a saúde dos consumidores. Nesse sentido, os mercados importadores estão cada vez mais exigentes, reduzindo os níveis de tolerância de OTA (COMUNIDADE EUROPEIA, 2005; FURLANI & SOARES, 1999). Atualmente os países membros da Comunidade Europeia toleram níveis de contaminação por

ocratoxina A em café cru que variam entre 5 e 20 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (FAO, 2008). Os níveis de tolerância variam conforme o país importador. A Itália, por exemplo, é o mais exigente, adotando o limite mínimo. Esses valores obrigam os países exportadores a adotarem medidas, cada vez mais eficazes, de controle de qualidade de seus produtos, garantindo desse modo a sua presença no competitivo mercado internacional.

Vários estudos têm sido realizados em diversos países produtores de café, visando identificar os principais fungos produtores de micotoxinas, focos de contaminação, fatores que influenciam a susceptibilidade dos grãos a contaminação e o monitoramento de fatores durante a colheita e processamento destes produtos que possam contribuir para a proliferação de tais microrganismos. Dentro desse contexto, as variáveis que afetam a produção destes fungos devem ser monitoradas e seus limites críticos estabelecidos. Para isso, devem-se utilizar os sete princípios da APPCC para a determinação dos pontos críticos de controle e a elaboração do plano. Na busca de informações que possam subsidiar a adoção, pela cadeia agroprodutiva do café, de sistemas de controle reconhecidamente eficientes, torna-se relevante o papel das universidades e instituições de pesquisa na realização de estudos aplicados à realidade da cafeicultura nacional.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Realizar uma revisão bibliográfica para caracterização e prevenção da contaminação do café com fungos toxigênicos e ocratoxina A ao longo da cadeia agroindustrial do café.

2.2 Objetivos específicos

- Conscientizar os órgãos envolvidos no setor cafeeiro da necessidade de prevenir a contaminação do café por fungos;
- Comparar a presença da Ocratoxina A com a qualidade do café.
- Verificar o efeito da irradiação gama (60 Co) em controlar a microbiota natural bem como a ocratoxina A no café;
- Caracterizar a estabilidade da ocratoxina A nas diversas etapas de torração do grão de café além de estudar sua estabilidade no preparo da infusão, em diferentes condições;
- Apresentar as metodologias analíticas de ocratoxina A em café;
- Listar fungos produtores de OTA e identificar os fatores que favorecem a proliferação dos fungos;
- Apontar os Pontos Críticos de Controle (PCCs) e investigar os riscos potenciais em toda a cadeia de produção de café;
- Propor um Plano de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle na Cadeia Produtiva do Café;

3 METODOLOGIA

A metodologia deste trabalho consistiu da realização de um levantamento bibliográfico em bases de dados, tais como Periódicos do Portal Capes, *PubMed*, Biblioteca do Café da Embrapa e sites de universidades e de associações e organizações relacionadas ao setor cafeeiro como a *International Coffee Organization* (ICO), Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) e a *Food and Agriculture Organization* (FAO) entre outros sobre a ocorrência de micotoxinas em café, especialmente a ocratoxina A em estudos realizados a nível nacional e mundial e as formas de controle para minimizar os riscos causados por essa micotoxina.

Foram pesquisados artigos científicos, teses de mestrado e doutorado sobre o assunto e os seguintes termos foram utilizados como palavras-chaves: fungos, *fungi*, micotoxinas, ocratoxina A (OTA), Boas Práticas Agrícolas e café, *coffee*, Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) em café torrado e moído, Manejo Integrado de Pragas, *Penicillium nordicum*, *P. verrucosum*, *Aspergillus ochraceus*, *A. carbonarius* e *A. niger*. Também foram pesquisados dados sobre o cenário atual da cafeicultura brasileira destacando as maiores regiões produtoras de café do Brasil e os maiores produtores mundiais de café.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 *Produção mundial de café*

O Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) divulgou, em junho de 2010, estimativa de que a produção mundial de café será de 139,7 milhões de sacas na safra 2010/11. A Organização Internacional do Café (OIC), contudo, prevê colheita menor, ficando em 135 milhões de sacas. Na previsão anterior, o USDA tinha apresentado um número mais baixo, de 134 milhões de sacas. O cálculo atual desse organismo internacional para a produção brasileira é de 55,3 milhões de sacas, mais de 8 milhões acima dos números da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB). Conforme o USDA, o ciclo atual será 11% superior ao 2009, quando a safra mundial do grão atingiu a 127,443 milhões de sacas, redução de 5,4% em relação à de 2008, que foi de 134,768 milhões de sacas.

Com uma demanda mundial de 135 milhões de sacas, a produção atenderia a esse volume pelos números da OIC e, pelos do USDA, haveria sobra.

O crescimento internacional do consumo tem sido entre 2% e 2,5% ao ano e, nos últimos cinco anos, os estoques ficaram reduzidos. Em 2003/04, os estoques globais iniciais eram de 48,809 milhões de sacas e, em 2009/10, baixaram para 40,063 milhões de sacas, o que representa queda de 18%. Na safra anterior a reserva havia sido ainda menor: 37,729 milhões de sacas.

Além da elevação do consumo, tradicionais produtores de café tiveram redução de suas safras no último ano devido a problemas climáticos. A Colômbia, que aparecia como segundo maior produtor, depois do Brasil, perdeu essa posição para o Vietnã e foi ultrapassada ainda pela Indonésia, em razão da queda da sua produção nas temporadas 2008 e 2009 em relação a períodos anteriores.

Em 2009, foi levemente superior a 2008, mas bem abaixo das colheitas de 2007, 2006 e 2005, que ficaram acima das 12,5 milhões de sacas. Em 2008 o país colheu 8,664 e, em 2009, 9,5 milhões de sacas, de acordo com a OIC.

Essa conjuntura favorece o Brasil, que está colhendo uma safra expressiva em razão da biannualidade positiva e de condições climáticas favoráveis. Segundo a CONAB, o País produzirá 47,042 milhões de sacas, com aumento de 19,2% em relação ao ano anterior, o que corresponde a 7,57 milhões de sacas a mais.

No total são 55 países que plantam café no mundo. Os 20 maiores produtores (Tabela 1) são responsáveis por 95% da oferta, ou seja, 117,676 milhões de sacas. Os outros 35 respondem pelos 7,388 milhões de sacas restantes na temporada 2009. Entre os 20, Vietnã, Tailândia e Costa do Marfim cultivam apenas robusta; oito somente arábica (Colômbia, Costa Rica, El Salvador, Etiópia, Honduras, México, Nicarágua e Peru); e os demais, os dois tipos de café.

Tabela 1. 20 Maiores produtores mundiais de café (em mil sacas)

Países	2004	2005	2006	2007	2008	2009
Brasil	39.772	32.944	42.512	36.070	45.992	39.470
Vietnã	14.370	13.842	19.340	16.467	18.500	18.000
Indonésia	7.536	9.159	7.483	7.777	9.350	11.500
Colômbia	11.573	12.564	12.541	12.504	8.664	9.500
Etiópia	4.568	4.003	4.636	4.906	4.350	4.850
Índia	4.592	4.396	5.159	4.460	4.372	4.827
México	3.867	4.225	4.200	4.150	4.651	4.500
Guatemala	3.703	3.676	3.950	4.100	3.785	4.000
Peru	3.425	2.489	4.319	3.063	3.872	3.850
Honduras	2.575	3.204	3.461	3.842	3.450	3.650
Uganda	2.593	2.159	2.700	3.250	3.200	3.000
Costa do Marfim	2.301	1.962	2.847	2.590	2.353	1.850
Nicarágua	1.130	1.718	1.300	1.700	1.615	1.700
Costa Rica	1.887	1.778	1.580	1.791	1.320	1.659
El Salvador	1.437	1.502	1.371	1.621	1.547	1.135
Tanzânia	763	804	822	810	1.186	875
Venezuela	1.327	1.506	1.571	1.520	930	850
Papua Nova Guiné	998	1.268	807	968	1.028	835
Camarões	727	849	836	795	750	825
Tailândia	884	999	766	653	675	800
Subtotal	109.528	105.047	119.354	113.045	121.590	117.676
Outros	6.534	6.416	9.784	6.351	6.392	7.338
Produção Mundial	116.062	111.463	129.138	119.396	128.183	124.064

Fonte: OIC, 2010

4.2 Cenário atual da cafeicultura brasileira

A estimativa da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), divulgada em maio de 2010, aponta para crescimento de 19,2% em relação à temporada 2009, alcançando a 47,042 milhões de sacas de 60 Kg. O resultado do período significa incremento de 7,57 milhões de sacas em relação às 39,47 milhões obtidas no ciclo anterior. Segundo a CONAB, o maior acréscimo deve ocorrer na colheita do arábica, estimada em 35,307 milhões de sacas, o que representa ganho de 6,440 mil sacas, ou 22,3%, sobre o período anterior, que foi de 28,9 milhões de sacas. Esse tipo de grão representa 75,1% do total nacional.

A produção de robusta, que significa 24,9% da safra brasileira, deve atingir a 11,735 milhões de sacas, alta de 10,7%, o equivalente a 1,130 mil sacas. A área cultivada com o grão cresceu 32 mil hectares (1,5%), saindo de 2,09 milhões de ha no ciclo passado para 2,12 milhões de ha na temporada atual. A produtividade é calculada em 22,14 sacas por ha.

O resultado da safra poderia ter sido maior não fosse a inversão climática — estiagem acompanhada de altas temperaturas — ocorrida a partir da segunda quinzena de dezembro de 2009, notadamente no Espírito Santo; nas regiões da Zona da Mata, de Rio Doce e Jequitinhonha, em Minas Gerais; e na região Atlântico, na Bahia. A situação causou perdas expressivas na produção, compensadas, em parte, pelos ganhos registrados nas regiões Sul e Centro-Oeste de Minas Gerais e nas áreas irrigadas do Estado da Bahia, principalmente no Oeste.

A qualidade do café não vai acompanhar os bons resultados da safra 2010. Devido às adversidades climáticas, os arbustos do tipo arábica tiveram de três a quatro floradas, o que prejudicou a uniformidade de tamanho e o amadurecimento dos grãos. Em uma mesma planta podiam ser encontrados, no início da colheita, frutos que vão do verde ainda em formação ao maduro e seco. Além disso, o excesso de chuvas provocou maior incidência de doenças, como cercosporiose, antracnose e outros fungos que afetam a qualidade. A estiagem nos meses de dezembro a março levou à má formação de frutos, com grãos mais leves e queimados e com elevada porcentagem de chochamento, de acordo com informações da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB). Com tudo isso, haverá diminuição dos cafés finos e aumento dos de varreção.

A estiagem e as altas temperaturas na fase de enchimento de grãos, durante a segunda quinzena de dezembro e a segunda quinzena de março, afetaram também a região de conilon no Espírito Santo. Houve redução de, pelo menos, 735

mil sacas na produção. Os prejuízos não foram maiores porque o cafeicultor realizou os tratos culturais, envolvendo adubação, poda, desbrota e controle adequado de ervas daninhas e, nas lavouras novas, utilizou materiais genéticos com maior potencial produtivo. Assim, o rendimento previsto é de 28,07 sacas por hectare.

4.3 Maiores regiões produtoras de café no Brasil

Metade do café colhido no Brasil tem uma origem: Minas Gerais. O estado segue como o maior produtor nacional e responde por 50,9% do volume total do país. Dados de maio da CONAB estimam a safra 2010 em 23,944 milhões de sacas de 60 kg, das quais 98,9% são de arábica. Quando comparado às temporadas de 2009 e 2008, o cálculo representa incremento de 20,44% e 1,5%, respectivamente. O início do período chuvoso, a partir de setembro de 2009, favoreceu o desenvolvimento vegetativo e produtivo das lavouras, contribuindo para o crescimento e o enchimento dos frutos. No entanto, nas regiões da Zona da Mata, de Rio Doce e do Jequitinhonha uma forte estiagem, acompanhada de altas temperaturas ao longo dos meses de janeiro e fevereiro, período no qual ocorre o crescimento dos grãos, prejudicou os cafezais localizados nas regiões mais baixas e quentes, notadamente as mais novas e mal-nutridas. Além disso, chuvas extemporâneas no inverno de 2009 provocaram a abertura de multifloradas, causando a formação de frutos desuniformes nas diversas regiões produtoras do estado, afetando a qualidade final do café.

Em segundo lugar no *ranking* nacional está o Espírito Santo, com 23,4% da colheita e predomínio de robusta. A safra está prevista em 11,031 milhões de sacas de café beneficiado, sendo 8,144 milhões de sacas de conilon (74%) e 2,887 milhões de arábica (26%). A seca e as altas temperaturas durante a segunda quinzena de dezembro e a segunda quinzena de março, justamente na fase de enchimento de grãos, atingiram a maior parte das lavouras do Sul do estado e aquelas localizadas em terrenos mais arenosos, gerando perda de 735 mil sacas.

O estado de São Paulo é o terceiro produtor brasileiro com estimativa de obter 4,36 milhões de sacas, 27,2% superior ao volume da temporada anterior, que foi de 3,423 milhões de sacas. O incremento deve-se à biannualidade positiva, aliada ao excelente desenvolvimento vegetativo das lavouras e do emprego da tecnologia recomendada na maioria dos cinturões de plantio. Em razão disso, a qualidade do

café será boa. O quarto, o quinto e o sexto maiores pólos cafeeiros têm desempenhos semelhantes. A Bahia deverá produzir 2,321 milhões de sacas, 23,9% a mais que em 2009. Do total, 1,822 milhão de sacas são de arábica e 498,5 mil sacas são de conilon. O Estado contou com chuvas regulares no mês de novembro, situação que proporcionou floradas dentro da normalidade. No período de dezembro a fevereiro, contudo, ocorreram estiagens que afetaram mais duramente a região de conilon.

Rondônia vai colher 2,192 milhões de sacas, resultado 41,7% superior, e o Paraná, 2,110 milhões. A boa situação climática favoreceu Rondônia com chuvas nos estágios de floração, paralelamente à incorporação de novas áreas. No Paraná, o clima atípico no inverno provocou floradas irregulares, compensadas pela regularidade no regime de chuvas nas principais regiões produtoras a partir de novembro.

4.4 Histórico das micotoxinas

Há muito tempo é conhecido que a ingestão de alguns cogumelos (macrofungos) pode apresentar sérios riscos à saúde humana. Entretanto, apenas mais recentemente é que se confirmou que metabólitos produzidos por fungos filamentosos, ao entrarem na cadeia alimentar, têm sido responsáveis por verdadeiras epidemias em humanos e animais. O caso mais conhecido é o do ergotismo, que foi responsável pela morte de milhares de pessoas na Europa, no milênio passado (MATOSSIAN, 1981). Outros surtos relatados incluem a aleuquia alimentária tóxica (ATA), que matou cerca de 100 mil russos entre 1942 e 1948 (JOFFE, 1978); a *stachybotryotoxicose*, que matou milhares de cavalos, também na Rússia, em 1930 (MOREAU, 1979) e a aflatoxicose que matou 100 mil perus jovens no Reino Unido, em 1960, sendo também responsabilizada pela morte de outros animais e até, provavelmente, de humanos (RODRICKS et al., 1977; PITT e HOCKING, 1986). Em dois estados vizinhos, no noroeste da Índia, em 1974, foi confirmado um surto de aflatoxina B1 em 397 pessoas, após a ingestão de milho contaminado e cerca de 100 pessoas morreram. Outro surto devido à ingestão de alimento contaminado com aflatoxina B1 foi verificado no Quênia, em 1982, quando 20 pessoas adoeceram e 12 delas morreram. Entretanto, até o momento não

existem relatos de surtos causados por aflatoxinas ou qualquer outra micotoxina no Brasil (MANUAL, 2007).

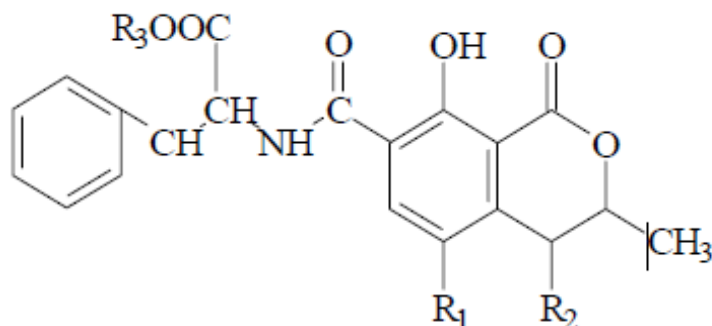
Micotoxinas afetam o agronegócio de muitos países, interferindo ou até mesmo impedindo a exportação, reduzindo a produção animal e agrícola e, em alguns países, afetando, também, a saúde humana (JELINEK et al., 1989; MILLER, 1995; LEUNG et al., 2006). Cálculos confiáveis demonstram que aproximadamente 25 a 50% de todas as *commodities* produzidas no mundo, especialmente os alimentos básicos, estão de alguma forma contaminadas com micotoxinas (BHAT e MILLER, 1991; MANNON e JOHNSON, 1985). Nos países em desenvolvimento, o problema é ainda mais sério. Como os produtos de boa qualidade são normalmente exportados, aquelas *commodities* de qualidade inferior, as quais apresentam níveis de micotoxinas superiores aos permitidos nos países importadores, são vendidas e consumidas no mercado interno, com riscos evidentes para a saúde da população (DAWSON, 1991).

As micotoxinas podem entrar nas cadeias alimentares, humana e animal, por meio de contaminação direta ou indireta. A contaminação indireta de alimentos e rações ocorre quando um ingrediente qualquer foi previamente contaminado por um fungo toxigênico; e mesmo que o fungo tenha sido eliminado durante o processamento, as micotoxinas ainda permanecerão no produto final. A contaminação direta, por outro lado, ocorre quando o produto, alimento ou ração, se torna contaminado por um fungo toxigênico, com posterior formação de micotoxinas. Sabe-se que a maioria dos alimentos e rações pode permitir o crescimento e o desenvolvimento de fungos toxigênicos, tanto durante a produção, quanto durante o processamento, transporte e armazenamento (FRISVAD e SAMSON, 1992). A ingestão de micotoxinas por seres humanos ocorre principalmente pela ingestão de produtos vegetais contaminados, bem como pelo consumo de produtos derivados dos alimentos, tais como leite, queijo, carnes e outros produtos animais (SMITH et al., 1995).

4.5 Características da ocratoxina A

A ocratoxina A (OTA) foi descoberta em 1965, na África do Sul, como um metabólito de *Aspergillus ochraceus* durante estudos que objetivavam descobrir novas moléculas tóxicas produzidas por fungos (VAN DER MERWE et al., 1965). A

OTA apresenta estrutura química semelhante à das aflatoxinas, sendo representada por uma isocumarina substituída, ligada a um grupo L- fenilalanina (Fig. 1).



	R ₁	R ₂	R ₃
Ocratoxina A	Cl	H	H
Ocratoxina B	H	H	H
Éster etílico da ocratoxina A (ocratoxina C)	Cl	H	CH ₂ CH ₃
Éster metílico da ocratoxina A	Cl	H	CH ₃
Éster etílico da ocratoxina B	H	H	CH ₂ CH ₃
Éster metílico da ocratoxina B	H	H	CH ₃
4-hidroxi-ocratoxina A	Cl	OH	H

Figura 1. Estrutura das Ocratoxinas

Fonte: FURLANI; SOARES, 1999.

Nem todos os isolados de *A. ochraceus* são capazes de produzir ocratoxina A. Além dessa espécie, também *Aspergillus alliaceus*, *A. auricomus*, *A. carbonarius*, *A. glaucus*, *A. meleus* e *A. niger*, além de *Penicillium nordicum* e *P. verrucosum*, são produtores de OTA (CIEGLER et al., 1972; PITT, 1987; CHU, 1974; ABARCA et al., 1994; LARSEN et al., 2001; BAYMAN et al., 2002). Como *Aspergillus niger* é uma espécie utilizada amplamente na indústria para a produção de enzimas e ácido cítrico para o consumo humano, é importante se certificar que as linhagens industriais não sejam produtores de OTA (HEENAN et al., 1998; TERENCE et al., 1996).

4.6 Fungos produtores de ocratoxina A no café

Das espécies de *Penicillium*, *P. Verrucosum* é o maior produtor de OTA em climas temperados. Em climas quentes e tropicais, as espécies de *Aspergillus* tem sido mais relacionados com a produção de OTA (CABRERA, 2005). Para o café, três espécies ou grupos de espécies, todas do gênero *Aspergillus* (Figura 2), têm uma

maior significância². A espécie *A. niger* é de longe o mais comum, especialmente em *Coffea canephora* (robusta), mas a produção de OTA é rara e geralmente fraca. Um estudo revelou apenas um produtor entre os setenta isolados testados. A ocorrência de *A. carbonarius* (Figura 3) geralmente é rara, mas há alguns indícios de que pode ser relativamente comum em determinadas localidades. A maioria dos isolados parecem ser capazes de produção de OTA em quantidades significativas, embora em uma gama restrita de condições ambientais. *A. ochraceus* (Figura 4) e fungos relacionados estão bem distribuídos em sistemas de produção de café e produção de OTA, porque é comum (cerca de 80% dos isolados facilmente produzem OTA), e compreende as mais importantes espécies produtoras de OTA no café. *A. ochraceus* já foi chamado de *A. alutaceus* por SAMSON & GAMS (1985), contudo mais recentemente, houve um acordo de que o nome mais apropriado para esta espécie é *A. ochraceus* (PITT & SAMSON, 2007).

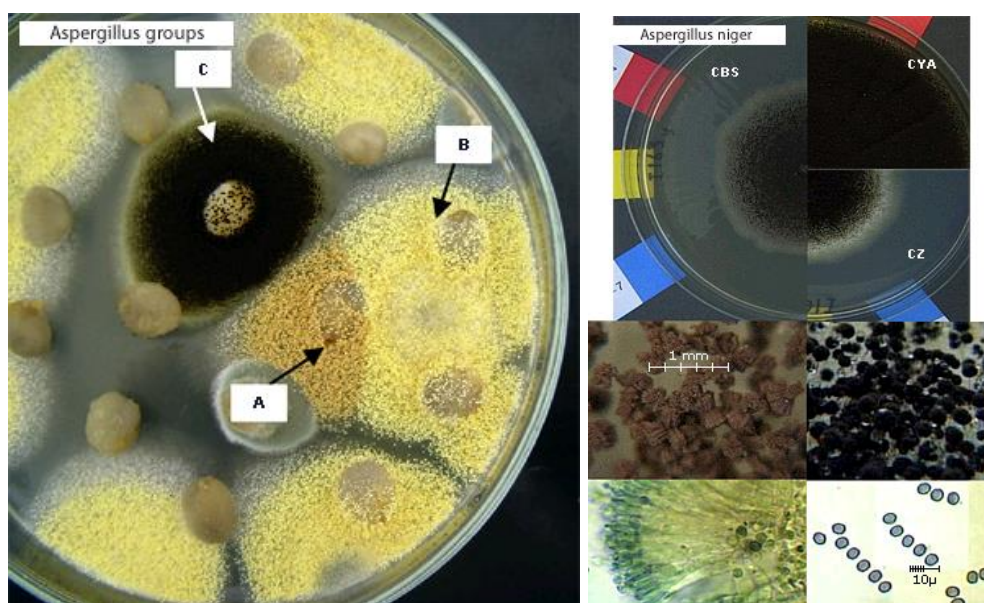


Figura 2. Gênero *Aspergillus*: A) Colônia de *Aspergillus ochraceus*; B) Colônia de *Aspergillus sulphureus*. C) Colônia de *Aspergillus niger*. (esq.) *Aspergillus niger* em três meios: CBS, a malt extract recipe; CZA, Czapek Yeast extract agar; CZ, Czapek Solution Agar após 7 dias a 25°C (dir.)

Fonte: Ludwig Pfenning, John Frank, 2010.

² http://www.coffee-ota.org/otacoffee_what.asp



Figura 3. Fungos da espécie *Aspergillus carbonarius* (esq.) e *Aspergillus carbonarius* – conidióforos (direita).

Fonte: John Frank, 2010

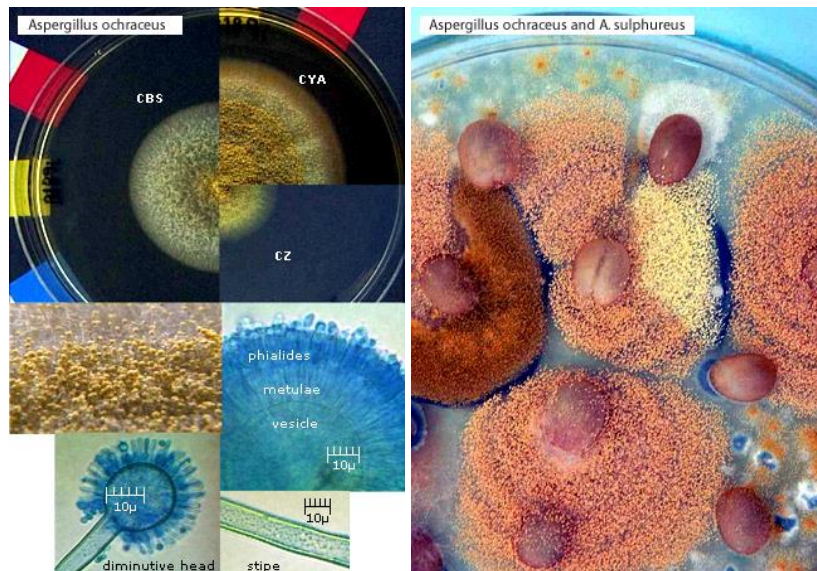


Figura 4. *Aspergillus ochraceus* em três meios: CBS, a malt extract recipe; CYA, Czapek Yeast extract agar; CZ, Czapek Solution Agar após 7 dias a 25°C. (esq.) e *Aspergillus ochraceus* e *Aspergillus sulphureus* - colônias em meio DG18 (dir.).

Fonte: John Frank; Ludwig Pfenning, 2010.

A primeira referência de OTA em café foi de Levi *et al.* (1974), que detectaram níveis de até 360 ppb em sacas de café com alta incidência fúngica; entretanto, apenas traços de micotoxinas foram detectados em lotes comerciais. A contaminação do café por OTA tem se mostrado um problema essencialmente no processamento pós-colheita. Controlar adequadamente a umidade no café durante o manuseio pós-colheita do café é a melhor maneira de evitar a contaminação pela

OTA uma vez que essa quantidade de água disponível pode favorecer o desenvolvimento de fungos e a contaminação por micotoxinas.

4.7 Estudos sobre toxicidade

4.7.1 Imunosupressão

Haubeck et al. (1961) relataram o forte efeito imunossupressor de OTA na indução da resposta imune em camundongos após injeção intraperitoneal de 0,005 µg/kg corpóreo. Os animais receberam a dose de OTA acompanhada ou não de fenilalanina. Nos camundongos que receberam OTA e fenilalanina na concentração 1:2 não ocorreu efeito imunossupressor. Creepy et al. (1983) relataram o efeito imunossupressor em ratos de dois metabólitos de OTA: (4R)-4-hidróxi-ocratoxina A e ocratoxina A α. O metabólito (4R)-4-hidróxi-ocratoxina A demonstrou ser quase tão ativo quanto OTA como imunossupressor causando 80% de redução das células produtoras de imunoglobulina M (one 90% da redução foi causada pela OTA) e 93% de redução das células produtoras de imunoglobulina G (contra 92% causada pela OTA). Quanto à ocratoxina α, esta não se mostrou eficiente como imunossupressora, indicando que a presença de fenilalanina é necessária para deflagrar a ação inibitória. Os autores sugerem que o efeito imunossupressor de OTA seja causado pela inibição da síntese de proteínas por competição com fenilalanina na reação catalisada por fenilalanil-tRNA sintetase. Ademais, Creepy et al. concluem que parte isocumárica da molécula (ocratoxina α) não é capaz de causar imunossupressão e que a hidroxilação de núcleo isocumárico não afeta o efeito tóxico da OTA.

4.7.2 Nefrotoxicidade

A OTA tem efeitos nefrotóxicos em todas as espécies de mamíferos monogástricos testadas até o momento (KUIPER-GOODMAN & SCOTT, 1989). Os resultados dos estudos de curto prazo com esta toxina são apresentados na Tabela 2.

A administração de ocratoxina A a 1 ou 3 mg / kg de dieta e colestiramina a 1 ou 5% da dieta por até 14 dias diminuiu as concentrações plasmáticas de ocratoxina A e a excreção urinária e biliar dessa toxina e seus metabólitos. Concentrações

aumentadas de ocratoxina A foram encontradas nas fezes. Os autores sugeriram que a colestiramina pode ter diminuído a absorção da ocratoxina A, seja por interferir na secreção de ácido biliar ou por ligação direta (KERKADI et al., 1998).

Esses autores subsequentemente confirmaram que a colestiramina pode se ligar à ocratoxina A e aos sais biliares in vitro e que a depleção dos sais biliares pela interrupção da circulação entero-hepática em ratos resultou na diminuição das concentrações plasmáticas de ocratoxina A (KERKADI et al., 1999).

Tabela 2. Resultados de estudos em curto prazo da toxicidade da ocratoxina A

Espécies, raça, sexo, idade	No.	Via	Dose (mg/kg bw por dia [mg/kg of dieta])	Dias	NOEL (mg/kg bw por dia)	Efeitos	Referências
Cachorro, Beagle, macho, jovem	3-6	Cápsula	0.1–0.2	14	0,2	Não houve alterações na função renal	Kitchen et al. (1977a,b,c)
					< 0,1	Necrose dos Túbulos Renais	
					< 0,1	Alterações do túbulo proximal; timo, necrose linfóide	
Rato, Fischer 344/N, macho, fêmea, desmamados	5	Gavagem	1–6	16 (12 doses)	1	Aumento relativo dos rins e do coração, aumento de peso do cérebro, atrofia do timo, necrose da porção anterior do estômago; hemorragia adrenal	<i>National Toxicology Program (1989)</i>
					< 1	Hipoplasia da	

						medulla óssea	
					< 1	Nefropatia Renal	
Porcos, fêmeas, 8–12 semanas	3–6	Dieta	0,008; 0,04, 0,2 [0,2 e 1, 5]	5–90	< 0,008	Alterações nas enzimas renais, alterações na função renal	Elling (1979a); Krogh et al. (1988)

Fonte: <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v47je04.htm>

4.7.3 Genotoxicidade

Os resultados dos estudos de genotoxicidade com OTA são resumidos na Tabela 3.

Não houve evidência de reparo de DNA como resultado de possível dano ao DNA em bactérias, enquanto que as quebras de fita simples de DNA foram induzidas consistentemente em células de mamíferos em cultura. As quebras de fita simples de DNA também foram observadas *in vivo* em células de baço, fígado e rim de camundongos após injeção intraperitoneal de ocratoxina A. O reparo do DNA, manifestado como síntese não programada de DNA, foi observado na maioria dos estudos com culturas primárias de hepatócitos de rato e camundongo, células epiteliais da bexiga e células uroteliais humanas.

A maioria dos testes de indução de mutação gênica em bactérias não mostrou efeito da exposição à ocratoxina A. Dois estudos mostraram resultados positivos. Um estava nas cepas de *S. typhimurium* TA1535 e TA1538 tratadas na presença de microsomas de rim de camundongo (OBRECHT-PFLUMIO et al., 1999), enquanto o outro estava nas cepas de *S. typhimurium* TA1535, TA1538 e TA100 tratadas com o meio de cultura de hepatócitos de rato expostos a ocratoxina A (HENNIG et al., 1991). Ambos os artigos descreveram resultados preliminares que exigiram investigação adicional antes que pudessem ser prontamente aceitos. Deve-se notar, entretanto, que Hennig et al. (1991) obtiveram resultados negativos com as mesmas cepas bacterianas quando microsomas de fígado de rato foram usados como sistema de ativação metabólica exógena. Esta parte dos resultados foi confirmada em estudos independentes em outros laboratórios.

In vivo, aberrações cromossômicas foram induzidas em células de camundongos, um efeito que foi reduzido pelo tratamento dos camundongos com

ácido ascórbico (por gavagem) ou vitamina A (na dieta). Esses efeitos protetores são consistentes com a observação de que a formação de manchas pós-marcação com ^{32}P foi evitada em alguns estudos nos quais camundongos foram tratados com ocratoxina A (GROSSE et al., 1997).

Tabela 3. Resultados dos estudos de genotoxicidade com OTA

Sistema de Teste	Objeto Testado	Concentração	Resultados	Referências
<i>In vitro</i>				
Mutação Reversa	<i>Salmonella typhimurium</i> TA97, TA98, TA100, TA1535	1–100 µg/plate	Negativo com hamster ou ratos com fígado ativo	<i>National Toxicology Program</i> (1989)
Síntese de DNA	Células uroteliais primárias	10–2000 nmol/L	Positivo	Dorrenhaus et al. (2000)
Ligação ao DNA	Rim de rato, fígado, vesícula seminal, rim do rato	100 µmol/L incubadas com proteína S9	Negativo	Gautier et al. (2001)
Mutação Reversa	<i>S. typhimurium</i> TA100, TA2638	0–200 µg/plate	Negativos em ensaios de pré-incubação com o fígado eo rim do rato, e sistemas isolados a ativação de enzimas	Zepnik et al. (2001)

Fonte: <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v47je04.htm>

4.7.4 Teratogênese, mutagênese e carcinogênese

A ocratoxina A tem ação teratogênica sobre ratos: injeção peritoneal de 5 mg de OTA/kg de peso corpóreo em camundongas grávidas ao 7º e 12º dias da gestação aumentaram a mortalidade pré-natal, produziu diminuição do peso fetal,

más formações, anencefalia, anomalias oculares, faciais e digitais dos recém nascidos. Ratazanas e hamsters quando submetidas a injeções contendo OTA demonstraram efeitos similares (KROGH, 1987). Para examinar a capacidade mutagênica de OTA procederam-se ensaios com os microrganismos *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* e *Saccharomyces cerevisiae* e os resultados foram negativos (KROGH, 1987). Em células humanas, Manolova et al. (1990) testaram *in vitro* a capacidade da OTA em induzir aberrações cromossômicas em linfócitos periféricos: o nível de aberrações *in vitro* aumentou cinco vezes em relação ao controle. Observou-se que a toxina promoveu alterações no cromossomo X, similares às aquelas detectadas em linfócitos de pacientes que sofrem de nefropatia endêmica. O efeito carcinogênico de OTA em ratos está bem estabelecido. O *International Agency for Research on Cancer (IARC)* classificou a toxina como possível carcinógeno humano baseado em suficiente evidência carcinogênica obtidas dos testes com animais e evidência inadequada para humanos (KUIPER-GOODMAN, 1996).

4.8 Principais fatores que influenciam na atividade de fungos produtores de OTA

Não basta a colonização dos grãos de café por *Aspergillus ochraceus* para que ocorra a contaminação por OTA (FRANK, 2001). Após e durante a colonização, é necessário que certas condições especiais sejam alcançadas para que, efetivamente, ocorra a produção de toxina pelo fungo. É necessário que o substrato seja favorável ao crescimento e produção de OTA e as condições ambientais adequadas sejam atingidas. Os principais fatores relacionados à produção de OTA são a temperatura e a atividade de água (Aw).

4.8.1 Atividade de água (Aw)

A disponibilidade de água no produto é um fator determinante na colonização e consequente produção de toxina pelo fungo. A disponibilidade de água no alimento é mais adequadamente representada utilizando-se o conceito atividade de água (Aw), que nada mais é do que a umidade relativa do ar quando o alimento é mantido em um sistema equilibrado. As atividades de água mínima para o crescimento de

Aspergillus ochraceus estão situadas entre 0,76 e 0,83 e a máxima fica em torno de 0,99 (SAMSON et al., 2000). A produção máxima de toxina acontece em Aw acima de 0,98 em meio de cultura (MATTOS et al., 2005; NORTHOLD & BULLERMAN, 1982). A manutenção de grãos de café a uma umidade de 95% resultou em níveis de contaminação pela OTA superiores a 2000 µg/kg da toxina (PALÁCIOS-CABRERA et al., 2004). Na prática, valores de umidade abaixo de 12% garantem a segurança do produto. O café normalmente é mantido de modo a preservar todas as suas qualidades, na umidade entre 10 e 12%.

4.8.2 Temperatura

Aspergillus ochraceus, a principal espécie produtora de OTA, tem uma temperatura mínima para crescimento de 8°C e uma máxima de 41°C (PALÁCIOS-CABRERA ET AL., 2005). De acordo com as médias anuais registradas nas principais regiões produtoras de café as temperaturas mínima e máxima não são fatores limitantes ao crescimento do fungo. A temperatura ideal para crescimento situa-se na faixa de 20° e 30°C (PARDO et al., 2004). A produção máxima de OTA por *A. ochraceus* situa-se na faixa de 20° a 23°C em meios de cultura (MATTOS et al, 2005). Índices de contaminação por OTA superiores a 160 µg/kg foram alcançados quando grãos de café foram mantidos sob temperaturas de 25°C, sendo este valor possivelmente próximo a uma condição ideal para a produção da toxina (PALÁCIOS-CABRERA et al, 2004).

4.9 Relação da qualidade da bebida do café e ocratoxina A

A qualidade da bebida café está na dependência de vários fatores, destacando-se entre eles a composição química do grão, ao processo de preparo e conservação do grão; a torrefação e o preparo da bebida. Destaca-se os processos de degradação ocorridos durante o *shelf-life* (tempo de prateleira ou armazenagem) do café torrado e moído, em função de procedimentos inadequados e/ou à embalagens não apropriadas e também à concentração de metabólitos tóxicos oriundos de contaminação biológica ou química que podem vir a prejudicar a saúde do consumidor. A composição química do grão cru é responsável por boa parte do sabor característico do café e está diretamente relacionada à forma como os grãos

foram cultivados. Características topográficas, incidência de sol e chuva, tratos culturais e diferentes técnicas de colheita são alguns dos fatores que podem determinar as mais variadas composições químicas do grão e assim determinar características que poderão ser benéficas ou não para a qualidade do produto final.

Em estudo desenvolvido por Chaulfon *et al.* (2001) a contaminação com OTA foi mais frequente em amostras classificadas como dura e riada do que nas amostras mole, apenas mole e estritamente mole. As amostras classificadas como dura e riada apresentam maior número de grãos com defeitos e, conseqüentemente, maior possibilidade de contaminação com fungos toxigênicos. Assim, a presença de OTA nessas amostras já é esperada, devido à sua qualidade inferior, principalmente se houver condições favoráveis. Inesperadamente, uma amostra classificada como estritamente mole apresentou nível de contaminação de 4,14 ng/g. Esse resultado não é esperado, uma vez que os mesmos fungos que produzem as micotoxinas são os responsáveis por alterações indesejáveis na qualidade organoléptica do café.

4.10 Influência da torrefação e do preparo da infusão nos níveis de OTA

Em 1998, Blanc *et al.* (1998), realizaram experimentos para investigar o comportamento da OTA durante a torrefação e no processamento de café solúvel. Os autores verificaram que a torrefação e moagem do café eram responsáveis pela eliminação da OTA, devido a degradação térmica da micotoxina. No processamento do café solúvel também observaram redução de cerca de 80% da OTA presente inicialmente. Heilman *et al.* (2000), num programa da Associação Alemã de Café, avaliaram as tecnologias para controle de qualidade, seleção ou tratamento do café verde apropriadas para redução dos níveis de OTA neste produto. As tecnologias utilizadas na seleção dos grãos pareceram não ser efetivas na descontaminação dos grãos. Apenas a torrefação, na destruição térmica ou tratamento com solventes orgânicos pareceram ser adequados na descontaminação.

Segundo Ferraz *et al.* (2010), depois de 12 minutos de torrefação, a redução no teor de OTA variou de 53% a 99% para as amostras torradas a 180° e 240° C, respectivamente. Amostras torradas em temperaturas intermediárias de torrefação obtiveram teores intermediários de perdas no teor de OTA, como esperado. Por outro lado, os resultados de Tsubouchi *et al.* (1987) mostraram que a OTA foi ligeiramente reduzida (0-12%) pelo tratamento térmico a 200° C por 10-20 min. Essa

discrepância pode ser principalmente devido a utilização de um forno estático, em que a troca de calor é muito baixa. Observa-se, portanto, que a maioria das pesquisas mostram o processo de torrefação como eficiente na redução quase completa da ocratoxina, apesar da existência de dados controversos. Assim sendo, pesquisas sobre a estabilidade da ocratoxina no preparo da bebida ainda são particularmente importantes.

4.11 Influência da radiação gama na microbiota fúngica de café

O consumidor está cada vez mais preocupado com a qualidade de vida e a segurança alimentar e é constante a procura por alimentos frescos e saudáveis. Para tentar minimizar as perdas de alimentos, vários processos são utilizados, tais como desidratação, salga, defumação, liofilização, conservação em atmosfera controlada, esterilização, pasteurização e, ultimamente, a radiação gama (MORAES, 2000; WORCMAN-BARNINKA E LANDGRAF, 2003). Em 1981, a preservação de alimentos pelo tratamento com a irradiação foi aprovada pelo Comitê Misto da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO/WHO) e pela Agência Internacional de Energia Atômica (IAEA). Em 1984, foi criado o Grupo Consultivo Internacional sobre Irradiação de alimentos (GCIIA) pela WHO, juntamente com a FAO e a IAEA, para acompanhar a evolução dessa tecnologia. O Brasil e aproximadamente 44 países fazem parte desse grupo (DEL MASTRO, 1999; GIROUX e LACROIX, 1998; MATSUDA, 2002).

No Brasil está em vigor a Resolução RDC Nº 21, de 26 de janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde (Brasil, 2001), a qual não mais restringe doses a serem aplicadas. Qualquer alimento pode ser irradiado, desde que sejam observadas as seguintes condições: (1) a dose mínima absorvida deve ser suficiente para alcançar a finalidade desejada; (2) a dose máxima deve ser inferior àquela que comprometeria as propriedades funcionais do alimento.

Atualmente observa-se um aumento acentuado no emprego de radiação ionizante para inibir o crescimento de microrganismos e a produção de micotoxinas em diferentes alimentos, como frutas, queijo, amendoim e milho (ABDEL-AAL e AZIZ, 1997; AZIZ et al., 2002; AZIZ e MOUSA, 2002; AQUINO, 2003; PRADO et al., 2003; PRADO et al., 2005). O efeito da radiação gama (^{60}Co) na contagem total de

fungos em café verde e torrado e moído é apresentado na Tabela 4. Foi observado decréscimo na população fúngica (UFC/g) à medida que as doses de irradiação aumentavam, sendo os fungos completamente inibidos a partir de 2 e 3 kGy, para café verde e torrado e moído, respectivamente. Na Índia, Ahmad et al. (2003) a partir de uma contaminação original de 120 UFC/g em café Arábica, observaram uma redução para 4 UFC/g quando aplicada dose de 5 kGy.

Tabela 4. Efeito da irradiação gama (^{60}Co) na contagem total de fungos em café torrado e moído e café verde após irradiação a 0, 1, 2, 3, 5, 10 e 15 kGy e análise em duplicata.

Dose de irradiação (kGy)	Ocratoxina A ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Média ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Coefficiente de variação (%)
0	14,2	14,3	2,5
	14,0		
	14,6		
1	14,3	15,0	6,0
	16,0		
	14,7		
2	13,8	12,9	6,9
	12,9		
	12,0		
3	13,9	13,2	8,4
	11,9		
	13,5		
5	12,5	12,9	4,2
	12,8		
	12,8		
10	13,8	12,9	7,2
	12,0		
	14,7		
15	14,6	13,9	8,3
	12,0		
	12,0		

¹ Média da duplicata. <10 UFC/g – Não houve crescimento de bolores e leveduras.

Fonte: Prado et al., 2008.

Os resultados do efeito da irradiação gama (^{60}Co) na destruição de OTA, em amostras naturalmente contaminadas, são apresentados nas Tabelas 5 e 6. Observou-se que mesmo em doses elevadas de 10 e 15 kGy não foi verificada a destruição de OTA. Constatou-se também, em função da análise de variância efetuada, que as doses de irradiação gama utilizadas para a destruição de OTA, apresentaram o mesmo comportamento em relação à amostra não irradiada. Dessa forma, não ficou comprovada a dependência entre as doses de radiação gama utilizadas e a concentração de OTA em café.

Tabela 5. Teores de ocratoxina A em café torrado e moído após irradiação gama (^{60}Co) a 0, 1, 2, 3, 5, 10 e 15 kGy e análise em triplicata.

Dose de irradiação (kGy)	Unidade Formadoras de Colônias (UFC/g) ¹	
	Café verde	Café Torrado e Moído
0	80	67
1	10	10
2	<10	10
3	<10	<10
5	<10	<10
10	<10	<10
15	<10	<10

Nível de significância: 0,05. p-valor: 0,077.

Fonte: Prado et al., 2008.

Quanto à variabilidade observada nas análises de OTA em café verde e torrado e moído, verificou-se pelos dados apresentados nas Tabelas 5 e 6 que os valores de coeficientes de variação foram inferiores a 30%, considerados como aceitáveis para análise de micotoxinas (HORWITZ et al., 1980). O fato da irradiação gama não ser efetiva na destruição de OTA pode ser devido ao baixo teor de água das amostras de café (menor de 10%). Quanto maior o teor de água do grão mais efetivo é o processo de irradiação. O processo de radiólise da água forma maior número de radicais livres e de outras espécies iônicas e excitadas, aumentando os efeitos indiretos da irradiação (RELA, 2000; LANDGRAF, 2003). Outra possível explicação para a irradiação gama não ser totalmente efetiva seria o pequeno tamanho da molécula de OTA (peso molecular 403,8). A sensibilidade à irradiação gama é proporcional ao seu peso molecular. Uma molécula de DNA, por exemplo, é mais sensível que a de um aminoácido (LANDGRAF, 2003).

Tabela 6. Teores de ocratoxina A em café verde após irradiação gama ($^{\circ}\text{Co}$) a 0, 1, 2, 3, 5, 10 e 15 kGy e análise em triplicata.

Dose de irradiação (kGy)	Ocratoxina A ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Média ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Coefficiente de variação (%)
0	10,5	12,4	14,3
	14,1		
	12,6		
1	10,9	13,0	16,3
	15,2		
	12,9		
2	11,9	11,7	5,9
	10,9		
	12,3		
3	11,5	11,5	28,9
	14,8		
	8,2		
5	10,7	11,4	5,8
	12,0		
	11,9		
10	10,4	11,1	5,8
	11,1		
	11,7		
15	11,4	10,8	4,8
	10,8		
	10,3		

Nível de significância: 0,05. p-valor: 0,077.

Fonte: Prado et al., 2008.

4.12 Avaliação da ingestão de OTA devido ao consumo de café

Um grande interesse tem sido focado no possível papel do café no consumo de OTA. O *Join FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA)* estabeleceu uma ingestão semanal tolerável provisória para a OTA de 100 ng/kg/semana, que correspondem a 14 ng/ kg/dia. A partir de um levantamento das pessoas que bebem café, Patel et al. (1997) no Reino Unido, desenvolveram um número estimado de consumo semanal de ocratoxina A em café solúvel. Com base em um consumo de 4,5 g de café solúvel por dia, o bebedor médio de café ingeriram 0,4 ng/kg de peso corporal por semana, enquanto o um consumidor de cerca de 20 g de café solúvel por semana ingeriram cerca de 1,9 ng/kg de peso/semana. Esses números se traduzem em 3,5 ng e 17 ng ingestão de ocratoxina A por dia e 0,4% ou 2% do PTDI, respectivamente (PATEL et al., 1997). Comparando estes dados com os dados obtidos por Iamanaka et al. (2005) no Brasil, a média da concentração de OTA no café torrado foi de 1,3 mg / kg. Café torrado e moído é o tipo de café mais usado pelos brasileiros e muitos países produtores de café para a preparação da bebida.

De acordo com a Iamanaka et al. (2005), considerando a média de consumo de café de um brasileiro adulto de cinco xícaras de café por o dia, o que corresponderia a 30 g de café torrado e moído para fazer cinco xícaras da bebida (60 mL cada), preparada de acordo com os procedimentos comuns da casa. A ingestão diária provável de OTA por um adulto de 70 kg seriam 0,56 ng/kg/dia e isso está muito aquém da ingestão semanal tolerável provisória estabelecido pelo JECFA. Examinando a situação do pior caso de um bebedor pesado do café, que pode beber até 33 xícaras de café por dia (CAMARGO et al. 1999), isso significaria uma ingestão de 3,7 ng/kg/dia que ainda está bem abaixo ingestão semanal tolerável provisória estabelecido pelo JECFA. Estes resultados indicam que o café não é um grande fonte alimentar de ocratoxina A no Reino Unido ou no Brasil e não deve ser muito diferente da maioria dos outros países consumidores de café.

4.13 Identificação de Perigos e Pontos Críticos de Controle na cadeia produtiva do café

No café, a OTA, é um dos perigos mais importantes, ela é considerada como cancerígena. E ela é um dos fatores limitantes quanto à segurança do café. A comunidade econômica europeia vem colocando muitas restrições em relação a presença desta micotoxina (ANEXO C). Outros perigos para a saúde do consumidor são o uso excessivo de defensivos agrícolas, que podem deixar resíduos acima do permitido pela legislação, e as impurezas encontradas, com maior frequência, no café torrado e moído, como cascas, paus e milho torrado, decorrentes da má fé do cerealista.

Após a identificação dos perigos, em cada etapa do processo, é necessário estabelecer as medidas preventivas de controle, para aqueles perigos identificados à partir daí, serão definidos os pontos críticos de controle (ANEXO D). O ponto crítico de controle (PCC) é qualquer ponto, etapa ou procedimento no qual se aplicam medidas de controle preventivas para evitar que um perigo significativo chegue ao consumidor final. Umidade e temperatura elevadas devem ser evitadas, pois permitiria a produção da micotoxina pelos fungos. Não será possível a correção caso haja falha do controle nesta etapa, o que implicaria no desenvolvimento de fungos com possível produção da ocratoxina A.

4.13.1 Limites Críticos

Para implementação do APPCC é fundamental estabelecer os limites críticos, que são valores estabelecidos nas legislações de alguns países. Atualmente Itália e Grécia, entre outros, já possuem limites para OTA. A Europa toda vem se organizando para também impor limites na faixa de 5 µg/kg. Outro limite importante que deve ser estabelecido é na etapa de secagem do café. O café verde deve alcançar um teor de umidade final de 12,5%. Esse limite assegura o controle do perigo. Os limites críticos são estabelecidos para cada medida preventiva e monitorada nos pontos críticos de controle. Outro exemplo pode ser observado na hora da aplicação do defensivo agrícola. A forma, momento e condições de aplicação de pesticidas, para prevenir a presença de resíduos na matéria-prima, são considerados limites críticos.

4.13.2 Ações Corretivas

Uma das principais vantagens do sistema APPCC é a resposta rápida depois da identificação de um processo fora de controle. Estas ações corretivas são aplicadas sempre que se identifica um desvio nos limites críticos. Estas ações corretivas podem levar à rejeição do lote de matéria-prima, ao ajuste da temperatura e tempo de secagem ou ao aumento do tempo de secagem para alcançar a umidade final desejada.

4.13.3 Verificações e Registros

O sucesso de um plano APPCC ocorre quando há pouca perda do produto final, desde que os controles sejam apropriados ao longo da cadeia produtiva.

A verificação inclui, entre outras ações, o estabelecimento de cronograma apropriado de revisão do plano APPCC, confirmação da exatidão do fluxograma de produção e processo, revisão dos registros de pontos críticos de controle e coleta aleatória de amostras e análises para verificar eficácia do sistema. Para completar, o sistema APPCC prevê uma série de registros como o de temperatura de estocagem, de desvios e ações corretivas, de treinamentos, de tempo e temperatura de

secagem e armazenamento. Relatórios de auditorias do cliente também são importantes documentos para o APPCC.

4.14 Princípios do Sistema APPCC aplicado ao processamento pós-colheita do café

O sistema APPCC teve origem na década de 50, na Grã-Bretanha, em setores das indústrias nucleares, de aviação e química. Nos anos 60, a NASA utilizou o sistema para garantir a ausência de contaminação das refeições e a saúde dos astronautas em condições de gravidade zero. Atualmente, este sistema é referência na gestão de vários setores. Nos Estados Unidos, o APPCC é largamente utilizado por empresas públicas e privadas na produção de alimentos seguros. O APPCC é um sistema de gestão que deve ser acompanhado pelas BPAs, as quais são um conjunto de práticas simples e eficazes com finalidade de otimizar o sistema de produção e promover um produto com menor chance de ocorrência de alguns perigos. O Sistema APPCC é constituído de sete princípios (ANEXO E):

1. Análise de perigos e medidas preventivas.
2. Identificação dos pontos críticos de controle.
3. Estabelecimentos dos limites críticos.
4. Estabelecimento dos processos de monitorização dos pontos críticos de controle.
5. Estabelecimento das ações corretivas.
6. Estabelecimento dos procedimentos de verificação.
7. Estabelecimento de procedimentos de registros.

O sistema APPCC, consiste em definir primeiro os riscos associados ao plantio, à colheita, ao processo de industrialização e comercialização da matéria-prima. Depois, determinar os pontos e controles críticos necessários para lidar com os perigos identificados e, por último, estabelecer os procedimentos para monitorar os pontos críticos de controle. Estes perigos são definidos como a contaminação inaceitável de natureza biológica, química ou física que possa causar dano à saúde ou a integridade física do consumidor.

4.15 Adequação às Boas Práticas Agrícolas

4.15.1 Boas Práticas Agropecuárias antes da Colheita

No café encontram-se patógenos fúngicos importantes, mas os fungos em geral, e os que produzem a OTA em particular, não causam doenças às plantas. Muitos têm a ver ou podem ter a ver com a decomposição dos frutos, e vários podem crescer e sobreviver em sementes viáveis e saudáveis. Os microrganismos são uma parte natural do interior e do exterior da planta, e numa planta saudável há um equilíbrio entre esses organismos comensais e a própria planta. Há hoje provas claras de que a infecção da semente pelos fungos que causam a OTA pode ocorrer no cafezal, crescendo o suficiente para produzi-la até o momento da colheita. Estudos mais aprofundados terão de ser levadas a cabo para poder-se compreender melhor os fatores que provocam essa contaminação.

Há duas vias comprovadas da infecção: a introdução através das flores, sem sintomas de infecção; e o transporte de esporos para o interior dos grãos pela broca do café (*Hypothenemus hampei*), com sinais óbvios: um orifício na cereja e um ou mais túneis nos grãos. Os frutos mais maduros e mais secos, assim como a casca e a polpa, podem conter níveis mais altos dos esporos e micélios das espécies que produzem a OTA. Evidentemente, os grãos podem ser contaminados pelo crescimento de mofo em toda a superfície dos frutos. A relativa importância desse mecanismo na contaminação dos grãos no cafezal não foi avaliada sistematicamente, mas a análise micológica não demonstrou uma correlação entre a contaminação dos frutos e a dos grãos. Quando as cerejas se separam e são deixadas no chão, é mais provável que haja contaminação e crescimento através dos frutos.

Esse processo exige tempo, mas, uma vez no chão, não há como saber o que acontece com os frutos. Eles se desprendem devido à inclemência do tempo, a animais que deles se alimentam, a doenças, ou a abscisão induzida por estresse ou acidentalmente, em virtude de outras atividades agrícolas, como a capina ou a pulverização. Essas considerações nos levam a recomendar práticas para minimizar a quantidade de esporos dos fungos que produzem a OTA no cafezal e, da mesma forma, minimizar a ocorrência da broca, para garantir o vigor dos cafeeiros e evitar ao máximo o desenvolvimento de fungos neles e nos frutos.

1. Usar o material vegetal das limpezas manuais para enriquecer a textura e fertilidade do solo. Os subprodutos do café também podem ser usados, mas devem antes ser compostados até atingir um estado friável, o que requer 3-6 meses, dependendo das condições de temperatura e umidade. Evitar a aplicação do material orgânico durante a florada ou logo antes.

2. Não usar irrigação por aspersão durante as floradas, pois esse processo pode aumentar a dispersão normal de esporos e o risco de contaminação dos grãos por fungos que produzem a OTA.

3. Retirar do cafezal as cerejas caídas, sobretudo fora de temporada, e empregar armadilhas de álcool para controle da broca, especialmente quando a colheita está se aproximando, e nos períodos de colheita e processamento. Aconselha-se promover programas de manejo integrado de pragas (MIP).

4. Usar práticas hortícolas que contribuam para o bom estado dos cafeeiros: limpeza, poda, fertilização, manejo de pragas e doenças, etc. Ao escolher um método de poda, convém ter em mente seu impacto sobre a folhagem, que deve ser alta, para que a sombra e o elevado potencial fotossintético incrementem a robustez do café.

5. Não atirar no cafezal ou proximidades resíduos não-compostados de café, detritos domésticos, resíduos de outros produtos também cultivados na propriedade ou rações animais. As sementes e matérias afins podem levar à proliferação dos fungos da OTA, um grande número dos quais elas veiculam.

4.15.2 Boas Práticas Agropecuárias na Colheita

O método de colheita é ditado por uma combinação das exigências do método de processamento, por considerações econômicas e pela disponibilidade de mão-de-obra. Via de regra, quatro métodos de colheita são empregados: 1) apanha seletiva, em que o apanhador só colhe as cerejas maduras (com os dedos), feita diversas vezes; 2) derriça em que pencas inteiras só são derriçadas se em sua carga predominarem as cerejas maduras, feita diversas vezes; 3) derriça única, em que tudo é derriçado de uma vez, na passagem dos trabalhadores pelo cafezal; 4) colheita mecânica, em os frutos são derrubados dos cafeeiros pela vibração de máquinas, que às vezes são operadas à mão.

Esses métodos são empregados na colheita principal, mas antes e depois dela pode haver outras operações de colheita. Frequentemente os frutos que amadureceram prematuramente são apanhados numa colheita prévia. Faz-se a capina e a limpeza do terreno do cafezal, para agilizar a abertura dos panos ou a recolha dos frutos que caíam no chão durante a colheita. Depois da colheita principal, costuma-se recolher os frutos deixados para trás, parte dos quais ainda nos cafeeiros, mas a maior parte no chão. Este é um importante elemento do Manejo Integrado de Pragas contra a broca, mas tradicionalmente o café desse tipo (“café de varrição”) entra na cadeia da alimentação humana.

Um contato breve com o chão não resulta em problemas, mas se torna problemático se o período de contato se prolonga. Algumas constatações experimentais revelam que, *quando o clima é seco*, o desenvolvimento dos fungos não é rápido, e a permanência de até duas semanas no chão pode não aumentar a contaminação por fungos que produzem a OTA. Em climas úmidos só a recolha do chão no mesmo dia deveria ser considerada aceitável. Quando o café de varrição se destina ao consumo, medidas deveriam ser tomadas para garantir a observância dos limites prescritos.

A maturação irregular dos frutos é um problema para todos os cafeicultores e em todos os métodos de processamento, porque as propriedades e a qualidade organoléptica potencial de diferentes graus de maturidade são diversas. Nas colheitas seletivas, a heterogeneidade pode ser reduzida, mas os custos são mais altos. Por esse motivo, o momento da colheita é importante, particularmente quando se utilizam métodos não-seletivos. Parece que, à medida que a temporada avança, a concentração da OTA pode aumentar nos cafezais, e a broca sem dúvida aumenta. No início da temporada, há uma frequência desproporcional de cerejas imaturas de baixa qualidade para o consumo, que não podem ser despulpadas nem separadas facilmente das cerejas maduras por meios automáticos.

A proporção de cerejas que amadureceram demais cresce com o avanço da temporada e, depois de certo ponto, já não é possível despulpá-las. Com cerejas demasiado maduras ou que secaram no cafeeiro, a situação se torna complexa, mas parece que é seguro deixar o café secar no cafeeiro em regiões nas quais a colheita é feita em período de estiagem. Secar no cafeeiro pode ser menos seguro em outros climas e, de toda forma, a esta prática têm sido atribuídos certos defeitos de xícara como o sabor fermentado ou riado. O processamento da cereja do café deve feito

sem demora. Métodos de proteção que consistem, por exemplo, em manter as cerejas em sacas ou dentro d'água, em transferir café parcialmente seco do terreiro para barcaças de condicionamento, ou em secar café em camadas demasiado espessas, às vezes são usados como sucedâneos do bom planejamento, mas todos são problemáticos. Planejamento e previsão meticolosos são necessários, porque o café está pronto para o benefício logo que acaba de secar. O término da secagem, por sua vez, depende das condições meteorológicas. É preciso que haja sintonia entre o ritmo da colheita, a eficácia do processamento, a disponibilidade de mão-de-obra e o avanço da secagem.

Sabe-se que é seguro manter as cerejas frescas temporariamente em água limpa, mas que elas em pouco tempo ficam mais difíceis de despoldar e lavar. Constatou-se que a manutenção do café em sacas pode, de forma errática, produzir altos níveis de OTA e perda de qualidade. Do mesmo modo, camadas espessas de café durante a secagem tornam a secagem e mais lenta, por conseguinte, favorecem o crescimento e o desenvolvimento de fungos. Há provas de que nas barcaças o ritmo da secagem aumenta pouco e, assim, o tempo que o café é deixado nelas eleva a possibilidade de decomposição. O café submetido a benefício deve ser uniforme, para evitar uma mistura de categorias: café molhado com seco no processamento por via seca; despoldável com não-despoldável no processamento por via úmida; frutos em boas condições com outras categorias ao longo de todo o processamento. O produto da colheita deve corresponder ao processamento previsto e ser avaliado de acordo com essa correspondência. Sabe-se que na colheita as sementes podem conter OTA, mas a detecção das sementes afetadas não é viável.

1. A retirada de ramagem, cerejas caídas e mato alto da proximidade dos cafeeiros é um preparativo importante para a colheita, pois torna a apanha mais eficaz, protege os trabalhadores e é necessária para proteger a maior parte do café da contaminação por cerejas que já estão no chão há bastante tempo e podem ser recolhidas com as que caíram ao chão há pouco tempo.

2. A colheita deve começar logo que haja cerejas maduras em quantidade suficiente para que ela seja economicamente viável.

3. Usar panos de café embaixo dos cafeeiros onde possível. Eles protegem a maior parte do café de contaminação por cerejas que já estão no chão há bastante

tempo e tornam a apanha mais eficaz. Este processo só é praticável em terrenos planos ou pouco inclinados, pois em superfícies íngremes os frutos rolam para fora dos panos.

4. Fazer a seleção apropriada durante a apanha, antes da continuação do processamento ou em ambas as etapas, para remover os frutos inferiores, conforme as necessidades do método de processamento.

- Nos lugares onde a CBD ou o *Phoma* costumam atacar os frutos, só a escolha manual é possível. A escolha permite remover frutos doentes ou demasiado maduros. Eliminar também os frutos imaturos.

- A separação por flutuação na água separa convenientemente os frutos com uma ou mais sementes doentes, os frutos perfurados pela broca e os frutos que secaram no cafeeiro (que flutuam) do restante dos frutos maduros e imaturos (que afundam). Há indícios de que, agitando-se as cerejas brevemente na água, a carga microbiana da superfície diminui, mas é questionável se essa medida reduz o risco de contaminação dos grãos de café pela OTA.

5. Estabelecer rotinas claras para o processamento e o manuseio dos produtos secundários resultantes da escolha ou separação no sistema de produção.

6. O café que esteve em contato com o chão do cafezal por mais tempo que o especificado deve ser coletado e destruído.

7. Assegurar-se de que o café colhido pode passar rapidamente da colheita para o processamento. Uma função importante do gerenciamento é a coordenação das atividades da colheita com as do processamento. Em geral, é melhor deixar o café no cafeeiro alguns dias do que deixá-lo à espera de processamento depois de colhido.

4.15.3 Boas Práticas Agropecuárias no Processamento Pós-Colheita

O amadurecimento e secagem das cerejas no cafeeiro e depois da colheita são muito diferentes. Os frutos do cafeeiro diferem de outros frutos, por serem incapazes de latência – uma vez colhidos, sua transformação e envelhecimento se aceleram. A partir dos meios disponíveis de controle do processamento, o período pós-colheita se caracteriza por duas fases distintas, unidas por uma fase de transição. Na primeira fase, ou fase de muita umidade, que começa com a colheita, o produto é instável, e sua decomposição só pode ser controlada através de

incentivo aos microrganismos contrários e de limitação do oxigênio e do tempo da permanência do produto no estado em que se encontra. Na última fase, ou fase de pouca umidade, que começa na última parte da secagem e se prolonga até a torrefação, o produto é estável, e o controle é exercido pela prevenção da reintrodução ou redistribuição de umidade no café.

Na transição entre essas duas fases, a decomposição só pode ser controlada pela limitação do tempo, porque há umidade suficiente para o crescimento de organismos mesófilos ou xerófilos, que causam deterioração, mas não para o crescimento de organismos hidrofílicos, que competem com os anteriores; e a ventilação é uma parte indispensável da secagem. No processamento por via úmida, a fase de muita umidade pode ser prolongada e controlada mediante fermentação, mas de modo geral deve-se procurar minimizar sua duração.

A fase de transição é a menos estável e a mais difícil de prever. Certos microrganismos hidrofílicos conhecidamente inócuos são substituídos por microrganismos mesófilos, alguns dos quais sabidamente capazes de produzir a OTA. É preciso notar, porém, que, dos organismos inócuos, muitos retêm a capacidade de deteriorar a qualidade. A secagem rápida frequentemente não é possível quando a colheita coincide com uma temporada de chuvas ou de umidade prevaiente, e nessas condições precárias, é preciso tomar medidas para otimizar a secagem.

A partir do ponto da secagem em que o produto passa para a fase de pouca umidade que anuncia o fim do processamento, a continuação do desenvolvimento dos microrganismos torna-se impossível. Com frequência ouve-se dizer que a boa qualidade está relacionada com um ou outro aspecto do processamento, e isso em parte determina o valor comercial do café. O que se ouve dizer não costuma ser corroborado por uma comparação objetiva de opções, mas, como tem muita influência, seria útil fazer um estudo sistemático do assunto. Um mercado racional precisa de informações desse tipo para premiar as práticas que evidentemente favorecem a segurança ou a qualidade em geral. Os recursos ou esforços dedicados a atividades que não trazem benefícios, na melhor das hipóteses, desviam a atenção de outras questões mais importantes.

No passado, tanto a fermentação quanto a secagem ao sol eram consideradas essenciais para a boa qualidade, mas essas noções agora são questionadas devido à difusão do uso de lavadoras e secadoras mecânicas. Alguns

profissionais recomendam que o café em pergaminho seja protegido de secagem rápida ao sol do meio-dia nas etapas iniciais, mas muitas origens não aderem a essa tradição.

4.16 Manejo Integrado de Pragas

O conceito de Manejo Integrado de Pragas (MIP) não foi desenvolvido como uma forma de erradicar pragas e doenças, mas como um método para a sua gestão a longo prazo para minimizar o seu impacto e manter populações de pragas em níveis econômicos e ambientais aceitáveis. O Manejo Integrado de Pragas põe em jogo todos os possíveis métodos de controle, incluindo o uso de pesticidas. O Manejo Integrado de Pragas do Café abrange todas as pragas e doenças que afetam o cultivo do café. No entanto, é dada especial atenção ao controle da broca do café (CBB), um inseto responsável por grandes perdas na produção e deterioração da qualidade. Além disso, a presença de grãos danificados pelo CBB parece ter um impacto sobre a contaminação por OTA.



Figura 5. Orifício de entrada e casca de cereja madura com broca (esquerda), orifício de entrada da broca no café cereja (centro), e grãos de café verde danificado com broca (à direita).

Fonte: *Good Hygiene Practices along the coffee chain*, 2006.

A utilização de pesticidas deve ser considerada apenas para controle da broca quando o dano atinge níveis muito graves estimada em 15% ou mais. O controle químico é destinado a reduzir drasticamente as populações CBB. Além disso, o controle químico deve ser utilizado apenas para reduzir os focos de infestação em uma plantação. Portanto, o acompanhamento regular é necessário nas plantações de café. Da mesma forma, para controle químico adequado, é necessário intervir de forma muito precisa no ciclo de desenvolvimento da CBB (3

meses após a floração), com duas aplicações de inseticidas com um mês de intervalo.

O controle químico tem sido amplamente desenvolvido para controlar as principais pragas (CBB, Antestia ou o erro na variegação do café, lagartas comedoras de folhas, etc) e as principais doenças (ferrugem do cafeeiro, a doença da baga do café). No entanto, ainda não existem métodos de controle verdadeiramente eficaz para algumas pragas (brocas de troncos e galhos, minadores, cochonilhas, etc) ou doenças (doença da murcha vascular). Além disso, o uso abusivo de pesticidas pode ter induzido resistência (por exemplo, resistência ao endosulfan CBB), ou incentivar o desenvolvimento de populações de insetos em escala quando pesticidas matam seus inimigos naturais. Nematóides de controle por agrotóxicos não é muito eficaz, caro e altamente poluente.

O controle genético é o método preferido para o controle da doença, que consiste em identificar fontes de resistência genética existente em coleções de cafezais estabelecidos em diferentes países produtores. Os geneticistas então cruzam as variedades cultivadas com genótipos resistentes. Um programa de melhoramento genético contra a doença de murcha vascular está atualmente em curso. Para as pragas, o controle genético é mais complexo, pois é difícil para revelar a resistência genética a pragas. No entanto, existe um caso em que o controle genético é eficiente: o controle de nematóides. Depois de genótipos de *Coffea canephora* resistentes (ou apenas ligeiramente suscetível) aos nematóides terem sido identificados, eles são usados como porta-enxertos de *Coffea arabica*. Estudos estão em curso no Brasil para controle de minadores usando uma árvore de café (*Coffea racemosa*), com resistência ao bicho-mineiro como fonte de resistência.

Ferramentas da biotecnologia representam uma nova forma de controle de pragas, que consiste na introdução de um ou mais genes que codificam bioinseticidas e enzimas impedindo o desenvolvimento de pragas. Cafeeiros transgênicos com resistência minadora estão sendo monitorados no campo. O *Bacillus thuringiensis*, um gene que codifica a proteína inseticida eficaz contra o bicho-mineiro foi introduzido no genoma do cafeeiro. O controle genético de pragas e doenças é um processo demorado e caro, e exige importantes recursos humanos e financeiros para a investigação. Além disso, a resistência induzida pode ser contornada, como já foi visto em alguns cultivares resistentes à ferrugem da folha. Isso mostra que nenhum método de controle utilizado isoladamente pode fornecer

uma solução segura, sendo importante combinar diferentes métodos de controle para assegurar a melhor proteção possível. O controle biológico consiste na utilização de inimigos naturais das pragas ou fungos que causam doenças.



Figura 6. Ovos do Parasitóide *Antestia orbitalis* (esquerda) e *Beauveria Beauvaria*, um fungo entomopatogênico, (à direita) em grãos de café, utilizado no controle de CBB.

Fonte: *Good Hygiene Practices along the coffee chain*, 2006.

O controle biológico utilizando os inimigos naturais de pragas do café é composto de liberações de parasitóides em massa em um determinado momento do ciclo das pragas correspondentes. O objetivo é agir diretamente sobre as pragas, reduzindo os níveis de infestação, com a esperança de vir a aumentar as populações do parasitóide. Três inimigos naturais africanos têm sido estudados para o controle da CBB:

- *Cephalonomia stephanoderis*
- *Prorops nasuta*
- *Phymasticus coffea*

Os dois primeiros já estão bem estabelecidos na América Latina e *P. coffea* (que, estranhamente, os ataques do inseto adulto) foram avaliados no âmbito de um projeto CFC ICO/implementado pela CABI commodities, que concluiu em 2002. Um processo de criação em massa foi desenvolvido com o USDA, e há fortes evidências de que a vespa está estabelecida no campo na América Central e do Sul, com bons níveis de parasitismo.

4.17 Metodologia analítica para determinação de ocratoxina A em café

A partir dos anos 1970, vários procedimentos têm sido propostos para determinação de OTA em café. Levi et al. (1974) aplicaram o método oficial da AOAC, desenvolvido para determinação de ocratoxina A em cevada para determinar a toxina em café verde. O método consiste em extração com clorofórmio e limpeza em coluna de celite e bicarbonato de sódio. A separação da micotoxina é conseguida por cromatografia em camada delgada e a detecção por fluorescência, sob luz ultravioleta. O limite de detecção foi de 20 ng/g. Esse método foi adotado pela AOAC como “método oficial de primeira ação” para determinação de ocratoxina A em grãos de café verde após ter sido estudado colaborativamente (LEVI, 1975). As recuperações obtidas para 3 níveis de fortificação variavam de 60,5 a 85,6%.

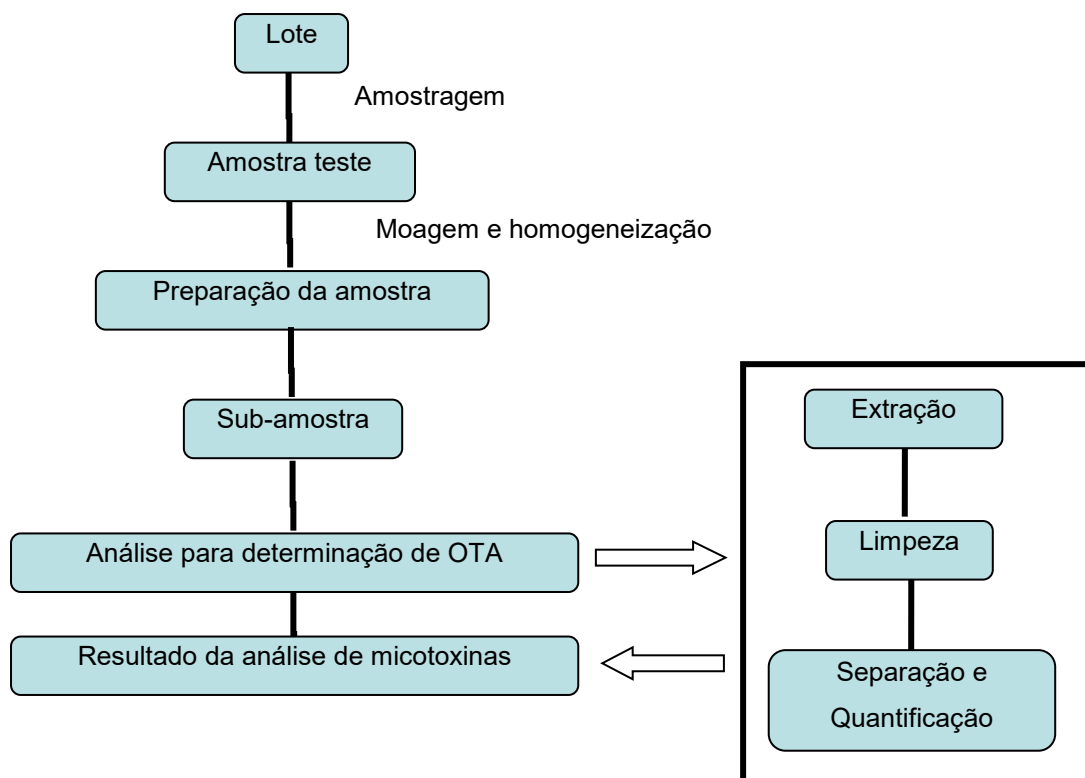
Apenas na década seguinte, CANTÁFORA et al (1983) introduziram a cromatografia líquida de alta eficiência para separar e quantificar a OTA em café verde. A extração proposta pelos autores foi com bicarbonato de sódio e metanol, seguida por uma etapa de limpeza constando de desengorduramento com isoctano, partição para clorofórmio e passagem por coluna de celite e bicarbonato de sódio. A cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência foi empregada na etapa final. O limite de detecção obtido foi cerca de 0,2 ng/g. A confirmação dos resultados presuntivos positivos foi por metilação com trifluoreto de boro metanólico.

TERADA et al. (1986) descreveram um método para determinação de ocratoxina A em café verde e torrado em grãos, café instantâneo e café coado. A ocratoxina A foi extraída com uma mistura de bicarbonato de sódio e metanol (1+1), seguida de partição para clorofórmio e passagem por coluna de fase reversa de octadecilsilil. O extrato contendo OTA foi separado por cromatografia líquida de alta eficiência com coluna analítica de octadecilsilil e detecção por fluorescência, utilizando como par iônico o cetiltrimetilamonio, para aumentar a sensibilidade. A quantificação foi feita por padronização externa e a confirmação por esterificação com etanol. O limite de detecção do método correspondeu a 2 ng/g para café em grãos, 5 ng/g para café instantâneo e 0,2 ng/g para café coado. A recuperação média foi 80,7% com desvios padrões relativos que variaram de 3,43 a 5,93%.

NAKAJIMA et al (1990) desenvolveram uma metodologia que utilizava colunas de afinidade para a limpeza do extrato de amostras de café em grãos, café instantâneo em pó e bebida de café enlatada. O extrato obtido após a passagem

pela coluna foi submetido à cromatografia líquida de alta eficiência (fase estacionária de octadecilsilil) e revelou-se muito limpo quando comparado com os obtidos por técnicas convencionais. O limite de detecção do método foi de 0,5 ng/g para café em grãos e café solúvel e 0,025 ng/g para bebida de café enlatada.

Fluxograma 1. Etapas envolvidas na amostragem, preparação de amostras e análise de micotoxinas em produtos agrícolas



Fonte: 'Good Hygiene Practices along the coffee chain', FAO, 2010.

PITTET et al (1996) relataram um procedimento para analisar ocratoxina A presente em amostras de café verde e café torrado, em grãos e café solúvel. A ocratoxina A foi extraída com uma mistura de metanol e solução de bicarbonato de sódio. O extrato diluído com tampão fosfato foi aplicado em coluna de imunoafinidade, a coluna foi lavada com água e finalmente a ocratoxina A foi eluída com metanol. O eluído foi então injetado em cromatógrafo líquido de alta eficiência com detecção por fluorescência e novamente foi utilizada coluna analítica de fase reversa C₁₈. As recuperações obtidas foram de 80% a 108% e o limite de detecção foi de 0,2 ng/g. O método oficial da AOAC para café torrado (ENTWISLE *et al.*, 2001) foi adaptado do método do Comitê Europeu de Normalização EN 14132:2003

para Géneros alimentícios - Determinação de ocratoxina A em café torrado e cevada.

A análise de OTA em café envolve procedimentos de purificação complexos e demorados como extração por solvente, purificação em fase sólida ou uma combinação destes procedimentos (SANTOS, 2004) (Tabela 7 – anexo H).

Métodos químicos para determinação de OTA geralmente incluem as etapas de extração, purificação, separação, detecção, quantificação e confirmação de sua identidade. A extração da toxina é realizada, usualmente, com mistura de solvente orgânico e água contendo pequenas quantidades de ácido ou base, que dependerá do tipo de matriz e da etapa de purificação e de determinação escolhida (SANTOS, 2004) (Tabela 7 – anexo H).

O método da AOAC baseado em cromatografia de camada delgada (CCD) foi adaptado para detecção por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) entre 1974 e 1983. Em meados de 1980 o uso de purificação em fase sólida foi introduzido, representando o primeiro avanço nas análises de OTA. Contudo, o limite de detecção do método não atende aos limites regulatórios atualmente propostos pela União Europeia (Tabela 7 – Anexo H).

O segundo grande avanço na determinação de OTA em café se deu com a introdução de colunas de imunoafinidade (IAC) na etapa de purificação dos extratos (SANTOS, 2004) (Tabela 7 – Anexo H).

4.18 Limites máximos permitidos de ocratoxina A em café

Segundo a FAO (2007) desde os anos 90 a União Europeia vem adotando medidas que visam a harmonização das regulamentações relacionadas à contaminação de alimentos por micotoxinas, incluindo a ocratoxina A, propondo inclusive a unificação da regulamentação para limites máximos de ocratoxina A em 5,0 µg/Kg em café torrado e 10 µg/Kg no solúvel, porém essa unificação ainda não foi totalmente realizada como podemos observar na Tabela 8. No Brasil, a legislação vigente sobre limites máximos tolerados para micotoxinas em alimentos (RDC nº7, de 18 de fevereiro de 2011) estabelece que para café torrado (moído ou em grão) e café solúvel o limite para ocratoxina A é de 10 µ/kg.

Tabela 8. Limites máximos permitidos para ocratoxina A (ppb) na União Europeia

País	Grão Cru	Torrado	Solúvel
República Tcheca	10	10	10
Finlândia	5	5	5
Alemanha	-	3	6
Grécia	20	-	-
Hungria	15	10	10
Itália	8	4	4
Holanda	-	10	10
Portugal	8	4	4
Espanha	8	4	4
Suíça	5	5	5

Fonte: *Reducing Ochratoxin A in Coffee* (FAO, 2007)

5 CONCLUSÃO

A crescente preocupação com a segurança e melhoria da qualidade de produtos alimentícios tem levado as instituições públicas e privadas ao desenvolvimento e utilização de diversos sistemas e programas de qualidade. Os dados recentes de doenças de origem alimentar associados ao consumo de produtos agrícolas têm desencadeado preocupações em termo de saúde pública, por parte dos órgãos governamentais, das associações de proteção ao consumidor e dos produtores e, na busca de produtos seguros e com qualidade.

Nesse sentido, a principal ameaça não-tarifária a exportações do café brasileiro é a presença da micotoxina conhecida como ocratoxina A (OTA), produzida por fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. Os efeitos carcinogênicos da OTA em animais já são bem caracterizados; ela causa lesões renais, sendo a possível causa da doença conhecida como nefropatia endêmica dos Bálcãs, uma doença que provoca uma progressiva e gradual falência dos rins.

Diante deste quadro, o sistema APPCC (Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle), associado às Boas Práticas Agrícolas (BPA), além de regulamentado pelos órgãos oficiais de controle, têm-se revelado como ferramenta fundamental do sistema moderno de gestão para garantia da qualidade do produto quanto à segurança da saúde do consumidor. Um dos requisitos para a implementação do sistema APPCC, as Boas Práticas Agrícolas, consistem, basicamente, em um conjunto de práticas que possibilitam um ambiente e condições de trabalho mais higiênico, eficiente e satisfatório, otimizando assim todo o processo produtivo. O conhecimento e o desenvolvimento das boas práticas permitem uma produção sistematizada e programada, com vantagens óbvias de produtividade e qualidade. Alguns dos itens de BPA merecem maior atenção, em especial os relacionados com práticas de higiene e o uso de insumos potencialmente tóxicos, e que, por isto, devem ser registrados, monitorizados e corrigidos, assim que forem verificados desvios que possam comprometer o produto final ou a saúde de pessoas.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABARCA *et al.* Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 60, p. 2650-2052, 1994.

ACOMPANHAMENTO DA SAFRA BRASILEIRA CAFÉ - Safra 2010 - Segunda estimativa: maio de 2010. Companhia Nacional de Abastecimento. - Brasília: CONAB, 2010.

AHMAD, R.; THARAPPAN, B.; BONGIRWAR, D. R. Impact of gamma irradiation on the monsooning of coffee beans. **Journal of Stored Products Research**, Oxford, v. 39, p. 149-157, 2003.

AQUINO, S. **Efeitos da radiação gama no crescimento de *Aspergillus flavus* produtor de aflatoxinas e no emprego da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) em amostra de grãos de milho inoculadas artificialmente.** 2003. 85 p. Dissertação (Mestre em Tecnologia Nuclear) - Universidade de São Paulo.

AZIZ, N. H.; EL-ZEANY, S. A.; MOUSSA, A. A. Influence of γ -irradiation and maize lipids on the production of aflatoxin B1 by *Aspergillus flavus*. **Nahrung Food**, Cairo, v. 46, n. 5, p. 327-331, Oct. 2002.

AZIZ, N. H.; MOUSSA, L. A. A. Influence of gamma irradiation on mycotoxin producing moulds and mycotoxins in fruits. **Food Control**, Oxford, v. 13, n. 4/5, p. 281-288, June/July 2002.

BAYMAN *et al.* Ochratoxin production by the *Aspergillus ochraceus* group and *Aspergillus alliaceus*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 68, p. 2.326-2.329, 2002.

BLANC *et al.* Behavior of ochratoxin A during green coffee roasting and soluble coffee manufacture. **Journal Agric. Food Chem.**, v. 46:673-675, 1998.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 21, de 26 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento para irradiação de alimentos. Publicada no Diário Oficial da União de 29 de janeiro de 2001.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. Publicada no Diário Oficial da União de 22 de fevereiro de 2011. Disponível em: <<http://www.abic.com.br/publique/media/IN07-2011-Ocratoxina.pdf>>. Acesso em: 22/12/2010.

BUCHELI *et al.* Development of ochratoxin A during robusta (*Coffea canephora*) coffee cherry drying. **Journal of Agricultural Food Chemistry**. 48 (4): 1358-1362, 2000.

CAMPOS *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**, Lavras, v. 4, n. 2, p. 136-148, jul./dez. 2009.

CHAULFON *et al.* Ocratoxina A em grãos de café beneficiados e sua relação com o padrão da bebida. II Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, 2001.

CIEGLER, A.; DETROY, R. W.; LILLEJOJ, E. B. Patulin, penicillic acid and other carcinogenic lactones. In: CIEGLER, A.; KADIS, S.; AJL, S. J. (Ed.). **Microbial toxins**, New York: Academic Press, 1971. v. 6, p. 409-434.

CREEPY *et al.* Effects of two metabolites of ochratoxin A, (4R)-4-hydroxyochratoxin A and ochratoxin a, on immune response in mice. **Infection and Immunity**. Washington, v. 39, n. 3, p. 1015-1018, 1983.

DORRENHAUS *et al.* Induction of unscheduled DNA synthesis in primary human urothelial cells by the mycotoxin ochratoxin A. **Toxicol. Sci.**, **53**, 271–277, 2000.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the Commission related to ochratoxin A in food. **The EFSA Journal**, v. 365, p. 1-56, 2006. Disponível em: <http://www.efsa.europa.eu/cs/BlobServer/Scientific_Opinion/contam_op_ej365_ochratoxin_a_food_en.pdf?ssbinary=true>. Acesso em: 22/12/2010.

FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS. **Reducing ochratoxin A in coffee**. Disponível em: <<http://www.coffee-ota.org/faq.asp>>. Acesso em: 22/12/2010.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS. Ochratoxin A (OTA): OTA in foodstuffs and associated regulations. In: _____. **Reducing Ochratoxin A in coffee**. Disponível em: <http://www.coffee-ota.org/ota_foodstuffs.asp>. Acesso em: 22/12/2010.

FERRAZ *et al.* Kinetics of ochratoxin A destruction during coffee roasting. **Food Control**, **21**, 872–877, 2010.

FRAGA, M. E.; SILVA, O. F.; CORRÊA, T. B. S. **Fungos potencialmente ocratoxígenos em café**. Rio de Janeiro: Embrapa Agroindústria de Alimentos, 24 p., 2003.

FREIRE *et al.* **Micotoxinas: importância na alimentação e na saúde humana e animal**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 48 p., 2007. (Embrapa Agroindústria Tropical. Documentos, 110).

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

GAUTIER *et al.* Metabolism of ochratoxin A: Absence of formation of genotoxic derivatives by human and rat enzymes. **Chem. Res. Toxicol.** (in press), 2001.

GOLLUCKE, A. P. B. Ocorrência de Ocratoxina A em café verde destinado à exportação proveniente de diversas regiões produtoras brasileiras. Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, 2002. Tese de Mestrado.

GOOD HYGIENE PRACTICES ALONG THE COFFEE CHAIN. Monitoring and analysis programmes: An Overview of Official Methods of Analysis. Disponível em: <http://www.coffee-ota.org/cd_hygiene/cnt/cnt_en/sec_6/docs_6.2/Overview%20on%20OTA%20sampling.pdf>. Acesso em: 22/12/2010.

GIROUX, M.; LACROIX, M. Nutritional adequacy of irradiated meat - a review. **Food Research International**, Amsterdam, v. 31, n. 4, p. 257-264, 1998.

GROSSE *et al.* Formation of ochratoxin A metabolites and DNA-adducts in monkey kidney cells. **Chemico-Biological Interactions**, 95, 175-187, 1995.

GROSSE *et al.* Retinol, ascorbic acid and α -tocopherol prevent DNA adduct formation in mice treated with the mycotoxins ochratoxin A and zearalenone. **Cancer Letters**, 114, 225-229, 1997.

HAUBECK *et al.* Immunosuppression by ochratoxin A and its prevention by phenylalanine. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 41, p. 1040-1042, 1981.

HEILMANN, W.; REHFELDT, A. G.; ROZOLL, F. Behavior and reduction of ochratoxin A in green coffee beans in response to various processing methods. **European Food Research and Technology**. 209:297-399, 1999.

INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION. **ICO Annual Review 2005/2006**. Disponível em: <<http://dev.ico.org/documents/review7e.pdf>>. Acesso em: 22/12/2010.

INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION. Regulamento (CE) Nº 123/2005. **Jornal Oficial da União Européia**. Bruxelas, Bélgica, 2005. Disponível em: <www.ico.org/documents>. Acesso em: 22/12/2010.

INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION. Revisão do Regulamento CE com respeito à ocratoxina A (OTA) e outros contaminantes, 2007. Disponível em: <<http://www.ico.org/documents/ed2007p.pdf>>. Acesso em: 22/12/2010.

JOOSTEN *et al.* Production of ochratoxin A by *Aspergillus carbonarius* on coffee cherries. **International Journal of Food Microbiology**. 65: 39-44, 2001.

KITCHEN, D. N., CARLTON, W.W. & TUIITE, J. Ochratoxin A and citrinin induced nephrosis in beagle dogs. I. Clinical and clinicopathological features. **Vet. Pathol.**, 14, 154-172, 1977b.

KUIPER-GOODMAN, T.; GRANT, D. L. Ochratoxin A. *WHO Food Additives Series* 28. Toxicological Evaluation Division, Health and Welfare, Canada. Disponível em:

<<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v28je19.htm>>. Acesso em: 22/12/2010.

LARSEN, T. O.; SVENDSEN, A.; SMEDSGAARD, J. Biochemical characterization of ochratoxin A – producing strains of the genus *Penicillium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 3.630-3.635, 2001.

LEUNG, M. C. K.; DIAZ-LLANO, G.; SMITH, T. K. Mycotoxins in pet food: a review on worldwide prevalence and preventative strategies. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 9.623-9.635, 2006.

MANOLOVA, Y, MANOLOV, G.; PARVANOVA, L. *et al.* Induction of characteristic chromosomal aberrations, particularly X-trisomy, in cultured human lymphocytes treated by ochratoxin A, a mycotoxin implicated in Balkan endemic nephropathy. **Mutation Research**, Amsterdam, n° 231, p. 143-149, 1990.

MANTLE, P. G. CHOW, A. M. Ochratoxin formation in *Aspergillus ochraceus* with particular reference to spoilage of coffee. **International Journal of Food Microbiology**, 56: 105-109, 2000.

MANUAL DE SEGURANÇA E QUALIDADE PARA A CULTURA DE CAFÉ. Brasília: EMBRAPA/SEDE, (Qualidade e Segurança dos Alimentos). Projeto PAS Campo. Convênio CNI/SENAI/SEBRAE/EMBRAPA, 83 p., 2004.

MATOSSIAN, M. K. Mold poisoning: an unrecognized English health problem, 1150-1800. **Medical History, England**, n. 1, v. 25, p. 73-84, 1981.

MATSUDA, A. H. **Aplicação da técnica de irradiação gama para preservação de própolis**. Universidade São Paulo, São Paulo. 2002. Tese de Mestrado.

NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM. *Technical Report on the Toxicology and Carcinogenesis Studies of Ochratoxin A (CAS No. 303–47-9) in F344 Rats (Gavage Studies)* (NIH Publication No. 89-2813), Research Triangle Park, NC: US Department of Health and Human Services, National Institutes of Health, 1989.

NORTHOLT, M. D.; BULLERMAN, L. B. Prevention of mould growth and toxin production through control of environmental conditions. **Journal of Food Protection**, v. 45, p. 519-526, 1982.

OBRECHT-PFLUMIO, S.; DIRHEIMER, G. In vitro DNA and dGMP adducts formation caused by ochratoxin A. **Chemico-biological Interactions**, 127, 29–44, 2000.

OTA-PRODUCERS IN COFFEE. Disponível em: <http://www.coffee-ota.org/otacoffee_what.asp>. Acesso em: 22/12/2010.

PALÁCIOS-CABRERA, H. *et al.* The production of ochratoxin A by *Aspergillus ochraceus* in raw coffee at different equilibrium relative humidity and under alternating temperatures, **Food Control**, v. 15, p. 531-535, 2004.

PALÁCIOS-CABRERA, H. P.; TANIWAKI, M. H. HASHIMOTO, J. M. MENEZES, H. C. Growth of *Aspergillus ochraceus*, *A. carbonarius* and *A. niger* on culture media at different water activities and temperatures. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 36, p. 24-28, 2005.

PARDO, E. *et al.* Occurrence of ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in green coffee from different origins. **International Journal of Food Science Technology**, v. 10, p. 45-50, 2004.

PARIZZI, F. C. **Incidência de Fungos da Pré-Colheita ao Armazenamento de Café**. Universidade Federal de Viçosa, 2005. Tese de Doutorado.

PEREIRA, R. T. G. **Diversidade e frequência de fungos associados a frutos e grãos de café**. UFLA, Lavras, 2005. Tese de doutorado.

PETZINGER, E.; ZIEGLER, K. Ochratoxin A from a toxicological perspective. **Journal Veterinary Pharmacology Terpay**, 23: 91-98, 2000.

PFOHL-LESZKOWICZ, A.; MANDERVILLE, R. A. Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. **Molecular Nutrition & Food Research**, vol. 51, pp. 61-99, 2007.

PITT, J. I. *Penicillium viridicatum*, *Penicillium verrucosum*, and production of ochratoxin **Applied Environmental Microbiology**, v. 53, p. 266-269, 1987.

PITTET, A., TORNARE, D., HUGGET, A., VIANI, R. Liquid chromatographic determination of ochratoxin A in pure and adulterated soluble coffee using an immunoaffinity column cleanup procedure. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 44:3564-3569, 1996.

PRADO *et al.*, Influência da radiação gama (60Co) na ocratoxina A e na microbiota fúngica de café (*Coffea Arabica* L.). **R. Bras. Armaz., Viçosa - Especial Café**, MG, n. 10, p. 42 - 48, 2008.

PRADO *et al.* Effect of gamma irradiation on the inactivation of aflatoxin B1 and fungal flora in peanut. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 34, Supplement 1, p. 138-140, 2003.

ROBERTO, C. D. **Aplicação dos princípios do sistema APPCC para avaliação da segurança do café no processamento pós-colheita**. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2008. Tese de Doutorado.

SANTOS, E. A. **Avaliação da degradação de ocratoxina A em café durante a torrefação**. UFMG, Belo Horizonte, 2004. Dissertação de Mestrado.

TANIWAKI *et al.* The source of ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to processing methods. **International Journal of Food Microbiology**, 82:173-179, 2003.

TANIWAKI *et al.* An update on ochratoxin A in coffee after 10 years of research. 22nd International Conference on Coffee Science, ASIC 2008, Campinas, SP, Brazil, 14-19 September, 2008.

TÉREN *et al.* Immunochemical detection of ochratoxin A in black *Aspergillus* strains. **Mycopathologia**, v. 134, p. 171-186, 1996.

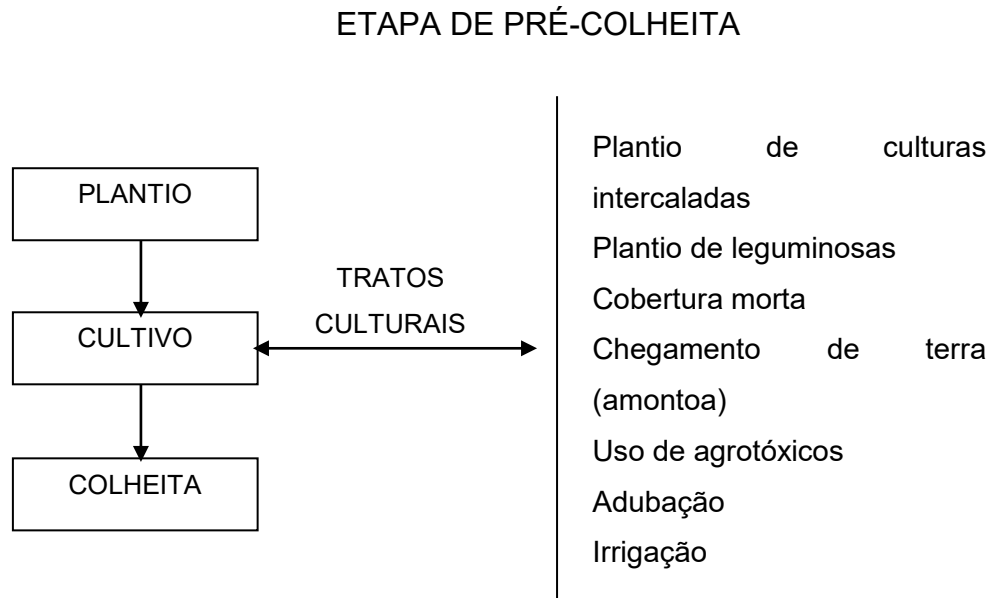
TÉREN, J; PALÁGYI, A.; VARGA, J. Isolation of ochratoxin producing *Aspergilli* from Green coffee beans of different origin. **Cereal Research Communications**. 25 (3/1): 303-302, 1997.

THIRD JOINT FAO/WHO/UNEP INTERNATIONAL CONFERENCE ON MYCOTOXIN. Mycotoxins of growing interest. Tunis, Tunisia, 3-6 March 1999. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/myco5b.pdf>. Acesso em: 22/12/2010

ZEPNIK *et al.* Ochratoxin A induced tumour formation: Is there a role of reactive ochratoxin A metabolites? **Toxicol. Sci.** (in press), 2000.

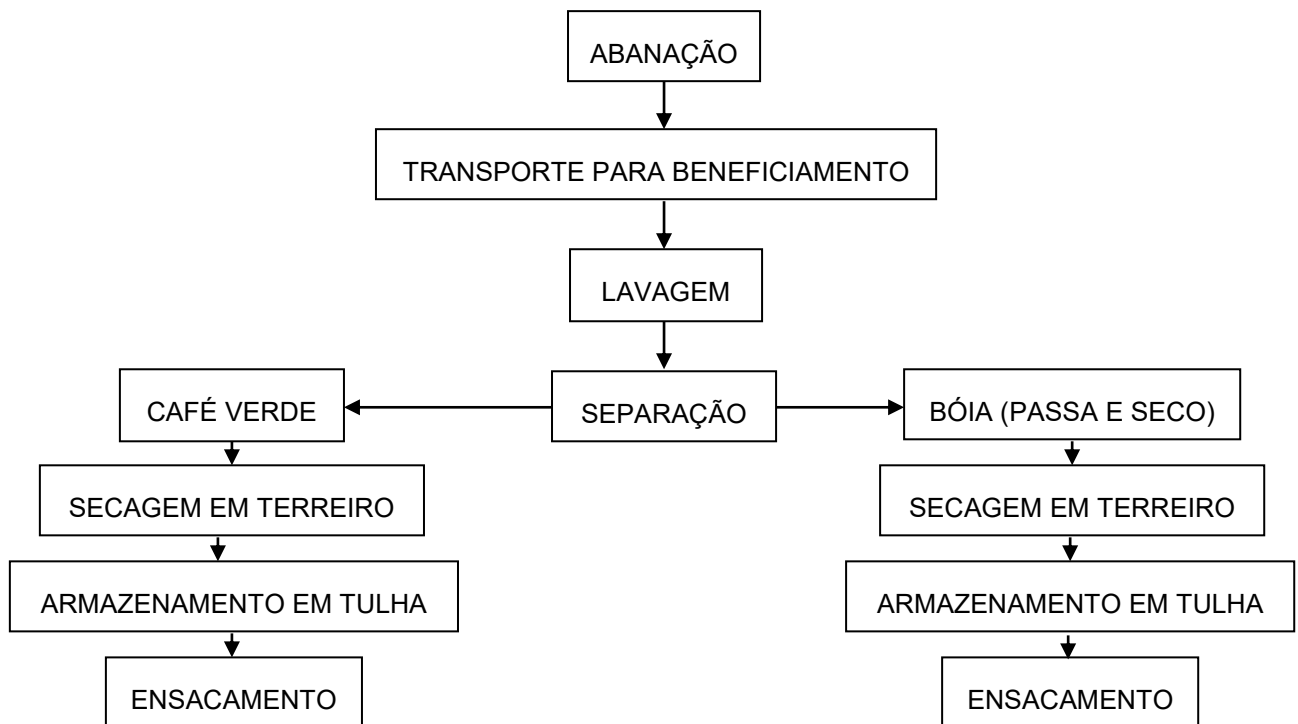
ANEXO A – FLUXOGRAMAS DE PRODUÇÃO

Fluxograma 1. Etapas de pré-colheita e pós-colheita



Fonte: Manual de Segurança e Qualidade para a Cultura do Café, 2004

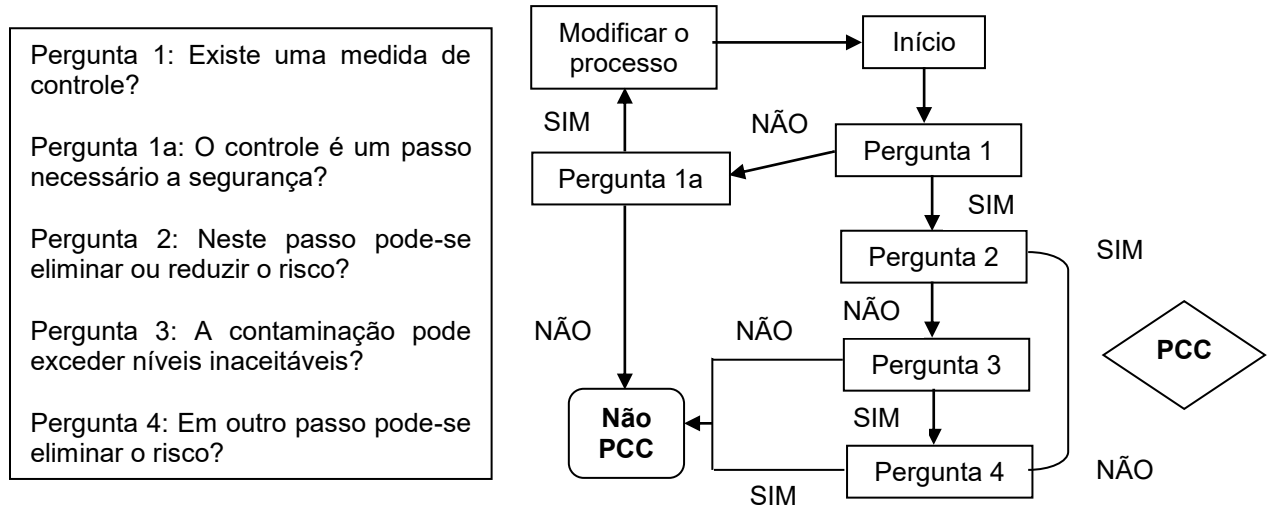
ETAPA DE PÓS-COLHEITA (CAFÉ DERRIÇADO)



Fonte: Manual de Segurança e Qualidade para a Cultura do Café, 2004

ANEXO B – FLUXOGRAMA DECISÓRIO PARA IDENTIFICAÇÃO DE PONTOS CRÍTICOS DE CONTROLE

Fluxograma 2. Fluxograma decisório para Identificação de Pontos Críticos de Controle



Fonte: PEREIRA, 2006.

ANEXO C - ANÁLISE DE PERIGOS

Formulário A: Análise de Perigos na Etapa de Pré-Colheita – Produto: Café

Etapas do processo	Perigos	Justificativa	Severidade	Risco	Medidas Preventivas
Plantio	Perigo Biológico: Nenhum Perigo Físico: Nenhum Perigo Químico: Nenhum	-	-	-	-
Cultivo/ Uso de agrotóxicos	Perigo Biológico: Nenhum Perigo Físico: Nenhum Perigo Químico: Resíduos de agrotóxicos	Uso inadequado ou não cumprimento do período de carência.	Alta	Médio	BPA: procedimentos de aplicação e cumprimento do receituário agrônomo e das instruções de uso do fabricante.
Cultivo/ Adubação mineral	Perigo Biológico: Nenhum Perigo Físico: Nenhum Perigo Químico: Nenhum	-	-	-	-
Cultivo/ Irrigação	Perigo Biológico: Nenhum Perigo Físico: Nenhum Perigo Químico: Nenhum	-	-	-	-
Colheita	Perigo Biológico: Nenhum Perigo Físico: Nenhum Perigo Químico: Ocratoxina	Frutos danificados, deteriorados e em estágio avançado de maturação facilitam o desenvolvimento de fungos produtores.	Alta	Médio	BPA: procedimentos de controle de pragas, colheita no estágio correto com predominância do café cereja. Treinamento e capacitação dos colhedores. Planejamento da colheita, observando maturação uniforme do fruto.

Data: _____

Aprovado por: _____

Fonte: Manual de Segurança e Qualidade para a Cultura do Café, 2004

Formulário A: Análise de Perigos na Etapa de Pós-Colheita – Produto: Café

Etapas do processo	Perigos	Justificativa	Severidade	Risco	Medidas Preventivas
Abanação	Perigo Biológico: Nenhum Perigo Físico: Folhas, pedras e paus Perigo Químico: Nenhum	Ocorrência comum pelo processo de derriça.	Média	Alto	BPA: treinamento e capacitação, manutenção das peneiras.
Transporte para beneficiamento	Perigo Biológico: Nenhum Perigo Físico: Nenhum Perigo Químico: Nenhum	-	-	-	-
Lavagem	Perigo Biológico: Nenhum Perigo Físico: Nenhum Perigo Químico: Nenhum	-	-	-	-
Separação	Perigo Biológico: Nenhum Perigo Físico: Nenhum Perigo Químico: Ocratoxina A (OTA)	A possibilidade de presença de OTA no café bóia	Alta	Médio	Separar efetivamente e manter separação do café bóia do verde e cereja, até o final do processo. Treinamento e capacitação dos operadores.
Secagem em terreiro (cereja, verde e bóia)	Perigo Biológico: Nenhum Perigo Físico: Nenhum Perigo Químico: Ocratoxina A (OTA)	Contaminação e/ou multiplicação do fungo produtor.	Alta	Alto	BPA: Instalações do terreiro, programa de limpeza, procedimentos de esparramação, enleiramento e revolvimento do café no terreiro. Garantia de processo de secagem rápido e uniforme até atingir nível de umidade máximo de 13%.

Etapas do processo	Perigos	Justificativa	Severidade	Risco	Medidas Preventivas
'Armazenamento na tulha (cereja, verde e bóia)	Perigo biológico: Nenhum Perigo físico: Inseto e roedores. Perigo Químico: Ocratoxina	Falhas no programa de controle integrado de pragas, permitindo proliferação de pragas. Condições inadequadas de armazenamento (ventilação, umidade, temperatura, etc.) que favoreçam a multiplicação do fungo produtor.	Baixa Alta	Médio Alto	BPA: programa de manejo integrado de pragas, limpeza das instalações. Boas Práticas de armazenamento e de controle das condições de temperatura e umidade relativa da tulha.
Ensacamento (cereja, verde e bóia)	Perigo Biológico: Nenhum Perigo Físico: Nenhum Perigo Químico: Nenhum	-	-	-	-
Expedição	Perigo Biológico: Nenhum Perigo Físico: Nenhum Perigo Químico: Nenhum	-	-	-	-

Data: _____ Aprovado por: _____

Fonte: Manual de Segurança e Qualidade para a Cultura do Café, 2004

ANEXO D – DETERMINAÇÃO DOS PC/PCC

Formulário B: Determinação dos PC/PCC na Etapa de Pré-Colheita – Produto: Café

Etapa do processo	Perigos significativos (biológicos, químicos e físicos)	O perigo é controlado pelo programa de pré-requisitos? Se sim, é importante considerar como PC?	Questão 1 Existem medidas preventivas para o perigo?	Questão 2 Esta etapa elimina ou reduz o perigo a níveis aceitáveis?	Questão 3 O perigo pode aumentar a níveis inaceitáveis em outra etapa?	Questão 4 Uma etapa subsequente eliminará ou reduzirá o perigo a níveis aceitáveis?	PC/PCC
Cultivo/ Uso de agrotóxicos	Perigo Químico: Resíduos de agrotóxicos	Sim/ Sim	-	-	-	-	PC
Colheita	Perigo Químico: Ocratoxina A	Sim/ Sim	-	-	-	-	PC
Abanação	Perigo Físico: folhas, pedras e paus	Sim/ Sim	-	-	-	-	PC
Separação	Perigo Químico: Ocratoxina A (OTA)	Sim/ Sim	-	-	-	-	PC
Secagem em terreiro (cereja, verde e bóia)	Perigo Químico: Ocratoxina A (OTA)	Não	Sim	Não	Sim	Não	PCC1 (0)

Data: _____ Aprovado por: _____

Fonte: Manual de Segurança e Qualidade para a Cultura do Café, 2004

Formulário B: Determinação dos PC/PCC na Etapa de Pós-Colheita – Produto: Café

Etapa do processo	Perigos significativos (biológicos, químicos e físicos)	O perigo é controlado pelo programa de pré-requisitos? Se sim, é importante considerar como PC?	Questão 1 Existem medidas preventivas para o perigo?	Questão 2 Esta etapa elimina ou reduz o perigo a níveis aceitáveis?	Questão 3 O perigo pode aumentar a níveis inaceitáveis em outra etapa?	Questão 4 Uma etapa subsequente eliminará ou reduzirá o perigo a níveis aceitáveis?	PC/PCC
Armazenamento na tulha (cereja, verde e bóia)	Perigo Físico: Insetos e roedores	Sim/ Sim	-	-	-	-	PC
	Perigo Químico: Ocratoxina	Não	Sim	Não	Sim	Não	PCC2 (0)

Data: _____ Aprovado por: _____

Fonte: Manual de Segurança e Qualidade para a Cultura do Café, 2004

ANEXO E – RESUMO DO PLANO APPCC

Formulário C: Resumo do Plano APPCC na Etapa de Pré-Colheita – Produto: Café

Etapa	PC/ PCC	Perigo	Medidas Preventivas	Limite Crítico	Monitorização	Ação Corretiva	Registro	Verificação
Cultivo/ Uso de agrotóxicos	PC (0)	Resíduos de agrotóxicos	BPA: Procedimentos de aplicação e cumprimento do receituário agrônomo e das instruções de uso do fabricante.	Obediência às prescrições do receituário agrônomo do fabricante.	O que? Uso de agrotóxicos Como? Observação visual Quando? A cada aplicação Quem? Aplicador	Estender período de carência, calibração dos equipamentos; Correção das soluções e da aplicação.	Planilha	Programa de treinamento nos procedimentos de uso e aplicação; Supervisão; Programa de coleta e análise de amostras; Programa de calibração de equipamentos.
Colheita	PC (0)	Ocratoxina	BPA: Procedimentos de controle de pragas; colheita no estágio correto com predominância do café cereja; Treinamento e capacitação dos colhedores; Planejamento da colheita, observando maturação uniforme do fruto.	Mínimo 70% dos frutos maduros.	O que? Frutos. Como? Observação visual. Quando? Durante colheita. Quem? Colhedor.	Interromper colheita; colher seletivamente os frutos maduros (cereja).	Planilha	Programa de treinamento e capacitação; supervisão de campo; Revisão do planejamento da colheita.

Data: _____ Aprovado por: _____

Fonte: Manual de Segurança e Qualidade para a Cultura do Café, 2004

Formulário C: Resumo do Plano APPCC na Etapa de Pós-Colheita – Produto: Café

Etapa	PC/ PCC	Perigo	Medidas Preventivas	Limite Crítico	Monitorização	Ação Corretiva	Registro	Verificação
Abanação	PC (F)	Folhas, pedras e paus.	BPA: Treinamento e capacitação; manutenção das peneiras.	4% de impurezas	O que? Impurezas. Como? Observação visual. Quando? A cada processo. Quem? Responsável pela operação.	Reprocessar (repetir a abanação)	Planilhas de controle	Supervisão e análises das planilhas; Programa de amostragem a análise.
Separação	PC (0)	Ocratoxina A (OTA)	Separa efetivamente e manter separação do café bóia do verde e cereja; Treinamento e capacitação dos operadores.	Menos de 2% de café bóia, no café cereja e verde já separado.	O que? Café bóia. Como? Observação visual. Quando? A cada separação. Quem? Responsável pela operação	Reprocessar (repetir a separação)	Planilhas de controle	Supervisão e análises das planilhas; Programa de amostragem a análise
Secagem em terreiro (cereja, verde e bóia)	PCC1 (0)	Ocratoxina A (OTA)	BPA: Instalações do terreiro, programa de limpeza, procedimentos de esparramação, enleiramento e revolvimento do café no terreiro. Garantia de processo de secagem rápido e uniforme até atingir nível de umidade máximo de 13%.	Máximo de 13% de umidade no Final.	O que? Umidade. Como? Medidor de umidade. Quando? Diariamente. Quem? Supervisor.	Otimizar secagem; Aumentar frequência de revolvimento; Diminuir espessura da camada de grãos; Complementar com secagem mecânica.	Planilhas de controle	Supervisão e análises das planilhas; Programa de amostragem a análise
Armazenamento na tulha (cereja, verde e bóia)	PC (F)	Insetos e roedores	BPA: programa de manejo integrado de pragas; limpeza das instalações	Ausência de evidências de pragas.	O que? Evidência de pragas. Como? Observação visual. Quando? Diário Quem? Supervisor	Identificar o Programa Integrado de Pragas.	Planilhas de evidências de pragas.	Programa de treinamento e capacitação; Inspeção.

Etapa	PC/ PCC	Perigo	Medidas Preventivas	Limite Crítico	Monitorização	Ação Corretiva	Registro	Verificação
Armazenamento na tulha (cereja, verde e bóia)	PCC2 (0)	Ocratoxina A (OTA)	Boas Práticas de armazenamento e de controle das condições de temperatura e umidade relativa da tulha.	Máximo de 13% de umidade do grão, máximo de 70% de umidade relativa do ambiente.	O que? Umidade dos grãos do ambiente. Como? Medidor de umidade (grãos) e higrômetro (ambiente). Quando? Diariamente Quem? Supervisor.	Corrigir umidade do ambiente (ventilação); reprocessar secagem dos grãos.	Planilha de umidade do grão e do ambiente.	Supervisão, análise das planilhas; Programa de coleta e análise de amostras de OTA e umidade.

Data: _____ Aprovado por: _____

Fonte: Manual de Segurança e Qualidade para a Cultura do Café, 2004

ANEXO F – AVALIAÇÃO DA INGESTÃO DE OTA DEVIDO AO CONSUMO DE CAFÉ

Tabela 9. Ocorrência de OTA em café torrado nos países membros da União Europeia

País membro	N° de amostras	N° de amostras positivas	Limite de Detecção	Média do nível de Ocratoxina A em alimentos (µg/kg)		
				Média 1	Média 2	Variação
Dinamarca	11	11	0,1	0,51	0,51	0,17-3,57
Finlândia	36	17	0,2-0,5	0,51	0,89	<LOD – 3,00
França	34	3	0,3	0,58	1,04	<LOD – 7,00
Alemanha	183	76	0,3	0,54	1,07	<LOD – 6,32
Grécia	16	10	0,5	1,79	2,72	<LOD – 7,20
Itália	198	49	0,05 – 1	0,55	1,8	<LOD – 11,5
Noruega	50	22	0,1	0,29	0,41	<LOD – 4,10
Portugal	33	6	0,3	0,60	1,54	<LOD – 2,7
Espanha	29	29	0,11	1,17	1,17	0,22 – 5,64
Suécia	20	19	0,01	0,16	0,37	0,07 – 1,2
Holanda	158	64	0,13 – 1	0,81	1,54	<LOD – 5,00
Reino Unido	20	17	0,1	0,60	0,70	<LOD – 2,10

Fonte: Adaptada de http://europa.eu.int/comm/food/fs/scoop/3.2.7_en.pdf

ANEXO G – RESUMO DOS DOIS PRINCIPAIS MÉTODOS ANALÍTICOS PARA A OCRATOXINA A EM CAFÉ

Há cinco fases distintas de qualquer sistema de análise de micotoxinas, a amostragem, a preparação da amostra, extração, limpeza, separação e determinação (MONACI & PALMISANO, 2004).

Preparo da amostra

A preparação das amostras é um passo crítico no processo analítico e contribui para a variabilidade do resultado do teste. A preparação da amostra é demorado e envolve a moagem e preparação de homogeneização, antes de proceder com a extração da ocratoxina A (OTA). Níveis de concentração de OTA em amostras de café são dependentes do tamanho da partícula. A análise das frações de café verde (14-28 mesh) mostraram que a maior contaminação foi determinado na fração mais fina do café verde (28 mesh) (Vargas, Santos & Castro, 2001). O laboratório, levando em conta suas instalações, devem validar os processos de trituração e homogeneização (Vargas et al. 2001).

METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DE OCRATOXINA A POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) EM CAFÉ VERDE, MILHO E FEIJÃO.

Esta metodologia fundamenta-se na extração da ocratoxina A pela solução de metanol: bicarbonato de sódio a 3% (1:1, v/v); purificação do extrato por coluna de imunoafinidade; separação, detecção e quantificação da ocratoxina A por CLAE.

Procedimentos

Extração

- Pesar 25 g da amostra (café, milho ou feijão) moída, à temperatura ambiente, em frasco de vidro;
- Adicionar 200 mL da solução de metanol: bicarbonato de sódio 3 % (1: 1, v/v);

- Agitar em mixer por 10 minutos, à velocidade média;
- Filtrar em papel de filtro pregueado;
- Recolher e filtrar à vácuo em membrana de fibra de vidro;
- Pipetar 10 mL do filtrado para amostras de café e 5 mL para amostras de outras matrizes e transferir para balão de 100 mL;
- Completar o volume com solução tampão PBS e homogeneizar.



Figura 7. Extração de OTA em amostra de café verde com solução metanol:bicarbonato de sódio

Fonte: *Good Hygiene Practices along the coffee chain*, FAO, 2010.

Purificação

- Adaptar urna seringa de plástico de 60 mL à coluna de imunoafinidade *OchraTest*, utilizando um adaptador, e conectá-la a um sistema de filtração à vácuo com controle individual de fluxo;
- Transferir todo o conteúdo do balão de 100 mL para a coluna e deixar passar através desta com um fluxo de 2-3 mL/min (não deixar a coluna secar);
- Lavar a coluna com 10 mL de água deionizada, utilizando pipeta de Pasteur;
- Passar ar pela coluna;
- Eluir a ocratoxina com 4 mL de metanol HPLC ou p.a.r., utilizando pressão positiva, controlando o fluxo por meio do êmbolo da seringa (2-3 mL/min);
- Evaporar o eluato até completa secura, sob fluxo de nitrogênio, em banho de água com agitação a aproximadamente 40°C.



Figura 8. Purificação através da utilização de coluna de imunoafinidade

Fonte: *Good Hygiene Practices along the coffee chain*, FAO, 2010.

Separação, detecção e quantificação

- Dissolver o resíduo obtido na etapa de purificação com 300 mL de metanol: ácido acético (99:1, v/v) e homogeneizar, utilizando agitador de tubos;
- Injetar 100 μ L do extrato, da amostra e soluções padrão de ocratoxina A no cromatógrafo líquido, com microseringas, nas condições cromatográficas especificadas para determinação de ocratoxina A;
- Condições cromatográficas: coluna Shimpack C₁₈ CLC ODS (M) 250 x 4,6 mm, acetonitrila: metanol: água: ácido acético (35:35:29:1 v/v/v/v) como fase móvel,
- Fluxo de 0,8 mL/min, volume de injeção de 20 μ L, detector de fluorescência com excitação em 332 nm e emissão em 476 nm;
- Com base na curva padrão de calibração, calcular a concentração de ocratoxina A presente na amostra.

Confirmação

- Transferir 100 μ L do extrato purificado retomado com metanol: ácido acético (99: 1, v/v) para um frasco de 2 mL e evaporar até securo sob fluxo de nitrogênio;
- Transferir 100 μ L de uma solução padrão da curva de calibração, concentração intermediária, para outro frasco de 2 mL e evaporar até securo sob fluxo de nitrogênio;
- Adicionar a cada frasco 300 μ L de trifluoreto de boro a 14 % em metanol (reagente derivatizante);

- Injetar no cromatógrafo líquido nas condições cromatográficas especificadas para determinação de ocratoxina A;
- A presença de ocratoxina A nas amostras é confirmada pelo desaparecimento do pico correspondente à amostra e pelo aparecimento de um novo pico em tempo de retenção maior.

METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DE OCRATOXINA A EM CAFÉ VERDE POR CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA

O desenvolvimento, padronização e validação desta metodologia foi realizada em cooperação com o Programa Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento do Café (PNPeD Café), Subprojeto: 19.1998.354-01.

Esta metodologia fundamenta-se na extração da ocratoxina A (OTA) pela solução de metanol: bicarbonato de sódio a 3% (1:1, v/v); purificação do extrato em coluna de imunoafinidade; separação por cromatografia de camada delgada (CCD); e detecção e quantificação por análise visual e/ou densitométrica.

Procedimentos

Extração

Todo procedimento de análise deve ser executado sob proteção de luz solar (UV).

- Pesar 25 g da amostra previamente moída (granulometria < 20 mesh), à temperatura ambiente, em frasco de borosilicato;
- Adicionar 200 mL da solução de metanol:bicarbonato de sódio 3 % (1:1, v/v);
- Homogeneizar por 5 minutos, à velocidade média (7-8 brpm);
- Filtrar em papel de filtro qualitativo, pregueado;
- Recolher e filtrar utilizando o conjunto para filtração a vácuo;
- Pipetar 4 mL do filtrado e transferir para balão âmbar de 100 mL;
- Completar o volume com solução tampão PBS e homogeneizar.

Purificação

- Adaptar um reservatório (seringa de polipropileno de 60 mL) à coluna de imunoafinidade e conectá-la a um sistema de filtração a vácuo com controle individual de fluxo;
- Transferir todo o conteúdo do balão de 100 mL para o reservatório adaptado à coluna de imunoafinidade e passar através desta com um fluxo de 2-3 mL/min (não deixar a coluna secar);
- Lavar a coluna com 10 mL de água deionizada;
- Passar ar pela coluna de imunoafinidade;
- Substituir o reservatório de 60 mL por uma seringa de vidro de 10 mL e garantir a retirada de resíduos de água passando ar pela coluna de imunoafinidade com o êmbolo da seringa;
- Conectar uma torneira à coluna de imunoafinidade;
- Adicionar 4 mL de metanol HPLC ou p.a.r. ao reservatório da coluna de imunoafinidade, manter a torneira fechada e fazer pressão positiva com o êmbolo da seringa até que o metanol entre em contato com os anticorpos da coluna;
- Deixar o metanol em contato com os anticorpos da coluna de imunoafinidade por 3 minutos;
- Eluir a OTA, utilizando pressão positiva, controlando o fluxo por meio do êmbolo da seringa (2-3 mL/min);
- Evaporar o eluato até a secura, sob fluxo de nitrogênio, em banho de água com agitação a aproximadamente 40 °C.

Separação, detecção e quantificação

- Dissolver o resíduo obtido na etapa de purificação com 100 mL de tolueno: ácido acético (99:1, v/v) e homogeneizar por 60s, utilizando agitador de tubos;
- Aplicar volumes de 1 a 10 µL da solução padrão trabalho de OTA e 20 mL do extrato da amostra em placa de CCD;
- Eluir a placa de CCD, em cuba não saturada, com tolueno: acetato de etila: ácido fórmico (6:3:1, v/v/v);
- Deixar a placa secar por 10 min, sob exaustão, protegida de umidade e de luz;

- Realizar a análise visual por observação da placa de CCD sob luz UV a $\lambda 365\text{nm}$, comparando a intensidade de fluorescência apresentada pelas amostras com as do padrão. No caso de intensidades intermediárias, considerar uma média dos pontos adjacentes;
- Fazer a leitura densitométrica utilizando lâmpada de mercúrio, modo fluorescência em $\lambda 324\text{nm}$;
- Calcular a concentração de OTA presente na amostra utilizando a fórmula:

Quantificação visual:

OTA ($\mu\text{g}/\text{kg}$) =

Quantificação densitométrica:

OTA ($\mu\text{g}/\text{kg}$) =

em que:

OTA ($\mu\text{g}/\text{kg}$) > determinação da OTA na amostra;

CP > Concentração do padrão ($\mu\text{g}/\text{mL}$);

M1 > Massa da amostra (g);

M2 > massa da toxina determinada por densitometria (ng);

V1 > Volume de extração (mL);

V2 > Volume da alíquota da amostra teste (mL);

V3 > Volume de dissolução da amostra (μl);

V4 > Volume do extrato aplicado em placa (μl);

V5 > Volume do padrão ao qual a fluorescência da amostra foi comparado (μl).

Confirmação

- Derivatizar a placa borrifando com solução alcoólica de bicarbonato de sódio alcoólico e observar a fluorescência da OTA sob luz UV no cromatovisor ($\lambda=365\text{nm}$). A fluorescência da OTA mudará de verde para azulada.

ANEXO H – PRINCIPAIS MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE OCRATOXINA A EM CAFÉ

74

Tabela 7. Principais Características dos métodos para determinação de ocratoxina A em café

Matriz	Purificação	Deteção/ quantificação	LD/LQ (µg/kg)	Recuperação (%)	(%) desvio padrão relativo	Referência
Café verde	Celite/bicarbonato	CCD visual	Dados não disponíveis	83,5 (55-101)	Dados não disponíveis	Levi, 1974
Café verde	Celite/bicarbonato	CCD visual	20	69 (60,5-85,6)	DPR _r : 21-32 DPR _R :16-25	Levi, 1975
Café verde	Celite/bicarbonato	CCD visual	20	Dados não disponíveis	Dados não disponíveis	AOAC 975.38
Café verde “brew”	Celite/bicarbonato	CCD densitômetro	Dados não disponíveis	Dados não disponíveis	Dados não disponíveis	Tsubouchi <i>et al.</i> , 1987
Café verde	Partição líquido-líquido celite/bicarbonato	CLAE	0,4		5,6-7,1	Cantáfora <i>et al.</i> , 1983
Café verde, instantâneo, torrado bebida	Partição líquido-líquido/ SPE: C18 sep-pak	CLAE	5 2 2 0,2	89,5; 80,7 81,5 89,7 92,1	3,74; 4,26 5,93 3,43 5,78	Terada <i>et al.</i> , 1986
Café verde	Celite/bicarbonato	CCD densitômetro	Dados não disponíveis	Dados não disponíveis	Dados não disponíveis	Tsubouchi <i>et al.</i> , 1987
Torrado moído	Partição líquido-líquido/ SPE: C18 sep-pak	CLAE	-	Dados não disponíveis	Dados não disponíveis	Tsubouchi <i>et al.</i> , 1988
Café verde torrado	Partição líquido-líquido, celite/bicarbonato	CLAE	0,01	90-95 Dados não disponíveis	2,4 Dados não disponíveis	Micco <i>et al.</i> , 1989

Obs: CCD=cromatografia de camada delgada; CLAE=cromatografia líquida de alta eficiência; SPE=: extração de fase sólida; DPR_r:= desvio padrão relativo de repetibilidade; DPR_R:= desvio padrão relativo de reprodutibilidade; IAC=coluna de imunoafinidade; LQ/LD limites de deteção/quantificação.

Tabela 7 (continuação): Principais Características dos métodos para determinação de ocratoxina A em café

Matriz	Purificação	Deteção/ quantificação	LD/LQ (µg/kg)	Recuperação (%)	(%) desvio padrão relativo	Referência
Café verde, Torrado Instaneo Bebida enlatada	IAC preparada "in- house"	CLAE	0,5 - 0,5 0,025	102,6 99,4 102,8 104,1	1,11 4,56 4,42 3,49	Nakajima <i>et al.</i> , 1990
Café verde e torrado	Partição líquido- líquido, celite/ Bicarbonato	CLAE	0,5 1,0 1,0	Dados não disponíveis	Dados não disponíveis	Studer- Rohr <i>et al.</i> , 1994
Café verde e torrado	Partição líquido- líquido e celite/ bicarbonato	CLAE	0,5 1,0 1,0	97 116 87	5-12	Studer- Rohr <i>et al.</i> , 1995
Café verde Torrado e Solúvel	IAC	CLAE	0,2	99 (90-108) 93 (89-100) 92 (80-103)	0,5-5,0	Pittet <i>et al.</i> , 1996
Café instantâneo e torrado	Partição líquido- líquido e celite/ bicarbonato com e sem IAC Somente IAC Silica sep-pak	CLAE	0,2-1,0 0,2-1,0 (9 laboratórios)	Dados não disponíveis	NC (amostras naturalmente contaminadas)	van der Stegen <i>et al.</i> , 1997

Obs: CCD=cromatografia de camada delgada; CLAE=cromatografia líquida de alta eficiência; SPE=: extração de fase sólida; DPR_r:= desvio padrão relativo de repetibilidade; DPR_R:= desvio padrão relativo de reprodutibilidade; IAC=coluna de imunoafinidade; LQ/LD limites de deteção/quantificação.

Tabela 7 (continuação): Principais Características dos métodos para determinação de ocratoxina A em café

Matriz	Purificação	Deteccção/ quantificação	LD/LQ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Recuperação (%)	(%) desvio padrão relativo	Referência
Café solúvel Café torrado	IAC preparada (0.8-1.0 μg capacidade de ligação)	CLAE	0.1	98	Dados não disponíveis	Nakajima <i>et al.</i> , 1997
Café solúvel e Café torrado	Celite e bicarbonato silica gel e IAC	CLAE	0.1	91 (70-110) 84 (70-98)	5,1	Patel <i>et al.</i> , 1997
	Silica sep-pak e IAC			87	4,8	
Café torrado	IAC	CLAE	0.1	75 (59-83)	Dados não disponíveis	Jørgensen, 1998
Café verde Café torrado	IAC	CLAE	0,03	86-90 75-81	2,3-8,8 3,1-3,8	Trucksess <i>et al.</i> , 1999
Café torrado	Fenil silano /IAC	CLAE	0,1	85 (65-97)	DPR _r : 6 DPR _R :13 DPR _r : 2-27 DPR _R :14-71	Entwisle <i>et al.</i> , 2001

Obs: CCD=cromatografia de camada delgada; CLAE=cromatografia líquida de alta eficiência; SPE=: extração de fase sólida; DPR_r:= desvio padrão relativo de repetibilidade; DPR_R:= desvio padrão relativo de reprodutibilidade; IAC=coluna de imunoafinidade; LQ/LD limites de deteção/quantificação.

Tabela 7 (continuação): Principais Características dos métodos para determinação de ocratoxina A em café

Matriz	Purificação	Deteção/ quantificação	LD/LQ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Recuperação (%)	(%) desvio padrão relativo	Referência
Café torrado	Aminopropil (NH_2)/IAC	CLAE	Dados não disponíveis	72-84	Dados não disponíveis	Sibanda <i>et al.</i> , 2002
Café verde	Partição líquido- líquido	CCD visual Bi- dimensional	10	Dados qualitativos não disponíveis	Dados não disponíveis	Pittet e Royer, 2002
Café verde	IAC	TLC visual	0,5	82-109	0,0-18,8	Santos e Vargas, 2002
		CCD densitometria		83,7-133	0,0-14,4 - 24,9	
					9,3-20,3	
Café verde	IAC	CLAE	0.1	85 (65-97)	DPR _r : 7,42 DPR _R :16,34 DPR _r : 9-16 DPR _R :20-29	Vargas <i>et al.</i> , 2002

Obs: CCD=cromatografia de camada delgada; CLAE=cromatografia líquida de alta eficiência; SPE=: extração de fase sólida; DPR_r:= desvio padrão relativo de repetibilidade; DPR_R:= desvio padrão relativo de reprodutibilidade; IAC=coluna de imunoafinidade; LQ/LD limites de deteção/quantificação.

Fonte: Santos, 2004