

**Eliene Alves dos Santos**

**AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DE  
OCRATOXINA A EM CAFÉ DURANTE A  
TORREFAÇÃO**

**Escola de Engenharia da UFMG**

**Belo Horizonte, MG**

**2004**

Eliene Alves dos Santos

# **AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DE OCRATOXINA A EM CAFÉ DURANTE A TORREFAÇÃO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química da Escola de Engenharia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de **Mestre em Engenharia Química**.

**Orientadora:** Prof. Adriana Silva França, Ph.D

**Escola de Engenharia da UFMG**

**Belo Horizonte, MG**

**2004**



À Deus por toda força.

Ao Everton, pelo amor, compreensão e apoio.

Aos meus filhos Humberto e Cecília fonte de amor, alegria e motivação.

Aos meus pais e irmãos pelo incentivo.

À Maxilene pela dedicação.

À todos que acreditaram.

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

---

Ao Laboratório de Controle de Qualidade e Segurança Alimentar (LACQSA) do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento pelo apoio na realização deste Curso.

À Responsável Técnica do LACQSA Eugênia Azevedo Vargas, grande responsável pela realização deste trabalho, pela amizade, confiança e apoio irrestrito.

À Professora Adriana Silva França, pela orientação durante o desempenho deste trabalho.

Ao Dr. Antonio de Pádua Nacif – PNP&D Café pelo apoio financeiro.

Ao Dr. Francisco Barbosa Lima, Departamento de Café de Londrina – MAPA/Paraná, pela coleta criteriosa das amostras

## **AGRADECIMENTOS**

---

A toda equipe do Laboratório de Controle de Qualidade e Segurança Alimentar (LACQSA)/MAPA, meus colegas de trabalho, que muito me incentivaram na realização desse trabalho e em especial:

Regina, Jesiane e Fabrício responsáveis pelo preparo das amostras;  
Silésia, Beatriz e Ana Paula a pelo apoio na análise para determinação de ocratoxina A nas amostras de café;  
Luciana e Cristiane pelo incentivo e convivência  
Rosinalva de Almeida Preis, pela amizade, incentivo e companheirismo.  
Thaís Alves de Sá, pela amizade, incentivo e companheirismo.

A equipe do Laboratório de Café do Departamento de Engenharia Química da UFMG, alunos da professora Adriana França, que muito contribuíram para a execução desse trabalho, realizando de forma criteriosa a torra do café.

Anna Luíza Sampaio Vasconcelos  
Brenda Marise Oliveira Custódio  
Cláudia Giacomini Bof  
Érica Cistina Avelar  
Geovana Silva Lopes  
Juliana Capanema Ferreira Mendonça  
Lorena Batomarco  
Melissa de Abreu Andrade Rodrigues  
Mílvia Oliveira dos Reis  
Rodrigo Ribeiro da Silva Camargos

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

## RESUMO

---

A presença de ocratoxina A (OTA) nos alimentos é um problema que vem preocupando o mundo inteiro. O café tem sido alvo de pesquisa com relação à OTA, uma vez que essa micotoxina é potencialmente carcinogênica, podendo causar danos irreversíveis nos homens. Sua presença ocorre de forma natural, é difícil de controlar e uma vez presente causa danos irreversíveis nesse produto que está sujeito às legislações dos países importadores. Conhecer o comportamento da OTA com o processo de torra do café tem sido o desejo de muitos pesquisadores. No entanto, devido à heterogeneidade da OTA nos lotes de café, e devido à lacuna existente em relação à existência de planos de amostragem para micotoxinas, dados discrepantes relacionados à sua degradação durante a torra tem sido reportados. Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a degradação da OTA com a torra do café, utilizando um método previamente validado para amostragem de café para análise de OTA. Foram identificados e avaliados quatro lotes de café, naturalmente contaminados com OTA. Amostras de 9 kg foram fracionados em 9 sub-amostras de 1kg, das quais três foram analisadas como café cru, três foram torradas atendendo ao grau de torra clara/média e três foram torradas na torra escura. O grau de torra foi controlado com base na temperatura média dos grãos. As amostras de café cru e café torrado foram analisadas para determinação de OTA. As contaminações nos lotes foram estimadas com base nas médias dos resultados das três sub-amostras de café cru, e apresentaram contaminação variando de 7,5 a 20,3µg/kg. Os resultados obtidos para as sub-amostras de café torrado mostraram uma degradação média de OTA de 64% para o grau de torra clara/média e 87% para a torra escura. As variabilidades encontradas nos resultados das sub-amostras de café torrado, para os quatro lotes, foram compatíveis com aquelas determinadas para as sub-amostras de café cru.

## ABSTRACT

---

Occurrence of ochratoxin A (OTA) in food products is a problem that concerns the whole world. Coffee has been a target for OTA research, since this mycotoxin is potentially carcinogenic and may cause health problems in humans. It occurs naturally, thus being difficult to control and causing irreversible damage to coffee sales, since this product is subject to legislation by the importing countries. A better understanding of OTA behaviour during coffee roasting has been an interest for many researchers. However, due to the heterogeneous distribution of OTA in coffee lots, and also the lack of knowledge regarding appropriate sampling planning for mycotoxin detection, discrepancies have been found in OTA roasting degradation data. In view of the above, the present study has aimed at an evaluation of OTA degradation during coffee roasting, based in an evaluation of OTA degradation during coffee roasting, based on a previously validated sampling method. 9 kg of green coffee samples were divided into nine 1 kg sub-samples. Three sub-samples were evaluated as green (crude) coffee, three were submitted to a mild roast and three were submitted to a dark roast. Roasting degree was established based on average grain temperature measurements. OTA contamination was evaluated in both green and roasted coffee samples. OTA contamination of each coffee lot was based on average results from three sub-samples, varying from 7.5 to 20.3 µg/kg. Results obtained for the roasted sub-samples have show average OTA degradation of 64% and 87% for mild and dark roasts, respectively. Data variability found in the roasted coffee data was compatible with the determinations for green coffee.

**SUMÁRIO**

---

|   | <b>PÁGINA</b> |
|---|---------------|
| RESUMO  | i             |
| ABSTRACT  | ii            |
| LISTA DE FIGURAS  | iii           |
| LISTA DE TABELAS  | vi            |
| ABREVIATURAS  | viii          |
| 1. INTRODUÇÃO   | 1             |
| 2. OBJETIVO   | 3             |
| 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA                                | 4             |
| 3.1 O CAFÉ  | 4             |
| 3.1.1 HISTÓRICO   | 4             |
| 3.1.2 PROCESSAMENTO DOS GRÃOS DE CAFÉ APÓS A COLHEITA   | 6             |
| 3.1.2.1 COLHEITA  | 6             |
| 3.1.2.2 PROCESSAMENTO                                   | 7             |
| 3.1.3 CLASSIFICAÇÃO DO CAFÉ                             | 9             |
| 3.1.3.1 CLASSIFICAÇÃO POR TIPOS                         | 9             |
| 3.1.3.2 CLASSIFICAÇÃO PELA QUALIDADE                    | 13            |
| 3.1.4 TORREFAÇÃO  | 14            |
| 3.1.5 MOAGEM  | 15            |
| 3.1.6 A BEBIDA CAFÉ                                     | 16            |
| 3.1.7 CARACTERÍSTICAS FÍSICO QUÍMICAS DOS GRÃOS DE CAFÉ | 16            |



|   |    |
|---|----|
| 3.1.8 VARIACÕES DURANTE A TORREFAÇÃO                        | 18 |
| 3.2 MICOTOXINAS EM CAFÉ                                     | 19 |
| 3.2.1 MICOTOXINAS   | 19 |
| 3.2.2 OCRATOXINA A  | 21 |
| 3.2.3 FUNGOS PRODUTORES DE OCRATOXINA A                     | 21 |
| 3.2.4 CONDIÇÕES PARA PRODUÇÃO                               | 22 |
| 3.2.5 ESTABILIDADE  | 22 |
| 3.2.6 TRANSFERÊNCIA PARA A BEBIDA                           | 24 |
| 3.2.7 INGESTÃO DIÁRIA                                       | 25 |
| 3.2.8 LEGISLAÇÃO  | 26 |
| 3.2.9 SITUAÇÃO DAS MICOTOXINAS NO BRASIL                    | 27 |
| 3.2.10 MÉTODOS DE ANÁLISE PARA DETERMINAÇÃO DA OCRATOXINA A | 29 |
| 3.2.11 AMOSTRAGEM   | 35 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS                                      | 37 |
| 4.1 MATERIAL  | 37 |
| 4.2 EQUIPAMENTOS  | 38 |
| 4.3 REAGENTES E SOLUÇÕES                                    | 39 |
| 4.4 AMOSTRAS  | 40 |
| 4.5 TORREFAÇÃO  | 41 |
| 4.6 PREPARO E HOMOGENEIZAÇÃO DAS AMOSTRAS                   | 42 |
| 4.6.1 MOAGEM  | 42 |
| 4.6.2 HOMOGENEIZAÇÃO  | 42 |

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 4.6.3 | ARMAZENAMENTO   | 43 |
| 4.7   | METODOLOGIA PARA EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO,<br>DETERMINAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA OCRATOXINA A | 43 |
| 4.7.1 | EXTRAÇÃO E FILTRAÇÃO  | 45 |
| 4.7.2 | PURIFICAÇÃO DO EXTRATO  | 46 |
| 4.7.3 | ELUIÇÃO E EVAPORAÇÃO  | 46 |
| 4.7.4 | DETERMINAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO  | 47 |
| 5.    | RESULTADOS E DISCUSSÃO  | 48 |
| 5.1   | PERDA DE MASSA PELA TORRA   | 48 |
| 5.2   | OTA NAS AMOSTRAS DE CAFÉ BENEFICIADO  | 49 |
| 5.3   | OTA NAS AMOSTRAS DE CAFÉ TORRADO  | 53 |
| 5.4   | CONTROLE DAS ANÁLISES   | 63 |
| 5.5   | AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE OTA NOS CONDENSADOS<br>DOS GASES                               | 64 |
| 6.    | CONCLUSÃO   | 65 |
| 7.    | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS  | 66 |

**LISTA DE FIGURAS**

---

|  | <b>PÁGINA</b> |
|--|---------------|
| <b>Figura 1:</b> Estrutura química da molécula de ocratoxina A   | 21            |
| <b>Figura 2:</b> Esquema com o princípio de funcionamento das colunas de imunoafinidade  | 30            |
| <b>Figura 3:</b> Distribuição da OTA observada em 16 sub-amostras de 1 kg de café beneficiado, oriunda de uma amostra global de 16 kg e de mesmo lote                                  | 36            |
| <b>Figura 4:</b> Procedimento para fracionamento das amostras  | 41            |
| <b>Figura 5:</b> Sistema de torração   | 42            |
| <b>Figura 6:</b> Metodologia para extração de OTA em café  | 44            |
| <b>Figura 7:</b> (A) Etapas de pesagem de 25 gramas e (B) extração das amostras de café  | 45            |
| <b>Figura 8:</b> (A) Montagem utilizada na filtração do extrato utilizando papel de filtro whatman nº 4, (B) e de fibra de vidro whatman 1,0 µm e (C) retirada da alíquota do filtrado | 45            |
| <b>Figura 9:</b> Esquema utilizado para os procedimentos de purificação do extrato e lavagem da coluna de imunoafinidade   | 46            |
| <b>Figura 10:</b> (A) Eluição da OTA com metanol e (B) esquema na evaporação do extrato a 40 °C, sob fluxo de ar comprimido purificado   | 46            |
| <b>Figura 11:</b> Cromatogramas obtidos para amostras de café beneficiado (A) artificialmente e (B) naturalmente contaminadas com OTA  | 50            |

|                   |   |    |
|-------------------|---|----|
| <b>Figura 12:</b> | Cromatograma obtido para amostras de café beneficiado (A) artificialmente e (B) naturalmente contaminadas com OTA   | 54 |
| <b>Figura 13:</b> | A) Cromatograma da solução padrão de OTA na concentração de 0,0218 µg/mL (B) curva de calibração de OTA obtida para 5 concentrações da solução padrão, $r^2=0,999942$ | 52 |
| <b>Figura 14:</b> | Contaminação média de OTA observada em sub-amostras de café beneficiado e café torrado obtidas de 4 lotes diferentes  | 67 |

**LISTA DE TABELAS**

---

|  | <b>PÁGINA</b> |
|--|---------------|
| <b>Tabela 1:</b> Tabela oficial de classificação em latas de 300 gramas  | 11            |
| <b>Tabela 2:</b> Equivalência dos defeitos do café para sua classificação pelo tipo  | 12            |
| <b>Tabela 3:</b> Classificação por qualidade, considerando o sabor e aroma da bebida   | 14            |
| <b>Tabela 4:</b> Substâncias químicas presentes nos tipos de café arábica e robusta considerando tanto o café verde como o torrado e o instantâneo | 18            |
| <b>Tabela 5:</b> Dados de degradação de OTA com a torrefação encontrados na literatura   | 23            |
| <b>Tabela 6:</b> Legislação para OTA em café, aprovada pela União Européia   | 27            |
| <b>Tabela 7:</b> Incidência de OTA em café torrado moído e solúvel determinado em duas regiões distintas do Brasil                                 | 28            |
| <b>Tabela 8:</b> Principais características dos métodos para determinação de ocratoxina A em café  | 31            |
| <b>Tabela 9:</b> Temperatura e perda de massa em função do grau de torração  | 49            |

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabela 10:</b> OTA determinada nas três sub-amostras de café beneficiado para cada um dos quatro lotes de café beneficiado                                     | 53 |
| <b>Tabela 11:</b> OTA determinada nas sub-amostras de café após a torra clara/média   | 54 |
| <b>Tabela 12:</b> OTA determinada nas sub-amostras de café após a torra escura  | 56 |
| <b>Tabela 13:</b> Degradação da Ocratoxina A observada para café após a torra clara/média   | 59 |
| <b>Tabela 14:</b> Degradação da Ocratoxina A observada para café após a torra escura  | 60 |
| <b>Tabela 15:</b> Resultados de análise e recuperações obtidas nas análises das amostras de café beneficiado e café torrado, artificialmente contaminadas com OTA | 63 |

## ABREVIATURAS

---

ALARA = “As Low as Reasonably Achievable”

AOAC = “Association of Official Analytical Chemist”

Aw = Atividade de água

CB =: Café beneficiado

CCD = Cromatografia em camada delgada;

CLAE = Cromatografia líquida de alta eficiência;

DECAF = Departamento do Café

DOU = Diário Oficial da União

FAO – “Food and Agriculture Organization of the United Nations”

IAC = Coluna de imunoafinidade

JECFA = “Joint Expert Committee on Food Additives”

LD = Limites de quantificação

LQ = Limites de detecção

ND = Não determinado

OTA = Ocratoxina A;

PBS = Solução tampão fosfato salina 0,1% - Ph 7,4;

PTWI = Ingestão semanal tolerável provisória

R% = Recuperação percentual;

Rt = Tempo de retenção;

SCF = “Scientific Committee for Food”

SPE = Extração de fase sólida

TE = Torra escura

TMC = Torra média clara

## 1. INTRODUÇÃO

---

A produção de café no mundo encontra-se distribuída entre mais de 50 países, sendo que o Brasil é o maior produtor mundial de café, ocupando também a primeira posição como país exportador e segundo maior consumidor mundial (Encarnação e Lima, 2003). Cuidar do aprimoramento das qualidades químicas, físicas, sensoriais e de segurança do café é pré-requisito para o país tornar-se mais competitivo.

Com uma produção mundial de aproximadamente 30 milhões de sacas (Encarnação e Lima, 2003), o café se destaca como uma importante fonte de divisas e riquezas para o Brasil além de empregar mais de 5 milhões de pessoas envolvidas diretamente nas principais etapas da produção como cultivo, colheita, processamento, transporte, armazenamento, industrialização e comercialização. Pode-se destacar ainda, com relação ao cultivo do café, a sua grande importância na fixação do homem no meio rural, evitando dessa forma a migração de mão de obra não qualificada para os grandes centros urbanos o que resultaria em inchamento das favelas, aumento na taxa de desemprego e consecutivamente aumento da criminalidade.

Como a maioria dos produtos de origem vegetal, os grãos de café estão sujeitos a sofrerem contaminação por fungos nas diferentes etapas da produção. A contaminação pode ocorrer nas etapas de colheita, secagem, transporte e armazenamento, entre outras. Alguns desses fungos causam graves defeitos nos grãos de café, alteram o sabor da bebida deixando-a com sabor de bolor e terra. Podem ainda, produzir micotoxinas, substâncias tóxicas, resultando no comprometimento da saúde humana.

Uma dessas micotoxinas é a ocratoxina A, produzida em grãos de café principalmente por fungos dos gêneros *Aspergillus* da seção *Circundati* e *Penicillium verrucosum*. A ocratoxina A é um agente nefratóxico, sendo classificado pelo IARC (International Agency for Research on Cancer) no grupo 2B como possivelmente carcinogênico para humanos.



A ocratoxina A tem sido encontrada no café verde ou beneficiado nas diferentes etapas do processamento. Embora muitos autores (Levi *et al.*, 1974; Tsubouchi *et al.*, 1987; Blanc *et al.*, 1998) reportem a degradação da ocratoxina A durante a etapa de torrefação, muitas publicações apresentam variações discrepantes que vão de 0 a 100%. Sua presença já foi detectada em café torrado moído e solúvel (Pittet *et al.*, 1996; Tsubouchi *et al.*, 1988; Micco *et al.*, 1989; Leoni *et al.*, 2000; Prado *et al.*, 2000).

Um dos grandes problemas associados com a determinação de ocratoxina A em café está relacionado com os procedimentos de amostragem, sendo que os maiores erros são decorrentes da aplicação de planos de amostragem impróprios (90%) e da utilização de métodos analíticos não validados (10%) (Whitaker, 1994). Geralmente, uma pequena porcentagem de grãos de um lote está contaminada, podendo alguns desses grãos conter uma concentração extremamente elevada de ocratoxina A. Isto pode levar a variabilidade nos resultados ou emissão de resultados de contaminação não representativos do lote.

Considerando a presença de ocratoxina A em café torrado e moído e em café solúvel, e a ampla faixa de degradação da ocratoxina A reportada na literatura, e considerando que poucos autores em seus estudos sobre degradação fizeram uso de planos de amostragem adequados e considerando ainda, a alta toxicidade da ocratoxina A para humanos, este trabalho se propõe a avaliar, dentro de condições de torrefação controladas e utilizando um procedimento de amostragem rigoroso, a degradação da ocratoxina A durante a etapa de torração do café beneficiado.

## 2. OBJETIVO

---

O presente trabalho teve como objetivo geral a avaliação da degradação da ocratoxina A (OTA) durante o processo de torração do café beneficiado.

Os objetivos específicos do trabalho foram:

- Identificação de lotes de café beneficiado, naturalmente contaminados com ocratoxina A na faixa de 5-10 µg/kg;
- Realização da coleta das amostras de café beneficiado utilizando um plano de amostragem adequado;
- Realização das análises para determinação de ocratoxina A nas amostras de café beneficiado utilizando metodologia oficial do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento – DOU, 2000;
- Torrefação das amostras de café beneficiado para obtenção de dois tipos de torras (torra clara média e torra escura) utilizando para isso metodologia previamente desenvolvida por Borges *et al.* (2002), garantido, dessa forma, a repetibilidade da etapa de torrefação;
- Realização das análises para determinação de ocratoxina A nas amostras de café torrado utilizando metodologia oficial do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento – Processo Institucional DOU nº 21028.003351/2003-95;
- Avaliação qualitativa da presença de ocratoxina A nos condensados dos gases obtidos durante a torra do café, para avaliar se a diminuição da concentração da ocratoxina A foi decorrente da transferência da OTA inicialmente presente no café beneficiado para o condensado;
- Avaliação da degradação da ocratoxina A no café torrado (torra clara média e torra escura), utilizando como referência de contaminação inicial a contaminação determinada nas amostras de café beneficiado.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

---

#### 3.1 O CAFÉ

##### 3.1.1 HISTÓRICO

O cafeeiro pertence ao grupo das plantas Fanerógamas classe Angiosperma, subclasse Dicotiledônea, ordem Rubiales, família das Rubiaceas, tribo Coffeae, subtribo Coffeinae e gênero Coffea (Matiello, 1991). As duas espécies mais importantes de café são Coffea arabica e C. canephora. O coffeea arábica teve sua origem nas montanhas do sul da Etiópia e ocorre em mais de 80% da produção mundial (Clarke e Macrae, 1985).

A cafeicultura e as atividades correlatas constituem a principal fonte de emprego na maioria dos países produtores. A organização Internacional de Café estima que a cafeicultura fornece empregos diretos, em tempo integral para 25 milhões de pessoas no mundo (Zambolim, 1999).

O café foi introduzido pela primeira vez no Brasil em 1727, pelo sargento-mor Francisco de Mello Palheta que trouxe as primeiras mudas e algumas sementes. O cultivo teve início em Belém do Pará, irradiando-se para o Maranhão e chegando à Bahia em 1770. Quatro anos depois, alcançou o Rio de Janeiro, desenvolvendo-se nos contrastes da Serra do Mar seguindo em direção ao Vale do Paraíba aonde chegou em 1825, se espalhando pelos estados de Minas Gerais e São Paulo (Matiello, 1991).

Desde 1830, o Brasil vem atuando como maior produtor mundial de café (Floriane, 1999). Contribuindo com mais de 30% da produção mundial nas últimas safras, é classificado como maior exportador de café, contribuindo com aproximadamente 26 % (Galé Group, 2001/01). Ocupa ainda a segunda posição como consumidor com 10,9%, perdendo somente para os Estados Unidos com 18,4%, que, juntamente com a Alemanha, Japão, França e Itália consomem 54,5% do café produzido no mundo. Minas Gerais contribui com 50% do café produzido no Brasil com quatro regiões

produtoras: Cerrado de Minas, Vales de Minas, Sul de Minas e Montanhas de Minas (Floriane, 1999).

A produção média anual brasileira é de 30 milhões de sacas de café beneficiadas de 60 kg, representando um terço da produção mundial, com exportação de cerca de dois bilhões e meio de dólares por ano. Embora a participação do café no valor total das exportações nacionais tenha diminuído para 5% devido à contínua diversificação nas exportações (aviões, soja, eletrodomésticos, etc.), ainda hoje esse produto é um importante gerador de divisas, ocupando uma posição de destaque no cenário sócio econômico do País (Encarnação e Lima, 2003).

A economia do café pode ser agrupada em quatro principais setores (Matiello, 1991):

- 1) A produção, que compreende a lavoura cafeeira, englobando os cafeicultores, as fazendas de café, além de todos os processos do cultivo até a colheita e processamento do produto;
- 2) A comercialização, que abrange as operações de compra e venda do café. Envolvidos nessas operações estão os maquinistas, as cooperativas, os comerciantes, os corretores e os exportadores;
- 3) A industrialização, com a transformação do café beneficiado ou café verde em café pronto para ser preparado, visando obter o café torrado moído e solúvel e outros como, por exemplo, o café descafeinado e bebidas geladas, doces e biscoitos.
- 4) O consumo, que compreende todos os tomadores da bebida nas suas várias formas.

O café é uma das bebidas de maior consumo no Brasil, sendo que o cafezinho é hoje indispensável, independente da classe social e do ambiente de trabalho, sendo constante a exigência com relação à qualidade por parte dos consumidores.

A qualidade do café, relacionada às características dos grãos quanto a cor, aspecto, número de defeitos, aroma e gosto da bebida, depende de fatores como (Zambolim, 1999):

- 1) Composição química do grão, determinada por fatores genéticos, pelo sistema de cultivo e pelo ambiente;
- 2) Processo de armazenamento;
- 3) Torrefação e preparo da bebida.

O fruto maduro, no ponto ideal de colheita, é a matéria prima para a obtenção de um café de boa qualidade, e para mantê-la, é necessário utilizar técnicas e cuidados especiais em todas as fases do preparo. Da colheita ao armazenamento, o café é submetido a uma série de operações que, se bem executadas, fornecerão um produto que apresenta as características de tipo e de bebida exigidas pelos consumidores (Zambolim, 1999).

### **3.1.2 PROCESSAMENTO DOS GRÃOS DE CAFÉ APÓS A COLHEITA**

#### **3.1.2.1 COLHEITA**

O plantio do café, por se tratar de uma cultura perene, não é uma operação tão problemática para os produtores. Uma vez plantada, a lavoura permanece por 10, 20, 30 anos ou mais. Já a colheita do café tem sido vista pelos produtores como um ponto de estrangulamento na exploração da cultura, mesmo considerando o atual uso de máquinas nas operações de colheita (Zambolim, 2001).

A colheita do café é uma operação complexa, com várias etapas e que demanda 30% do custo de produção e 40% da mão-de-obra empregada. Essa elevada demanda de mão-de-obra, que se concentra em um período de 100 dias, tem sido limitante para a exploração da cultura (Zambolim, 2001).

Os frutos maduros constituem a matéria prima ideal, determinando por isso a época adequada de colheita que deve ser iniciada quando a maioria dos frutos estiver madura, com pequena porcentagem de frutos verdes e antes que os frutos secos comecem a cair. A colheita antecipada resulta em grande porcentagem de frutos verdes, acarretando prejuízos devido à perda de peso e de qualidade do café. Quando a colheita é realizada após o estágio adequado de maturação, os resultados são frutos secos no pé de café ou no chão, o que aumenta o número de grãos pretos e ardidos, piorando o rendimento e qualidade do café, refletindo diretamente no peso e tipo de bebida (Matiello, 1991).

Três tipos de colheita são normalmente utilizados (Matiello, 1991):

- 1) Derrixa, pode ser realizada no pano ou em peneira sendo a mais recomendada para áreas de solo arenoso e inverno úmido. Por derrixa, é colhida uma mistura de frutos de diferentes características com relação à cor, densidade e teor de umidade.
- 2) Colheita a dedo, consiste na coleta apenas dos frutos maduros, visando preparo de cafés despulpados. É indicada para regiões em que a maturação não é uniforme e resulta em um café de boa qualidade, sendo esse um processo que exige muita mão de obra.
- 3) Colheita mecânica, ideal para regiões planas, permitindo melhor programação e racionalização do trabalho.

Na colheita do café, as colhedoras, em determinadas condições de trabalho, chegam a fazer, em um dia de serviço, o equivalente a 250 homens (Zambolim, 2001).

### **3.1.2.2 PROCESSAMENTO**

O processamento ou preparo dos frutos do café após a colheita pode ser feito por via seca, resultando nos “cafés de terreiro” ou por via úmida, resultando nos “cafés

despolpados”. Compreende basicamente a lavagem, o despolpamento, a degomagem, a secagem, o armazenamento e o beneficiamento (Matiello, 1991).

A lavagem, feita em lavadores-separadores, visa a eliminação de impurezas tais como folhas, torrões, paus e pedras, e a separação por densidade de cafés leves (bóias ou secos) dos pesados (cerejas e verdes) (Matiello, 1991).

No despolpamento, que é geralmente realizado no máximo 24 horas após a colheita, os frutos maduros, juntamente com pouca porcentagem de frutos verdes, entram no despolpador pela moega juntamente com a água. Nos despolpadores que possuem separadores de verde, os frutos passam da moega para um cilindro janelado, tipo gaiola, onde por pressão, os verdes são separados e saem pela lateral. Os grãos maduros seguem para o despolpador (Matiello, 1991).

Os grãos despolpados passam pelo estágio de degomagem, geralmente feito em tanques de alvenaria, que pode ser por fermentação natural, por meios mecânicos, por meios químicos ou pela combinação mecânico-química. Após a fermentação, o café é batido, com batedores mecânicos ou com a ajuda de rodos manuais, para remover a mucilagem livre, seguido de duas a três lavagens (Matiello, 1991).

A secagem é uma operação importante, que se realizada de forma indevida, pode causar sérios prejuízos ao cafeicultor. Pode ser feita de forma natural quando os grãos são expostos ao sol em terreiros, ou artificial quando o uso de secadores mecânicos é feito. A secagem ideal se dá quando os grãos atingem 10 a 11% de umidade, condição ideal para armazenamento (Matiello, 1991).

O armazenamento do café pode ser feito com o café coco ou pergaminho, normalmente em tulhas, visando o descanso do café quando esse atingirá uma seca uniformizada entre os grãos de café ou para regular a oferta na comercialização. O armazenamento do café beneficiado é feito em pilhas de sacos de juta em silos. As condições mais importantes para armazenamento são a umidade inicial do café que deve ser mantida entre 10 e 11% para evitar o crescimento de fungos e conseqüente formação de ocratoxina A, devendo ser consideradas: a localização e as

características da construção do armazém, as condições climáticas da região e os cuidados na armazenagem (Matiello, 1991).

O beneficiamento do café visa transformar, pela eliminação de cascas e pela separação dos grãos, o café coco seco ou em pergaminho em café beneficiado, café pilado ou café verde (green coffee) (Matiello, 1991).

### **3.1.3 CLASSIFICAÇÃO DO CAFÉ**

A classificação do café é uma operação utilizada para determinar a qualidade do café da qual será determinado o seu preço e sua aceitação no mercado. No Brasil, a classificação do café compreende duas fases (Matiello, 1991):

- A classificação por tipos (defeitos);
- A classificação pela qualidade.

#### **3.1.3.1 CLASSIFICAÇÃO POR TIPOS**

A classificação por tipos determina o grau de pureza do café, isto é, a ausência de defeitos (Saes e Farina, 1999). Compreende sete tipos de valores decrescentes de 2 a 8, determinados em 300 gramas de café beneficiado, segundo as normas estabelecidas pela Tabela Oficial Brasileira de Classificação (Tabela 1) (Matiello, 1991), sendo que a cada tipo corresponde um maior ou menor número de defeitos (Tabela 2) (Matiello, 1991; Saes e Farina, 1999).

Para determinar o tipo de um café, o profissional classificador-provador procede da seguinte maneira (Matiello, 1991).

1. Espalha uma amostra de 300 gramas em uma folha de cartolina preta, em mesa provida de boa iluminação e própria para a classificação.
2. Efetua a catação dos defeitos encontrados e a sua separação por categoria.



3. Conta os defeitos de acordo com as especificações da Tabela de Equivalência dos Defeitos (Tabela 2) e a partir do número de defeitos, determina a equivalência.

Na classificação por tipos, os defeitos preto-verdes ou verde-geados não constam da tabela oficial, embora sejam usualmente considerados à razão de três para um defeito (Matiello, 1991).

O tipo 4 na Tabela 1 é denominado de “tipo base”, pois corresponde à grande maioria dos cafés enviados para exportação (Saes e Farina, 1999).

**Tabela 1:** Tabela oficial de classificação em latas de 300 gramas (Matiello, 1991; Saes e Farina, 1999)

| <b>Defeitos</b> | <b>Tipos</b> | <b>Pontos</b> | <b>Defeitos</b> | <b>Tipos</b> | <b>Pontos</b> |
|-----------------|--------------|---------------|-----------------|--------------|---------------|
| 4               | 2            | + 100         | 46              | 5            | - 50          |
| 4               | 2 - 5        | + 95          | 49              | 5 - 5        | - 55          |
| 5               | 2 - 10       | + 90          | 53              | 5 - 10       | - 60          |
| 6               | 2 - 15       | + 85          | 57              | 5 - 15       | - 65          |
| 7               | 2 - 20       | + 80          | 61              | 5 - 20       | - 70          |
| 8               | 2 - 25       | + 75          | 64              | 5 - 25       | - 75          |
| 9               | 2 - 30       | + 70          | 68              | 5 - 30       | - 80          |
| 10              | 2 - 35       | + 65          | 71              | 5 - 35       | - 85          |
| 11              | 2 - 40       | + 60          | 75              | 5 - 40       | - 90          |
| 11              | 2 - 45       | + 55          | 79              | 5 - 45       | - 95          |
| 12              | 3            | + 50          | 86              | 6            | - 100         |
| 13              | 3 - 5        | + 45          | 93              | 6 - 5        | - 105         |
| 15              | 3 - 10       | + 40          | 100             | 6 - 10       | - 110         |
| 17              | 3 - 15       | + 35          | 108             | 6 - 15       | - 115         |
| 18              | 3 - 20       | + 30          | 115             | 6 - 20       | - 120         |
| 19              | 3 - 25       | + 25          | 123             | 6 - 25       | - 125         |
| 20              | 3 - 30       | + 20          | 130             | 6 - 30       | - 130         |
| 22              | 3 - 35       | + 15          | 138             | 6 - 35       | - 135         |
| 23              | 3 - 40       | + 10          | 145             | 6 - 40       | - 140         |
| 25              | 3 - 45       | + 5           | 153             | 6 - 45       | - 145         |
| 26              | 4            | BASE          | 160             | 7            | - 150         |
| 28              | 4 - 5        | - 5           | 180             | 7 - 5        | - 155         |
| 30              | 4 - 10       | - 10          | 200             | 7 - 10       | - 160         |
| 32              | 4 - 15       | - 15          | 220             | 7 - 15       | - 165         |
| 34              | 4 - 20       | - 20          | 240             | 7 - 20       | - 170         |
| 36              | 4 - 25       | - 25          | 260             | 7 - 25       | - 175         |
| 38              | 4 - 30       | - 30          | 280             | 7 - 30       | - 180         |
| 40              | 4 - 35       | - 35          | 300             | 7 - 35       | - 185         |
| 42              | 4 - 40       | - 40          | 320             | 7 - 40       | - 190         |
| 44              | 4 - 45       | - 45          | 340             | 7 - 45       | - 195         |
|                 |              |               | 360             | 8            | - 200         |

**Tabela 2:** Equivalência dos defeitos do café para sua classificação pelo tipo (Matiello, 1991; Saes e Farina, 1999).

| <b>Natureza das imperfeições</b> | <b>Número de defeitos</b> |
|----------------------------------|---------------------------|
| 1 grão preto                     | 1                         |
| 1 pedra, pau ou torrão grande    | 5                         |
| 1 pedra, pau ou torrão regular   | 2                         |
| 1 pedra, pau ou torrão pequeno   | 1                         |
| 1 coco                           | 1                         |
| 1 casca grande                   | 1                         |
| 2 ardidos                        | 1                         |
| 2 marinheiros                    | 1                         |
| 2/3 cascas pequenas              | 1                         |
| 2/5 brocados                     | 1                         |
| 3 conchas                        | 1                         |
| 5 verdes                         | 1                         |
| 5 quebrados                      | 1                         |
| 5 chochos e mal granados         | 1                         |

### 3.1.3.2 CLASSIFICAÇÃO PELA QUALIDADE

A classificação pela qualidade considera os seguintes elementos:

- Café – classificado pela espécie ou variedade que lhe dá origem;
- Fava – identifica o formato do café, podendo ser chatos ou mocas;
- Peneira – classificados conforme as dimensões dos crivos que os retêm;
- Aspecto – avaliado através de inspeção visual feito pelo classificador, podendo ser bom, regular, ou mau;
- Cor – determinada pelas tonalidades do café como verde cana, esverdeada, amarelo claro, cor de palha, chumbado, barrento, esbranquiçado, etc.;
- Seca – avaliada visualmente como boa, regular ou má;
- Preparo – classifica-se como terreiro ou despolpado;
- Torração – classificada conforme o aspecto da amostra após a torração ou pela contagem de grãos que não torraram ou não apresentaram a cor característica dos despolpados;
- Bebida – classificada pela prova de xícara como mole, estritamente mole, apenas mole, duro, riado, rio, e rio zona.

Na prova de xícara, sentidos como paladar e olfato são levados em conta na determinação da qualidade do café (Tabela 3).

**Tabela 3:** Classificação por qualidade, considerando o sabor e aroma da bebida (Saes e Farina, 1999).

| Bebida            | Característica                           |
|-------------------|--|
| Estritamente mole | Sabor suavíssimo e adocicado             |
| Mole              | Suave, acentuado e adocicado             |
| Apenas mole       | Suave, porém com leve adstringência      |
| Dura              | Sabor adstringente, gosto áspero         |
| Riada             | Leve sabor de iodofórmio ou ácido fênico |
| Rio               | Sabor forte e desagradável               |
| Rio zona          | Sabor e odor intoleráveis                |

### 3.1.4 TORREFAÇÃO

O processo de torrefação ou torração dos grãos de café consiste em aplicar considerável calor aos grãos, que devem estar em movimento para garantir a torra homogênea até sua cor atingir o ponto de torração. Nesta etapa, o café é rapidamente resfriado por corrente de ar com ou sem vapor de água (Clarke e Macrae, 1985). No processo de torração, as etapas abaixo podem ser observadas (Matiello, 1991):

- 1) A secagem, quando os grãos verdes são expostos à fonte de aquecimento e ocorre a perda de água a 100 °C e os grãos de café tornam-se amarelados, passando a cor castanha na temperatura entre 120-130 °C.
- 2) À temperatura de 150 °C ocorre o desprendimento de um odor de óleo e a 180 °C já começam a se desenvolver os gases de combustão na forma branco azulada, com desprendimento de CO<sub>2</sub> e CO. A cor dos grãos muda para marrom e o volume dos grãos aumenta.

- 3) A temperatura de torração ocorre entre 182 e 240 °C, sendo considerada como ideal entre 210 e 230 °C, quando o aroma do café se forma totalmente.

São fatores importantes no que diz respeito aos equipamentos torradores (Matiello, 1991):

- 1) A movimentação dos grãos para garantia de uma exposição boa e uniforme ao calor;
- 2) A eliminação rápida da umidade e da fumaça desprendidas.
- 3) Um bom controle de temperatura.
- 4) Um dispositivo para facilitar a tomada de amostras no acompanhamento do processo de torração.
- 5) A descarga e o resfriamento devem ser rápidos, tão logo o processo de torração seja atingido.

A prova da torração é sem dúvida, um ponto de fundamental importância na classificação do café, por ser de grande ajuda na classificação do café (Zambolim, 1999). Na torração, os defeitos presentes no café cru ainda são evidentes, já que após a torra, os grãos verdes e ardidos ficam amarelados e os grãos pretos aparecem carbonizados; os quebrados, os conchas e os mal granados, devido ao seu volume reduzido em relação aos grãos perfeitos, tornam-se escuros (Matiello, 1991).

### **3.1.5 MOAGEM**

A moagem de café é feita em moinhos, dos mais simples aos mais sofisticados, cujos elementos moedores atiram os grãos, quebrando-os em partículas angulares. A moagem mais grossa resulta em cafés de melhor aroma e sabor, embora com menor rendimento aparente em xícara de café/quilo (Matiello, 1991). A granulometria do café a ser obtida dependerá do método de extração a ser utilizado; pós muito finos dão alta

superfície de contato, o que é ideal para café turco. Para café expresso, pós muito finos entopem o equipamento (Clarke e Macrae, 1985).

### **3.1.6 A BEBIDA CAFÉ**

Existem diversas formas de preparar o café, sendo que estas variam de acordo com a região destacando-se (Matiello, 1991):

- 1) A adição da água quente diretamente sobre o pó, no coador;
- 2) A infusão do pó de café em mistura com água quente em um recipiente, com posterior passagem pelo coador;
- 3) A passagem da água quente pelo pó, sob pressão – o café expresso;
- 4) A mistura do pó fino em água quente, diretamente no vasilhame, deixando-o decantar ligeiramente, sem coar – o café turco.

Os coadores ou filtros podem ser de pano, papel ou com telas metálicas. O pó, em contato com a água quente, temperatura ideal 90 °C, deve formar uma espuma na ebulição, resultante da dispersão do gás carbônico e que indica que o pó está bem conservado. A água usada no preparo do café deve ser de boa qualidade, sem a presença de minerais e de cloro, sendo ideais as águas de minas ou águas destiladas (de chuva) (Matiello, 1991).

### **3.1.7 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DOS GRÃOS DE CAFÉ**

A composição química dos grãos de café depende da espécie e variedade química em questão, além de fatores como práticas agrícolas, estágio de maturação e condições de armazenamento (Clarke e Macrae, 1985). Os grãos de café são constituídos por um grande número de substâncias químicas que podem ser reunidas em classes de compostos (Matiello, 1991):

- Água – os grãos de café verde possuem de 10 a 13% de água, e depois de torrados retêm ainda de 1,5 a 2% de água;
- Minerais – o teor de minerais (cinzas) é de 3 a 4% no café verde e 4 a 5% no café torrado, destacando: potássio, sódio, cálcio, magnésio, fósforo, enxofre, alumínio, cobre, flúor, boro, iodo, manganês, zinco, entre outros;
- Proteínas – o café possui cerca de 12% de proteínas, compreendendo aminoácidos sulfurados (cistina, metionina), que exercem o papel importante na formação do aroma;
- Alcalóides – os cafés arábica possuem de 0,6 a 1,5% de cafeína e os robusta, de 1,6 a 2,7%, podendo atingir até 3%. No café verde, a cafeína encontra-se na forma de clorogenato de cafeína e potássio. Além da cafeína, outro alcalóide presente no café com cerca de 0,4 a 1,2%, é a trigonelina, como precursor do ácido nicotínico vitamina PP – Niacina);
- Gorduras – o café é rico em óleos, sendo que o café arábica possui de 12 a 18% e o robusta de 9 a 14%, com maior parte constituindo-se de triglicerídeos;
- Carboidratos – compreendem de 51 a 68% dos componentes do café, dos quais de 5 a 9% são açúcares redutores e sacarose, de 43 a 50% são polissacarídeos (celulose, amido, mucilagem e pectinas), sendo os demais oligo e monossacarídeos (6%);
- Ácidos alifáticos – os grãos de café possuem vários ácidos orgânicos alifáticos, bem como compostos fenólicos (taninos e flavonóides), compreendendo o ácido clorogênico (4 a 8%) e os ácidos oxálico, málico, acético, tartárico, etc.;
- Substâncias voláteis – existem centenas de substâncias voláteis que compõem o aroma do café.

Devido à variabilidade de componentes do café, é extremamente difícil a obtenção de valores médios para um determinado tipo de café, sendo tal dificuldade acentuada com a quantidade de métodos analíticos empregados para a determinação de um mesmo componente. Um resumo das principais substâncias químicas presentes nos



tipos de café arábica e robusta, considerando tanto o café verde como o torrado e o instantâneo, pode ser observado na Tabela 4 (Clarke e Macrae, 1985).

**Tabela 4:** Substâncias químicas presentes nos tipos de café arábica e robusta considerando tanto o café verde como o torrado e o instantâneo (Clarke e Macrae, 1985).

| Componentes                | Arábica (%) |              | Robusta (%) |              | Café instantâneo (%) |
|----------------------------|-------------|--------------|-------------|--------------|----------------------|
|                            | Café verde  | Café torrado | Café verde  | Café torrado |                      |
| Minerais                   | 3,0 - 4,2   | 3,5 - 4,5    | 4,0 - 4,5   | 4,6 - 5,0    | 9,0 - 10,0           |
| Cafeína                    | 0,9 - 1,2   | ~1,0         | 1,6 - 2,4   | ~2,0         | 4,5 - 5,1            |
| Trigonelina                | 1,0 - 1,2   | 0,5 - 1,0    | 0,6 - 0,75  | 0,3 - 0,6    | -                    |
| Lipídios                   | 12,0 - 18,0 | 14,5 - 20,0  | 9,0 - 13,0  | 11,0 - 16,0  | 1,5 - 1,6            |
| Ácidos clorogênicos totais | 5,5 - 8,0   | 1,2 - 2,3    | 7,0 - 10,0  | 3,9 - 4,6    | 5,2 - 7,4            |
| Ácidos alifáticos          | 1,5 - 2,0   | 1,0 - 1,5    | 1,5 - 2,0   | 1,0 - 1,5    | -                    |
| Oligossacarídeos           | 6,0 - 8,0   | 0,0 - 3,5    | 5,0 - 7,0   | 0,0 - 3,5    | 0,7 - 5,2            |
| Polissacarídeos totais     | 50,0 - 55,0 | 24,0 - 39,0  | 37,0 - 47,0 | -            | ~6,5                 |
| Aminoácidos                | 2,0         | 0,0          | 2,0         | 0,0          | 0,0                  |
| Proteínas                  | 11,0 - 13,0 | 13,0 - 15,0  | 11,0 - 13,0 | 13,0 - 15,0  | 16,0 - 21,0          |
| Ácidos húmicos             | -           | 16,0 - 17,0  | -           | 16,0 - 17,0  | 15,0                 |

### 3.1.8 VARIAÇÃO DURANTE A TORREFAÇÃO

Na torrefação, mudanças consideráveis ocorrem, já que os componentes mais lábeis são degradados e os compostos mais reativos interagem para formar produtos

complexos. O café é provavelmente um dos alimentos que mais sofre alterações durante o processamento do ponto de vista dos componentes formados, sendo que tais alterações refletem nas mudanças das características sensoriais (Clarke e Macrae, 1985).

Controle nas operações de torrefação é importante, sendo a temperatura e o tempo fundamentais na determinação da aceitabilidade do produto final pelo consumidor. A mudança da cor dos grãos de café é um parâmetro utilizado para determinar o grau de torra, sendo este avaliado visualmente ou por meio de medidas das alterações das cores utilizando medidores de refletância. A perda de massa dos grãos é também um fator importante na determinação do grau de torra. O grau de torra do café ou “blends” oferecido ao mercado depende da expectativa e preferência do consumidor que variam de acordo com os costumes regionais (Clarke e Macrae, 1985).

Durante a torração ocorrem transformações físicas e químicas nos grãos devido à pirólise. Ocorrem reações de desidratação, hidrólise, fracionamento e catálise que liberam gases e formam os princípios aromáticos, graças à transformação das matérias graxas dos ácidos glicosídicos e de outros componentes (fenóis, ácido acético, tanino, etc.), responsáveis pelo sabor e pelo aroma do café torrado. O café torrado torna-se poroso e quebradiço. O açúcar e os gases desenvolvidos durante o processo de torra provocam a expansão dos grãos, resultando no aumento da porosidade e do volume, com redução do peso de 16 a 22% e aumento do volume de 30 a 80% (Matiello, 1991).

## **3.2 MICOTOXINAS EM CAFÉ**

### **3.2.1 MICOTOXINAS**

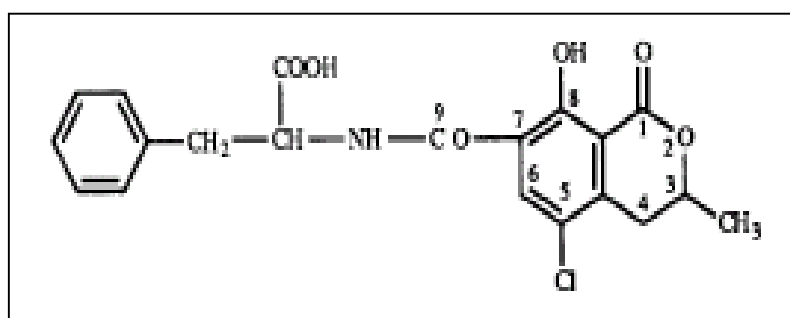
Micotoxinas são metabólitos fúngicos secundários que podem ocorrer em alimentos sob certas condições de umidade e temperatura e causam sérios problemas a saúde humana e de animais (Micco *et al.*, 1989). Podem ocorrer no campo, durante o transporte e armazenamento (Soliman, 2002). Pressupõe-se que, aproximadamente 20% dos produtos alimentícios produzidos, principalmente aqueles de origem vegetal,

estão contaminados com micotoxinas. Um total de aproximadamente 300 micotoxinas tem sido descrito como presentes em alimentos produzidas por, pelo menos, 200 tipos diferentes de fungos, sendo que apenas uma pequena fração de 20 micotoxinas é normalmente encontrada em alimentos nos níveis críticos para a saúde humana e animal (Anklam *et al.*, 2002). Devido aos diversos efeitos toxicológicos causados em humanos e animais pelas micotoxinas e devido à sua relativa estabilidade térmica, estes compostos têm sido considerados como um perigo em potencial para a saúde humana e animal.

Como contaminantes inevitáveis em alimentos, sua ocorrência natural têm sido freqüentemente relatada em produtos agrícolas em todo o mundo (Blanc *et al.*, 1998), dentre eles milho, café, castanhas, amendoim e trigo. Dentre as micotoxinas, as aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, a ocratoxina A (OTA), as fumonisinas FB<sub>1</sub>, FB<sub>2</sub> e FB<sub>3</sub> e a zearalenona são as que causam maior impacto para o comércio internacional de commodity agrícola devido às sérias implicações à saúde do consumidor. A OTA vem sendo detectada em uma série de alimentos como café, cereais, vinho, cerveja, arroz, feijão, castanhas, condimentos e em produtos de origem animal (Codex Alimentarius 1999).

### 3.2.2 OCRATOXINA A

A ocratoxina A é um derivado de uma isocumarina substituída contendo um grupo fenil alanina, sendo classificada no Chemical Abstracts como L-fenilalanina N-[5-cloro-3,4-diidro-8-hidroxi-3-metil-1-oxi o-1H2-benzopirano-7-yl] carbonila – (R) (Moss, 1996) (Figura 1).



**Figura 1:** Estrutura química da molécula de ocratoxina A

Substância considerada como um potente agente nefrotóxico e carcinogênico, foi classificada pela IARC em 1993, como substância do Grupo 2B. Desde que sua ocorrência foi relatada em 1974, a sua presença em café tem sido extensivamente pesquisada (Levi *et al.*, 1974; Levi, 1975; Levi, 1980; Cantáfora *et al.*, 1983; Terada *et al.*, 1986; Tsubouchi *et al.*, 1988; Micco *et al.*, 1989; Nakajima *et al.*, 1990; Studer-Rohr *et al.*, 1994; Pittet *et al.*, 1996; Patel *et al.*, 1997; Jørgensen, 1998; Trucksess *et al.*, 1999; Leoni, *et al.*, 2000).

### 3.2.3 FUNGOS PRODUTORES DE OCRATOXINA A

A ocratoxina A é normalmente produzida em climas tropicais pelos fungos *Aspergillus ochraceus*, *A. carbonarius* e *A. niger* e em climas temperados pelo *Penicillium verrucosum*. No café, as principais espécies de *Aspergillus* produtoras de OTA durante as etapas de secagem, armazenamento e transporte são o *Aspergillus ochraceus* e o

*carbonarius*, sendo que a produção de OTA pelo *A. niger* é pouco observada (Viani, 2000).

*Penicillium* spp, *Fusarium* spp, *Cladosporium* spp, *A. niger* e *ochraceus* têm sido identificados nas várias etapas da produção do café: planta e solo, secagem e armazenamento, sendo que a presença do *A. ochraceus* é maior em grãos de café secos sob o sol e armazenados (Taniwaki *et al.*, 1999).

As espécies *A. ochraceus*, *A. carbonarius* e *A. niger* foram identificados em amostras de café de regiões brasileiras. *A. niger* foi o fungo mais comumente encontrado, seguido de *A. ochraceus* e *A. carbonarius*. Dos isolados de *A. ochraceus*, 75% foram capazes de produzir OTA, com grande presença em grãos de café oriundos do pátio de secagem e do armazenamento (Bucheli e Taniwaki, 2002).

#### **3.2.4 CONDIÇÕES PARA PRODUÇÃO**

Condições ambientais como temperatura, umidade, condições físico-químicas do grão como atividade de água (aw), pH, composição e defeitos, presença de pragas e insetos afetam o crescimento do fungo e a produção de OTA.

A produção de OTA requer diferentes condições de atividade de água (aw) e temperatura, dependendo da espécie produtora. Os valores de aw mínimos necessários para crescimento do *Penicillium verrucosum*, do *A. ochraceus* e do *A. carbonarius* são 0,81, 0,76 e 0,80 respectivamente, embora ambos requeiram uma aw de 0,85 para a produção de OTA, sendo que a aw ótima é maior que 0,97 (Moss, 1996; Viani, 2000). A faixa de temperatura onde ocorre a produção da OTA pelo *A. ochraceus* e *A. carbonarius* varia de 8 a 37 °C (aw=0,95-0,99) e de 8 a 41°C (faixa ótima de 35-37 °C, aw=0,90), respectivamente (Bucheli e Taniwaki, 2002).

#### **3.2.5 ESTABILIDADE**

Até 1988, quando a ocorrência de ocratoxina A em bebidas de café foi relatada pela primeira vez (Tsubouchi *et.al.*, 1988), se acreditava que toda a OTA presente no café

se decompunha durante a torrefação. Desde então, estudos de degradação de OTA vêm sendo realizados utilizando tipos de amostras diferentes como: naturalmente contaminadas, artificialmente inoculadas com fungos e artificialmente contaminadas com padrão de ocratoxina A (van der Stegen *et al.*, 2001).

O nível de degradação da OTA no processo de torrefação do café é bastante variável, com relatos de perdas de OTA variando de 0 a 100% (Tabela 5).

**Tabela 5:** Dados de degradação de OTA com a torrefação encontrados na literatura.

| Tipo do café  | Nível de contaminação de OTA estimada no lote ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) | Contaminação de OTA resultante após a torrefação ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) | Porcentagem da OTA destruída (%) | Referência                          |
|---------------|---|--|----------------------------------|-------------------------------------|
| Arábica       | 18,4  | 1,9  | 89                               | Wilkens <i>et al.</i> , 1999        |
| Robusta       | 9,91  | 2,11   | 79                               | Wilkens <i>et al.</i> , 1999        |
| Não informado | 8,6   | 0,2  | 96                               | Micco <i>et al.</i> , 1989          |
| Robusta       | 7,3   | 1,4  | 84                               | Blanc <i>et al.</i> , 1998          |
| Robusta       | 4,9   | 1,5  | 69                               | van der stegen <i>et al.</i> , 2001 |
| Robusta       | 4   | 0,3  | 90                               | Micco <i>et al.</i> , 1989          |
| Robusta       | 0,9   | 0,63   | 30                               | Wilkens <i>et al.</i> , 1999        |

Muitos fatores podem influenciar na avaliação da taxa de degradação de OTA nos estudos que vêm sendo realizados, dentre eles a heterogeneidade natural na contaminação do café, contaminação natural versus contaminação artificial do café, condições de torrefação (Romani *et al.*, 2003), a ligação entre a toxina e o substrato (Tsubouchi *et al.*, 1987; Pittet *et al.*, 1996) e o desempenho dos métodos analíticos empregados cujos parâmetros estatísticos como sensibilidade, seletividade, precisão e exatidão não são conhecidos (Scott, 1996; Pittet *et al.*, 1996).

Estudo realizado por van der Stegen *et al.* (2001), avaliou três graus de torra (clara/média, escura e escura/média) versus três tempos (2,5; 4 e 10 min). Não foi observada diferença estatística na degradação da OTA quando 28 amostras de café beneficiado naturalmente contaminadas com 4,9 µg/kg de OTA foram analisadas. Após o processo de torra as amostras apresentaram contaminação entre 0,8 a 2,3 µg/kg de OTA. Estes autores observaram que o percentual de degradação aumentou com o grau de torração.

Muitos dos estudos de degradação realizados mencionam remoção física da OTA com a película prateada, como possível mecanismo da redução observada (Blanc *et al.*, 1998). Outra possível explicação dada por Studer-Rohr, *et al.*, 1995, é a isomerização parcial da molécula de OTA na posição C-3, tornando-a um diastereoisômero menos tóxico. Uma terceira explicação para a redução de OTA, demonstrada para trigo, está relacionada com a presença de umidade nas amostras, quando estas são aquecidas (Boudra e Le Bars, 1995).

### **3.2.6 TRANSFERÊNCIA PARA A BEBIDA**

Foi observado que transferência de OTA para a xícara de café varia de 38 a 133%, com uma média de 93,8% e um coeficiente de variação (CV) de 28% sendo que tais experimentos envolveram oito laboratórios (van der Stegen *et al.*, 1997). De acordo com Viani (1996), 70% de OTA é transferida para a bebida café durante o seu preparo. Para o café preparado a moda brasileira, foi relatada uma transferência de 47% a 100% de OTA do café torrado e moído para a bebida café (Leoni *et al.*, 2000).

### 3.2.7 INGESTÃO DIÁRIA

Em 1995, um projeto de avaliação da ingestão diária de OTA na Europa (SCOOP Project) foi implementado pela Comissão da Comunidade Européia e coordenado pela Agência Nacional de Alimentos da Dinamarca, com a participação de 13 países com o objetivo de prover o Scientific Committee for Food (SCF), com dados de exposição do europeu a OTA. Oito países estimaram a ingestão média diária para uma pessoa adulta em 0,7 a 4,6 ng/kg peso corpóreo/dia, com base nos dados de ocorrência e de consumo, e cinco países estimaram a ingestão média diária em 0,2 a 2,4 ng/kg peso corpóreo/dia com base em dados de nível de contaminação em plasma. Portanto, a variação da ingestão diária de OTA, calculada por duas metodologias diferentes foi da mesma ordem de magnitude. Os principais contribuintes para a ingestão diária de OTA foram os cereais.

Outras fontes de contribuição para a ingestão de OTA foram o café, cerveja, produtos cárneos contendo plasma sanguíneo de suínos, oleaginosas e condimentos (Jørgensen, 1998). Os cereais e seus derivados contribuem com 50% dos níveis de OTA na dieta do europeu, com níveis de contaminação que variam de 0,2 a 1,6 µg/kg. Outras fontes de OTA na dieta são a cerveja (0,07 µg/kg) e o café torrado com nível médio de contaminação de 0,8 µg/kg (0,04 µg/kg na bebida) (Codex Alimentarius 1999).

Em 1995, o Joint Expert Committee on Food Additives – JECFA, considerando o potencial carcinogênico da OTA, estabeleceu a ingestão semanal tolerável provisória (PTWI) em 100 ng/kg peso corpóreo/semana (equivalente a 14 ng/kg peso corpóreo/dia) com base no menor nível de toxina que provoca efeitos adversos em rins de suínos (8 µg/kg peso corpóreo/dia) (WHO, 1996), não levando em consideração dados de carcinogenicidade da OTA (Studer-Rohr *et al.*, 1994). O PTWI estabelecido pelo JECFA em 1995 foi revisto em 2001 passando de 100 ng/kg para 120 ng/kg peso corpóreo por dia (WHO, 2001).

Tomando como base o limite estabelecido pelo JECFA, para um adulto humano de 60 kg, a ingestão tolerável semanal seria de 6000 ng. Os Países Nórdicos estimaram o limite de ingestão para OTA em 5 ng/kg peso corpóreo/dia o que resultaria em uma



PTWI de 35 ng/kg peso corpóreo/semana, com base em dados de carcinogenicidade, o que seria três vezes menor do que o PTWI proposto pelo JECFA. Prado *et al.* (2000) relataram uma ingestão de OTA de 5,84 ng/dia e 42 ng/dia com base no consumo europeu por pessoa/dia, de 24g de café torrado e moído e 8g de café solúvel, respectivamente, o que significaria uma contribuição diária de 0,68% e 4,9% do PTWI estabelecido pelo JECFA.

### 3.2.8 LEGISLAÇÃO

As micotoxinas são reguladas em mais de 77 países do mundo, com legislações variando de país para país em diferentes produtos (Anklam *et al.*, 2002). Acordos entre organizações de comércio internacional têm eliminado barreiras econômicas. Entretanto, barreiras fitossanitárias e de contaminantes naturais, tais como micotoxinas, têm sido duramente praticadas. Limites de tolerância vêm sendo propostos para as micotoxinas: aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>, ocratoxinas, fumonisinas, patulina, zearalenona e tricotecenos, as quais têm sido consideradas como responsáveis pelos maiores danos econômicos no comércio internacional (FAO, 1997).

O Comitê Científico da FAO/WHO em Aditivos Alimentares (JECFA), após a identificação e caracterização dos riscos e da avaliação toxicológica de aditivos, resíduos de drogas e contaminantes naturais, fornece normalmente subsídios para a estimativa da Ingestão Provisória Semanal Tolerável. O uso do termo provisório expressa a natureza “tentativa” da avaliação, tendo em vista o número reduzido de dados confiáveis disponíveis e a consequência da exposição humana em níveis aproximados aos que o JECFA avalia.

Quando nenhum efeito de carcinogenicidade e genotoxicidade pode ser observado, o JECFA não estabelece o PTWI. Em contrário, o JECFA recomenda que o nível de contaminação seja reduzido para o nível ALARA (“As Low as Reasonably Achievable”), que deve ser entendido como o nível irreduzível para um contaminante, e é definido como a concentração da substância que não pode ser eliminada do alimento sem o envolvimento do descarte deste alimento ou sem comprometer o suprimento de alimentos.

Não há nível seguro de exposição para substâncias potencialmente cancerígenas como OTA. Neste caso, recomenda-se que os limites regulatórios sejam estabelecidos nos níveis mais baixos praticáveis, o que é freqüentemente interpretado como sendo o menor nível confiável que se pode medir analiticamente (FAO, 1997).

Alguns países já possuem legislação para OTA em café ou produtos de café, dentre eles a Grécia (20 µg/kg), Itália (8 µg/kg), Finlândia (10 µg/kg), Suíça (5 µg/kg). A União Européia implantou em março de 2002 limites de tolerância para OTA em cereais e passas. Os limites para café solúvel e torrado recentemente aprovado pela União Européia podem ser observados na Tabela 6.

**Tabela 6:** Legislação para OTA em café, aprovada pela União Européia\*.

| <i>País</i>                        | <i>Limite (µg/kg)</i>           |
|------------------------------------|---------------------------------|
| União Européia                     | 10 (café solúvel)               |
|                                    | 5 (torrado)                     |
| (em discussão pela União Européia) | café verde – previsão para 2006 |

\*Dados obtidos da apresentação: Regulating OTA in coffee in the European Union, apresentado pelo Dr. Frans Verstraete – European Commission DG Health and Consumer Protection feita em Belo Horizonte no Workshop “Ocratoxina A em Café”, em 22 de junho de 2004.

### 3.2.9 SITUAÇÃO DAS MICOTOXINAS NO BRASIL

O Brasil dispõe de limites de tolerância somente para aflatoxinas em alguns produtos e subprodutos de origem vegetal e animal, tais como milho, amendoim, ingredientes de ração e leite. O Ministério da Agricultura através de publicação no diário oficial da união (DOU, 2002), incorporou os limites propostos pelo MERCOSUL (20 µg/kg para a soma de aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> em milho, amendoim e derivados). Portarias

estabelecendo limites para outros produtos existem como: 50 µg/kg para ingredientes de ração (DOU 1988).

De acordo com pesquisas realizadas no Brasil (Leoni *et al.*, 2000, Prado *et al.*, 2000) observa-se no café torrado moído e solúvel uma grande incidência de OTA (Tabela 7).

**Tabela 7:** Incidência de OTA em café torrado moído e solúvel determinado em duas regiões distintas do Brasil.

| <b>Amostra</b>  | <b>Número de amostras analisadas</b> | <b>Amostras contaminadas</b> | <b>Contaminação (µg/kg)</b> | <b>Local da coleta</b> | <b>Referência</b>        |
|-----------------|--------------------------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------|--------------------------|
| Torrado e moído | 34                                   | 23                           | 0,6-6,5                     | Campinas/SP            | Leoni <i>et al.</i> 2000 |
| Solúvel         | 14                                   | 14                           | 0,5-5,1                     | Campinas/SP            | Leoni <i>et al.</i> 2000 |
| Torrado e moído | 47                                   | 87,2%                        | 0,99-5,87                   | Belo Horizonte/MG      | Prado <i>et al.</i> 2000 |
| Solúvel         | 10                                   | 80                           | 0,31-1,78                   | Belo Horizonte/MG      | Prado <i>et al.</i> 2000 |

Pesquisa realizada recentemente no Brasil demonstra que os brasileiros ingerem, em média, aproximadamente cinco xícaras de café ao dia, sendo que 96% dos consumidores de café têm o hábito de preparar o café a partir do café torrado e moído, e somente 4% a partir do café instantâneo. Com base nestes dados e tendo como referência os resultados de análise de 34 amostras de café torrado e moído e solúvel, Leoni *et al.* (2000) previram que a contribuição do café para a ingestão diária de OTA seria de 0,4 ng/kg por peso corpóreo/dia (Peso corpóreo = 70 kg), o que é bem mais baixo que o PTWI de 14 ng/kg proposto pelo JECFA/Codex Alimentarius em 1995.

### 3.2.10 MÉTODOS DE ANÁLISE PARA DETERMINAÇÃO DA OCRATOXINA A

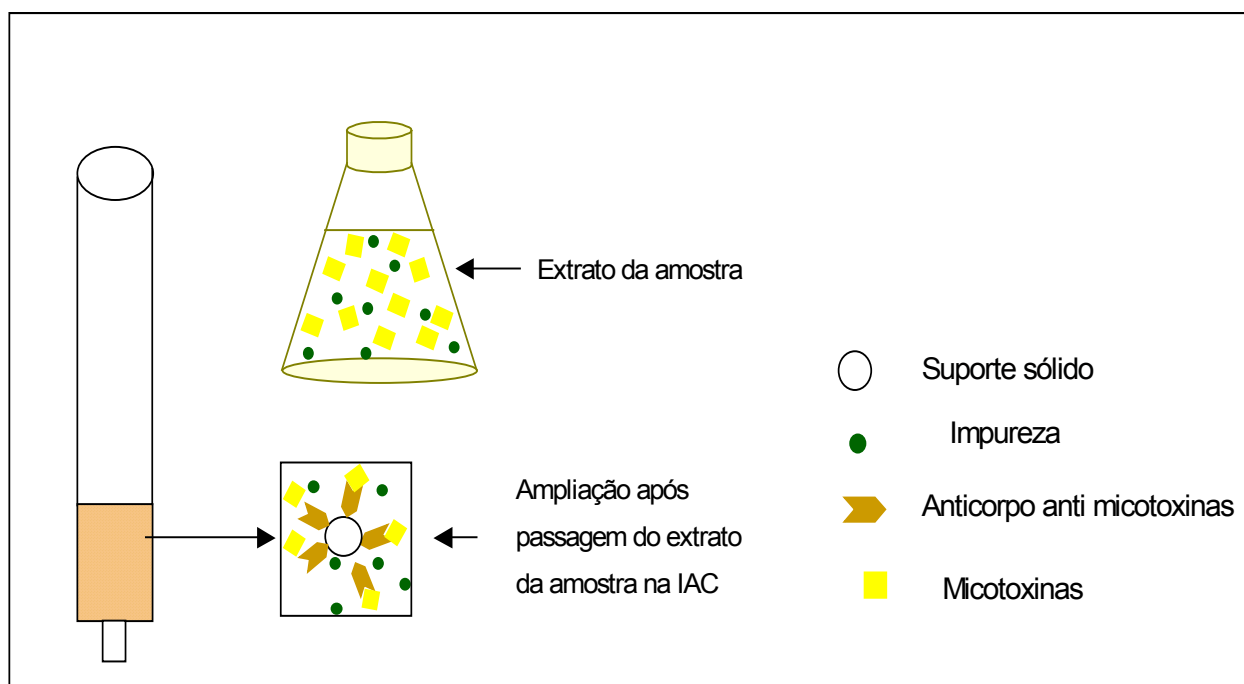
A análise de OTA em café envolve procedimentos de purificação complexos e demorados como extração por solvente, purificação em fase sólida ou uma combinação destes procedimentos (Levi *et al.*, 1974; Levi, 1975; Cantáfora *et al.*, 1983; Terada *et al.*, 1986; Micco *et al.*, 1989; Studer-Rohr *et al.*, 1994; AOAC, 1998; AOAC, 2000; Pittet e Royer, 2002) (Tabela 8).

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 (van Egmond, 1996) (Tabela 8).

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 Européia (Tabela 8).

O segundo grande avanço na determinação de OTA em café se deu com a introdução de colunas de imunoafinidade (IAC) (Figura 2) na etapa de purificação dos extratos (Nakajima *et al.*, 1990) (Tabela 8).

As colunas de imunoafinidade permitem a obtenção de extratos limpos, uma vez que os interferentes presentes nas amostras são eliminados, enquanto as micotoxinas ficam ligadas nos anticorpos específicos para cada toxina, para posterior eluição.



**Figura 2:** esquema com o princípio de funcionamento das colunas de imunoafinidade

A introdução das IAC na etapa de purificação em combinação com cromatografia líquida de fase reversa e detecção por fluorescência foi um procedimento atrativo para a determinação da contaminação do café por OTA (Pittet *et al.*, 1996; Nakajima *et al.*, 1997; Patel *et al.*, 1997; Scott e Trucksess 1997; Jørgensen 1998; Trucksess *et al.*, 1999) produzindo extratos limpos, cromatogramas bem definidos e sem interferentes no tempo de retenção da OTA. As IAC têm se mostrado eficientes para purificação tanto de extratos de café beneficiado, quanto de café torrado e solúvel (Pittet *et al.*, 1996). As etapas de separação, detecção e quantificação são geralmente realizadas por CLAE ou CCD, técnicas atualmente mais utilizadas e aceitas para vários tipos de alimentos. O uso das IACs têm permitido a obtenção de baixos limites de detecção como 0,12  $\mu\text{g}/\text{kg}$  por CLAE (Vargas *et al.*, 2002) e 0,5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  por CCD/ visual/ densitometria (Santos e Vargas, 2002) para OTA em café beneficiado (Tabela 8).

**Tabela 8:** Principais características dos métodos para determinação de ocratoxina A em café

| Matriz                                  | Purificação                                  | Deteccção/<br>quantificação | LD/LQ<br>(µg/kg)      | Recuperação (%)                    | (%) desvio padrão<br>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 <sub>r</sub> : 21-32 DPR <sub>R</sub> :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<br>2<br>2<br>0,2    | 89,5; 80,7<br>81,5<br>89,7<br>92,1 | 3,74; 4,26<br>5,93<br>3,43<br>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<br>Dados não disponíveis     | 2,4<br>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<sub>r</sub>:= desvio padrão relativo de repetibilidade; DPR<sub>R</sub>:= desvio padrão relativo de reprodutibilidade; IAC=coluna de imunoafinidade; LQ\LD limites de deteção/quantificação.

**Tabela 8 (continuação):** Principais Características dos métodos para determinação de ocratoxina A em café

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

**Obs:** CCD=cromatografia de camada delgada; CLAE=cromatografia líquida de alta eficiência; SPE=: extração de fase sólida; DPR<sub>r</sub>:= desvio padrão relativo de repetibilidade; DPR<sub>R</sub>:= desvio padrão relativo de reprodutibilidade; IAC=coluna de imunoafinidade; LQ\LD limites de deteção/quantificação.

**Tabela 8 (continuação):** Principais Características dos métodos para determinação de ocratoxina A em café

| Matriz                            | Purificação  | Deteção/<br>quantificação | LD/LQ<br>( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) | Recuperação (%)           | (%) desvio padrão<br>relativo  | Referência                        |
|-----------------------------------|--|---------------------------|--------------------------------------|---------------------------|--|-----------------------------------|
| Café solúvel<br>Café torrado      | IAC preparada<br>(0.8-1.0 $\mu\text{g}$<br>capacidade de<br>ligação) | CLAE                      | 0.1                                  | 98                        | Dados não disponíveis  | Nakajima<br><i>et al.</i> , 1997  |
| Café solúvel<br>e<br>Café torrado | Celite e<br>bicarbonato sílica<br>gel e<br>IAC                       | CLAE                      | 0.1                                  | 91 (70-110)<br>84 (70-98) | 5,1  | Patel <i>et al.</i> ,<br>1997     |
|                                   | Silica sep-pak e<br>IAC  |                           |                                      | 87                        | 4,8  |                                   |
| Café torrado                      | IAC  | CLAE                      | 0.1                                  | 75 (59-83)                | Dados não disponíveis  | Jørgensen,<br>1998                |
| Café verde<br>Café torrado        | IAC  | CLAE                      | 0,03                                 | 86-90<br>75-81            | 2,3-8,8<br>3,1-3,8   | Trucksess<br><i>et al.</i> , 1999 |
| Café torrado                      | Fenil silano /IAC  | CLAE                      | 0,1                                  | 85 (65-97)                | DPR <sub>r</sub> : 6 DPR <sub>R</sub> :13<br>DPR <sub>r</sub> : 2-27 DPR <sub>R</sub> :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<sub>r</sub>:= desvio padrão relativo de repetibilidade; DPR<sub>R</sub>:= desvio padrão relativo de reprodutibilidade; IAC=coluna de imunoafinidade; LQ/LD limites de deteção/quantificação.



**Tabela 8 (continuação):** Principais Características dos métodos para determinação de ocratoxina A em café

| Matriz       | Purificação                          | Deteccão/<br>quantificação       | LD/LQ<br>( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) | Recuperação (%)                       | (%) desvio padrão<br>relativo  | Referência                   |
|--------------|--------------------------------------|----------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|--|------------------------------|
| Café torrado | Aminopropil<br>( $\text{NH}_2$ )/IAC | CLAE                             | Dados não disponíveis                | 72-84                                 | Dados não disponíveis  | Sibanda <i>et al.</i> , 2002 |
| Café verde   | Partição líquido-<br>líquido         | CCD visual<br>Bi-<br>dimensional | 10                                   | Dados qualitativos não<br>disponíveis | Dados não disponíveis  | Pittet e<br>Royer,<br>2002   |
| Café verde   | IAC                                  | TLC visual                       | 0,5                                  | 82-109                                | 0,0-18,8   | Santos e<br>Vargas,<br>2002  |
|              |                                      | CCD<br>densitometria             |                                      | 83,7-133                              | 0,0-14,4<br>- 24,9   |                              |
|              |                                      |                                  |                                      |                                       | 9,3-20,3   |                              |
| Café verde   | IAC                                  | CLAE                             | 0.1                                  | 85 (65-97)                            | DPR <sub>r</sub> : 7,42 DPR <sub>R</sub> :16,34<br>DPR <sub>r</sub> : 9-16 DPR <sub>R</sub> :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<sub>r</sub>:= desvio padrão relativo de repetibilidade; DPR<sub>R</sub>:= desvio padrão relativo de reprodutibilidade; IAC=coluna de imunoafinidade; LQ/LD limites de deteção/quantificação.

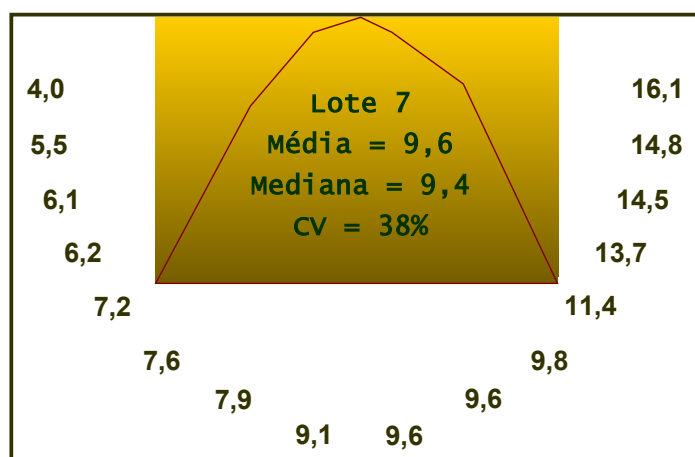
Ensaio imunoenzimáticos, ELISA e fluorimetria (van Egmond, 1996; Scott *et al.*, 1998) também têm sido utilizados para triagem e quantificação de OTA, embora, até o momento, a sensibilidade e eficiência destes Kits sejam questionadas (Viani, 2000).

Os métodos analíticos têm sido responsáveis por apenas 10% dos erros encontrados na determinação de micotoxinas e conseqüentemente de ocratoxina A, enquanto que 90% são decorrentes da amostragem.

### **3.2.11 AMOSTRAGEM**

Devido à heterogeneidade na distribuição das micotoxinas em um lote, faz-se necessário a utilização de planos de amostragem específicos, sendo que estes devem levar em consideração as legislações existentes. É consensual a importância do uso de planos de amostragem para micotoxinas em produtos de origem vegetal, assim como a certeza de que resultados confiáveis só podem ser obtidos se amostras representativas dos lotes e suficientemente homogêneas foram utilizadas (Coker and Whitaker, 2001). Um plano de amostragem para OTA é normalmente definido com base em limite de aceita/rejeita, dado por linhas que separam lotes bons de lotes contaminados, sendo que essas linhas são usualmente representadas por limites máximos legais (legislações) (Vargas *et al.*, 2004). Devido à incerteza associada com a amostragem, o preparo da amostra e a análise, a contaminação de um lote de café não pode ser determinado com certeza de 100%.

Para uma amostra de 16 kg, obtida de incrementos de 200 gramas, em um mesmo lote de café beneficiado, devidamente homogeneizada e fracionada em sub-amostras de 1kg, após moagem e análise para determinação de ocratoxina A, observou-se o perfil de contaminação mostrado na Figura 3, com variação de 4 a 16  $\mu\text{g}/\text{kg}$  e média foi 9,6  $\mu\text{g}/\text{kg}$  nas amostras de 1kg.



**Figura 3:** Distribuição da OTA observada em 16 sub-amostras de 1 kg de café beneficiado, oriunda de uma amostra global de 16 kg e de mesmo lote (\*\*).

\*\*Dados obtidos da apresentação: Design of Sampling Plans for Testing Ocratoxin A in Green Coffee, apresentado pelo Dr. Whitaker, T. B., – USDA/ARS proferida em Belo Horizonte no Workshop “Ocratoxina A em Café”, em 22 de junho de 2004.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

---

### 4.1 MATERIAL

- adaptadores para tubos de 1, 3 e 6 mL, tipo Bond – elut, Varian;
- aparato para filtração à vácuo com reservatório de 300 mL e base do funil de 47 mm, com rolha para conexão ao kitasato;
- balões volumétricos âmbar ou provetas de 100 mL;
- balões volumétricos de 1000 e 2000 mL;
- banho de aquecimento com agitação;
- béqueres de 100 e 600 mL;
- bulbos conta-gotas;
- colunas de imunoafinidade contendo anticorpos específicos para OTA com capacidade de 100 ng e que apresente recuperação maior que 80%;
- frascos de vidro com capacidade para 1 L, tipo Mason;
- frascos para injetor automático para cromatógrafo líquido de 1 mL com tampa snap-cap, tipo Alltech;
- funis de vidro de haste curta com 7 cm de diâmetro;
- garra em anel para funil;
- garra para conexão das partes do aparato de filtração;
- grades para tubos;
- hélice de aço inoxidável;
- kitasatos de 500 e 1000 mL;
- membrana de fibra de vidro com 55 mm de diâmetro, 1  $\mu\text{m}$ , tipo Whatman GF/B;
- membrana filtrante de 0,45  $\mu\text{m}$ ;
- micropipetas automáticas com capacidade de 100 a 5000  $\mu\text{L}$ ;
- papel alumínio;
- papel de filtro qualitativo pregueado com 18 cm de diâmetro;

- parafilme;
- pãra de borracha;
- pipetas de Pasteur;
- pipetas graduadas;
- ponteiras para micropipetas automáticas;
- provetas graduadas de 10, 250 e 1000 mL;
- seringas de polipropileno de 50 mL, tipo luer;
- seringas de vidro de 10 mL, tipo luer;
- sistema de filtração a vácuo com controle individual de fluxo.
- torneiras de polipropileno, tipo Bond-elut, Varian;
- tubos de ensaio de 10 mL.

#### **4.2 EQUIPAMENTOS**

- aparelho de ultra-som;
- balança analítica com no mínimo 4 casas decimais;
- balança eletrônica com 2 casas decimais;
- cromatográfico líquido de alta eficiência, Shimadzu 10ADVP, acoplado com os seguintes acessórios: auto-injetor, detector de fluorescência, coluna 250 x 4,6 mm Shimpack CLC-ODS (M) partículas de 5  $\mu\text{m}$ , pré-coluna Shimpack CLC-ODS (M), sistema de desgaseificação da fase móvel com hélio e loop de 20 $\mu\text{L}$ ;
- freezer (temperatura  $\leq -15^{\circ}\text{C}$ );
- geladeira (temperatura  $\leq +7^{\circ}\text{C}$ ); homogeneizador de amostras com velocidade mínima de 800 rpm;
- homogeneizador de amostras;
- moinhos do tipo Arbel
- micropipetas automáticas;
- torrador
- sistema de filtração a vácuo.

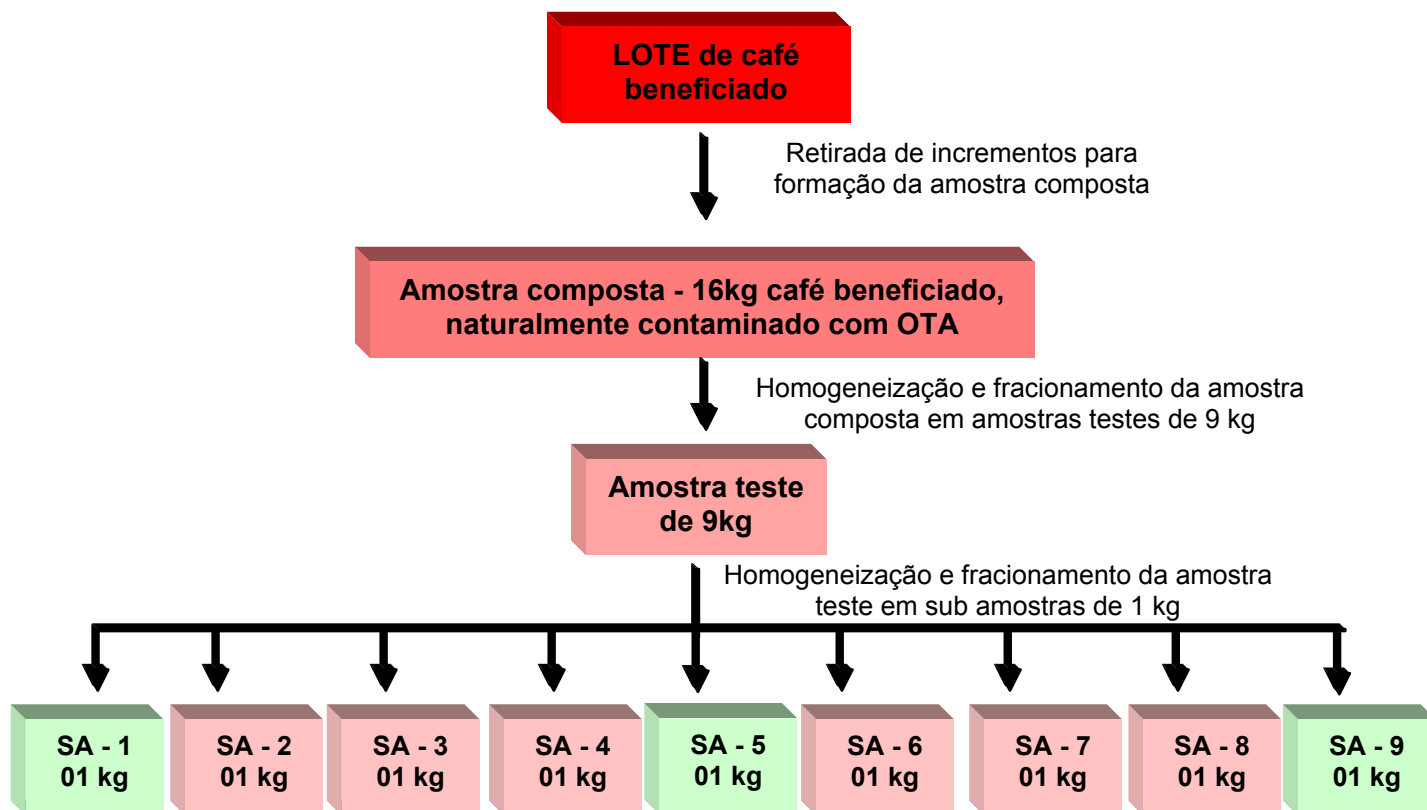
### 4.3 REAGENTES E SOLUÇÕES

- acetonitrila grau HPLC;
- ácido acético glacial grau p.a.;
- água deionizada filtrada;
- água deionizada/ ácido acético (29:1, v/v), filtrada em membrana de 0,45  $\mu\text{m}$ ;
- bicarbonato de sódio 3%/ metanol grau p.a (1:1, v/v);
- bicarbonato de sódio grau p.a.;
- cloreto de potássio grau p.a.;
- cloreto de sódio grau p.a.;
- dihidrogênio fosfato de potássio grau p.a.;
- hidrogênio fosfato disódio anidro grau p.a.;
- metanol grau HPLC/ ácido acético (99:1, v/v);
- metanol grau HPLC;
- metanol grau p.a., HPLC ou p.a.r.;
- metanol grau p.a.;
- metanol/ acetonitrila/ água/ ácido acético (35:35:29:1, v/v/v/v);
- solução padrão de ocratoxina A;
- solução padrão estoque de OTA ( $\approx 40 \mu\text{g/mL}$ ) e solução trabalho em tolueno ácido acético (99:1,v/v);
- solução tampão PBS 0,1%, pH 7,4;
- solução tampão PBS 0,1%;
- soluções padrão de OTA, para curva de calibração em metanol/ acetonitrila/ água/ ácido acético (35:35:29:1, v/v/v/v);
- tolueno grau p.a.r. ou HPLC;
- tolueno/ ácido acético (99:1, v/v).

#### 4.4 AMOSTRAS

Amostras de café beneficiado (café verde), do tipo arábica, foram coletadas pelo DECAF/PR no estado do Paraná, em 4 lotes previamente monitorados e identificados como potencialmente contaminados com OTA. Na coleta das amostras foi utilizado um plano amostral validado para determinação de ocratoxina A em café (Vargas *et al.*, 2004 a, b) que consistiu basicamente em:

- Coleta utilizando calador, de pequenas porções (incrementos de 200g) de grãos de café beneficiado, em diferentes locais, cobrindo todo o lote. Os incrementos foram reunidos formando uma amostra composta de 16 kg, representativa de cada lote;
- Cada amostra composta de 16 kg foi devidamente homogeneizada seguido da retirada de amostras teste de 9 kg que foram utilizadas neste estudo;
- Cada amostra teste de 9 kg foi fracionada em 9 sub-amostras de 1 kg, foram numeradas sistematicamente de 1 a 9. Foram retiradas 3 sub-amostras (1, 5 e 9) que foram analisadas para determinação de OTA no café beneficiado. As seis sub-amostras restantes foram submetidas a dois níveis de torração: (i) clara/média e (ii) escura e foram analisadas para avaliação da degradação da OTA (Figura 4).
- Foram utilizadas, como controle das análises de OTA, amostras brancas (previamente analisadas, com contaminação  $<0,12 \mu\text{g}/\text{kg}$ ), de café beneficiado e café torrado, artificialmente contaminadas com padrão de ocratoxina A, para avaliação da recuperação do método analítico em cada leva de amostras analisadas.
- O condensado dos gases obtido durante o processo de torrefação foi coletado e analisado para determinação qualitativa de OTA.



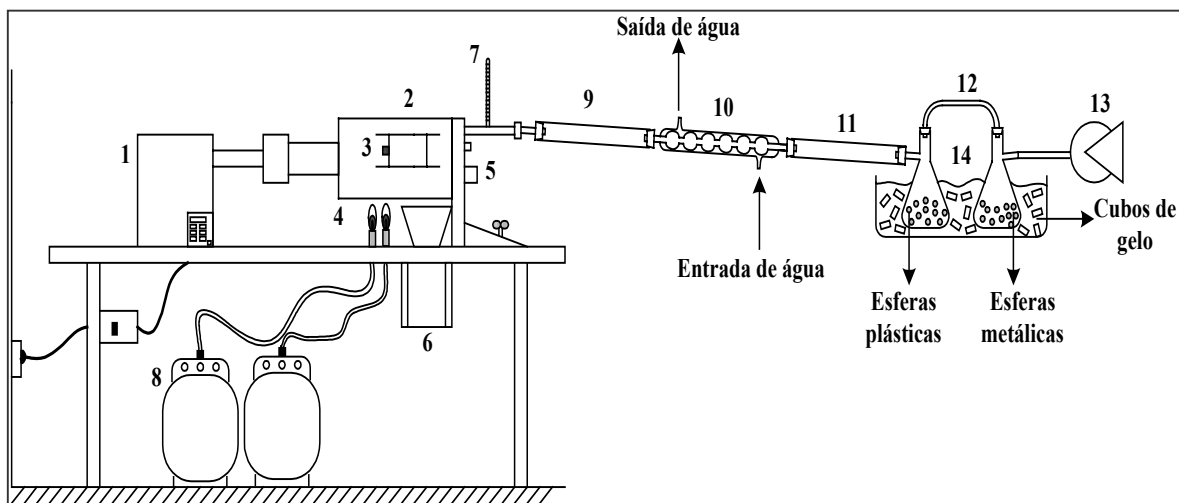
**Figura 4:** Procedimento para fracionamento das amostras

#### 4.5 TORREFAÇÃO

Os ensaios de torração foram executados utilizando os procedimentos descritos por Borges *et al.*, (2002). Foi utilizado um sistema que consiste de um cilindro rotativo acoplado a um sistema de captação dos gases de exaustão (Figura 5). O torrador, em movimento rotativo a 80 rpm foi pré-aquecido a 180 °C e então carregado com 1kg de café. Para cada amostra, representativa de um lote, foi realizada torra em triplicata (sub-amostras 2, 3, 4, 6, 7 e 8), conforme esquematizado na Figura 4.

O grau de torração foi pré-estabelecido com base no valor médio de temperatura dos grãos de café: 190°C para torra clara/média e 210°C para torra escura. Após cada ensaio, todo o sistema foi desmontado e lavado com clorofórmio, água e etanol para limpeza e descontaminação. Cada amostra foi pesada antes e após a torra, para avaliação da perda de massa percentual.





**Figura 5** - Sistema de torração: (1) Motor, (2) Cilindro Rotativo, (3) Alimentação de Grãos, (4) Aquecimento, (5) Coleta de amostras de grãos, (6) Coleta de grãos torrados, após o término do experimento, (7) Termômetro, (8) Bujões de gás, (9), (11) e (12) Mangueiras, (10) Condensador de Bolas, (13) Bomba de Vácuo e (14) Kitassatos.

## 4.6 PREPARO E HOMOGENEIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

### 4.6.1 MOAGEM

As sub-amostras de 1kg de café beneficiado (café cru) e de café torrado foram moídas em moinhos do tipo Arbel, na sua totalidade, para obtenção de granulometria de 20 mesh (~1 mm).

Entre cada amostra foi procedida a limpeza e descontaminação dos moinhos, a seco, utilizando agulhas, pincéis, ar comprimido e vácuo, evitando dessa forma a contaminação cruzada das amostras.

### 4.6.2 HOMOGENEIZAÇÃO

Após a moagem, as sub-amostras de um quilo de café beneficiado e café torrado foram homogeneizadas em equipamento tipo bateadeira por 20 minutos.

Entre cada amostra foram procedidas a limpeza e descontaminação dos homogeneizadores com hipoclorito de sódio a 1%, lavagem com água e detergente neutro e etanol.

#### **4.6.3 ARMAZENAMENTO**

As sub-amostras de café beneficiado e torrado foram acondicionadas em sacos plásticos apropriados, devidamente identificados com o número da amostra teste e respectiva sub-amostra, e foram armazenadas em câmara fria ou freezer ( $T < -15\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) até o momento da análise.

#### **4.7 METODOLOGIA PARA EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO, DETERMINAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA OCRATOXINA A**

As amostras de café verde e café torrado foram analisadas de acordo com método oficial do MAPA, publicado no Diário Oficial da União (DOU, 2000). As principais etapas do procedimento de análise podem ser observados no Fluxograma da Figura 6.

Durante as análises para determinação de OTA foram realizados controles de bancada com amostras artificialmente contaminadas com padrão de OTA (Sigma, St. Louis MO) para avaliação da recuperação.

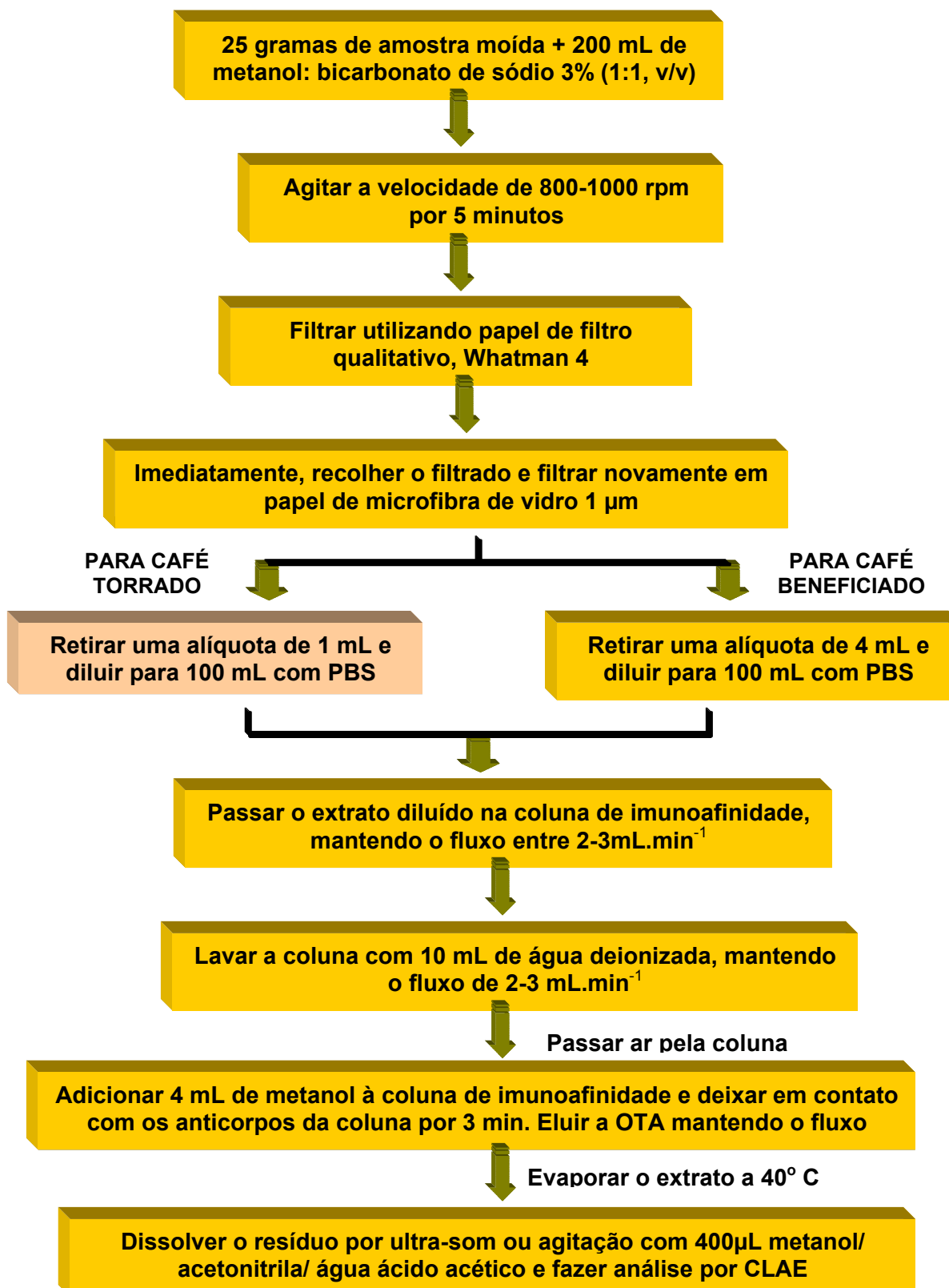
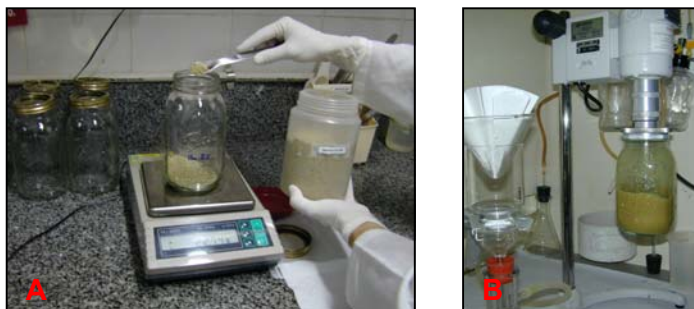


Figura 6: Metodologia para extração de OTA em café

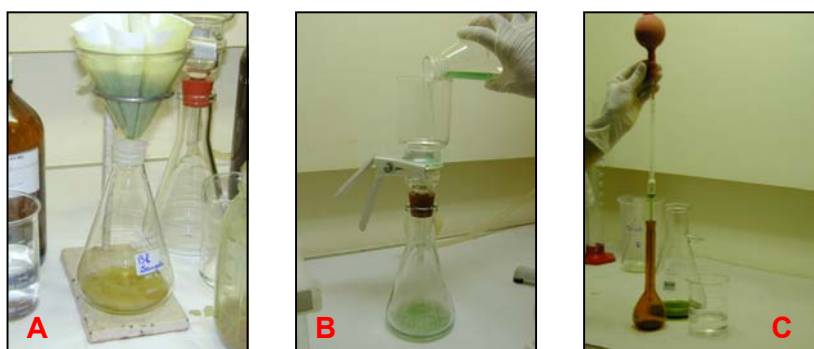
#### 4.7.1 EXTRAÇÃO E FILTRAÇÃO

Amostras de 25,00 g (Figura 7 A) de café beneficiado e torrado foram submetidas à extração da ocratoxina A. As amostras foram agitadas por 5 minutos em 200mL de metanol/ bicarbonato de sódio 3% (1:1, v/v) utilizando um agitador omni mix, na velocidade entre 800 e 1000 rpm (Figura 7 B).



**Figura 7:** (A) Etapas de pesagem de 25 gramas e (B) extração das amostras de café.

Após extração, o extrato foi filtrado utilizando papel de filtro Whatman nº 4, seguido de uma segunda filtração com papel de fibra de vidro Whatman 1,0  $\mu\text{m}$  (Figuras 8 A e 8 B). Alíquotas do filtrado de 4 e de 1 mL foram retiradas para o café beneficiado e torrado, respectivamente (Figura 8 C). As alíquotas de 4 e de 1 mL dos filtrados foram diluídos para 100 mL com PBS (tampão de fosfato pH, 7,4).



**Figura 8:** (A) Montagem utilizada na filtração do extrato utilizando papel de filtro whatman nº 4 (B) e de fibra de vidro whatman 1,0  $\mu\text{m}$  e (C) retirada da alíquota do filtrado.

#### 4.7.2 PURIFICAÇÃO DO EXTRATO

Os 100 mL do extrato diluído foi passado pela coluna de imunoafinidade (Ochratest – Vicam, Watertown. USA), sob vácuo, com um fluxo controlado de 2-3 mL.minuto<sup>-1</sup> para purificação (Figura 9).

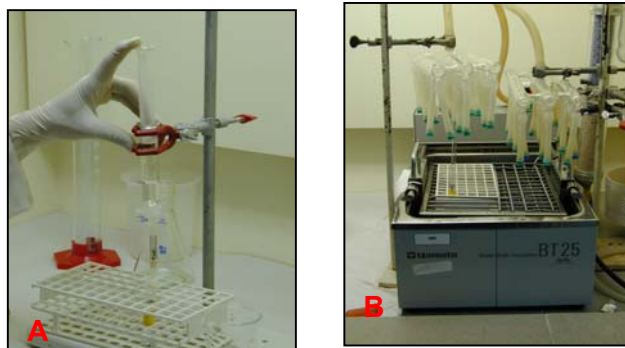
Após passagem de todo extrato, a coluna de imunoafinidade foi lavada com 10 mL de água deionizada, mantendo o fluxo.



**Figura 9:** Esquema utilizado para os procedimentos de purificação do extrato e lavagem da coluna de imunoafinidade.

#### 4.7.3 ELUIÇÃO E EVAPORAÇÃO

Foram adicionados 4 mL de metanol grau HPLC na coluna de imunoafinidade, deixando o metanol em contato com os anticorpos por 3 minutos. Em seguida, a OTA presente nas amostras foi eluída da coluna de imunoafinidade, mantendo o fluxo de 2-3 mL.minuto<sup>-1</sup> (Figura 10 A). O eluato foi evaporado em banho-maria com agitação, à temperatura de 40 °C, sob fluxo de ar comprimido purificado (Figura 10 B).



**Figura 10:** (A) Eluição da OTA com metanol e (B) esquema na evaporação do extrato a 40 °C, sob fluxo de ar comprimido purificado.

#### 4.7.4 DETERMINAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO

O resíduo obtido após evaporação foi dissolvido com 400  $\mu\text{L}$  de metanol/ acetonitrila/ água/ ácido acético (35:35:29:1, v/v/v/v), seguido de agitação em agitador de tubos, por um minuto, para completa dissolução.

Uma alíquota de 20 $\mu\text{L}$  foi injetada no cromatógrafo líquido de alta eficiência, com fase móvel metanol/ acetonitrila/ água/ ácido acético (35 35:29:1, v/v/v/v), filtrada em papel de filtro de 0,45  $\mu\text{m}$ , desgaseificada em ultra-som; no comprimento de onda  $\lambda_{\text{excitação}} = 332\text{nm}$  e  $\lambda_{\text{emissão}} = 476\text{nm}$  e fluxo de 0,8  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ .

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

---

As análises para determinação de OTA foram realizadas sob um Sistema de Qualidade ISO/IEC 17025, garantindo confiabilidade e rastreabilidade dos dados.

Os resultados apresentados a seguir são referentes a ensaios de torra e determinação de ocratoxina A. Foram avaliadas amostras representativas de 4 lotes de café beneficiado, naturalmente contaminados com OTA, sendo cada lote com aproximadamente 25 toneladas.

### **5.1 PERDA DE MASSA PELA TORRA**

Os resultados e valores de perda de massa são apresentados na Tabela 9. Observa-se que não houve variações na perda de massa entre as amostras, para cada grau de torração. Como esperado, a perda de massa foi mais significativa para a torra escura (~19% em média) em comparação com a torra clara/média (~14% em média). Como não foi observado grandes variações na perda de massa da amostra durante a torra, para o mesmo tipo de torra, fez-se uso da média dos valores das perdas de massa obtidos para cada lote, para cada grau de torração, na conversão da base de café torrado para café verde, de forma a eliminar o efeito da perda de massa na avaliação da degradação da OTA. Para o Lote 1 não foi possível determinar a temperatura de torra, assim como a perda de massa, uma vez que para esse Lote o grau de torra foi estabelecido em função do tempo e não da temperatura. Na seqüência o procedimento foi revisto para obtenção de torra mais homogêneas.

**Tabela 9:** Temperatura e perda de massa em função do grau de torração

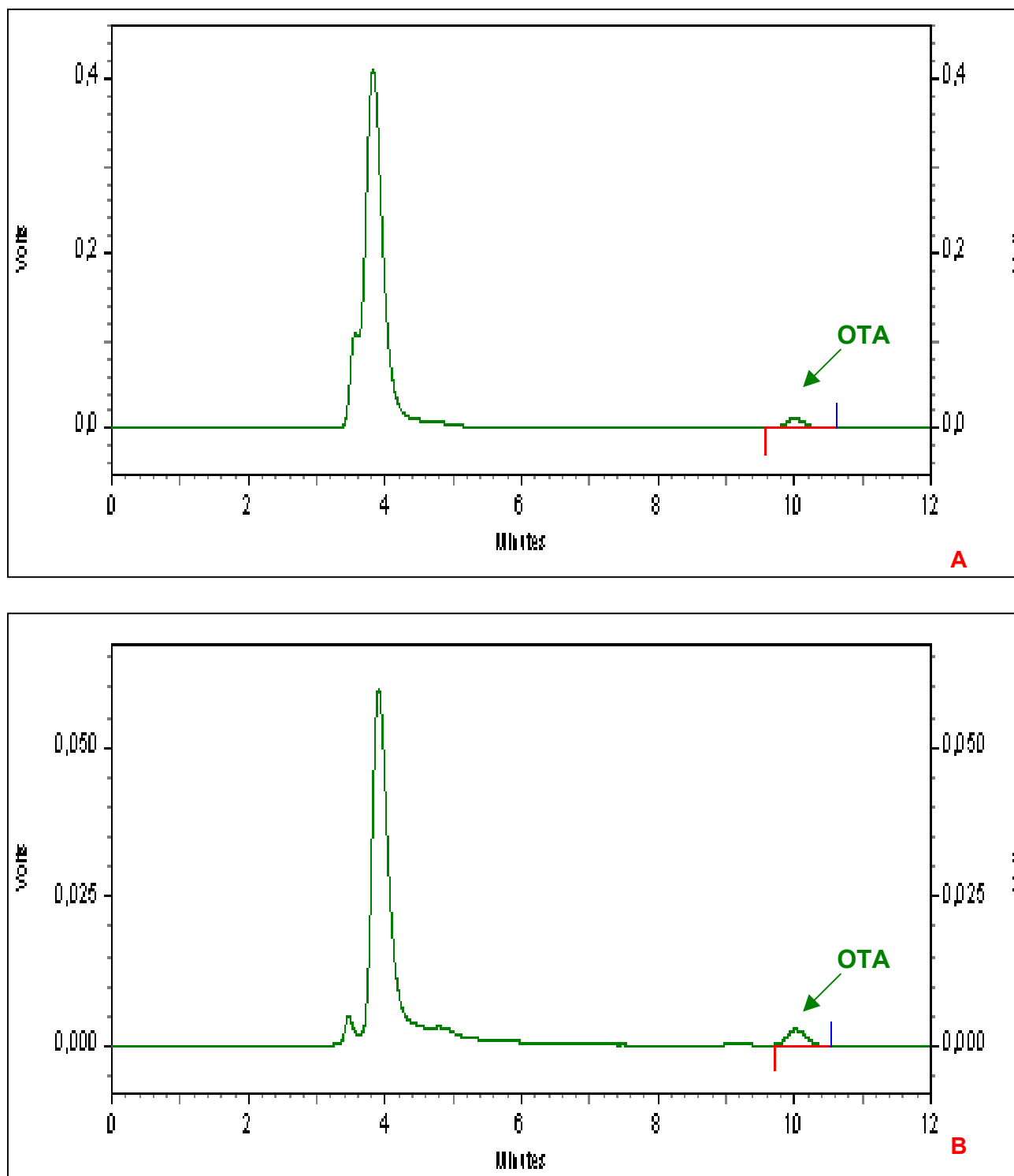
| Lote | Amostra | Grau de Torração | Temperatura °C | Perda de Massa (%) | % P.M. média |
|------|---------|------------------|----------------|--------------------|--------------|
| 2    | A7      | Clara/média      | 190            | 13,13              | 13,30        |
|      | A8      | Clara/média      | 190            | 12,66              |              |
|      | A4      | Clara/média      | 190            | 14,10              |              |
|      | A2      | Escura           | 210            | 14,18              | 16,25        |
|      | A3      | Escura           | 210            | 18,32              |              |
| 3    | A7      | Clara/média      | 190            | 14,74              | 14,77        |
|      | A6      | Clara/média      | 190            | 14,05              |              |
|      | A4      | Clara/média      | 190            | 15,52              |              |
|      | A2      | Escura           | 210            | 21,06              | 20,52        |
|      | A8      | Escura           | 210            | 19,98              |              |
|      | A3      | Escura           | 210            | 21,28              |              |
| 4    | A6      | Clara/média      | 190            | 13,11              | 13,70        |
|      | A2      | Clara/média      | 190            | 14,09              |              |
|      | A8      | Clara/média      | 190            | 13,92              |              |
|      | A7      | Escura           | 210            | 21,65              | 20,08        |
|      | A4      | Escura           | 210            | 18,50              |              |
|      | A3      | Escura           | 210            | 22,68              |              |

## 5.2 OTA NAS AMOSTRAS DE CAFÉ BENEFICIADO

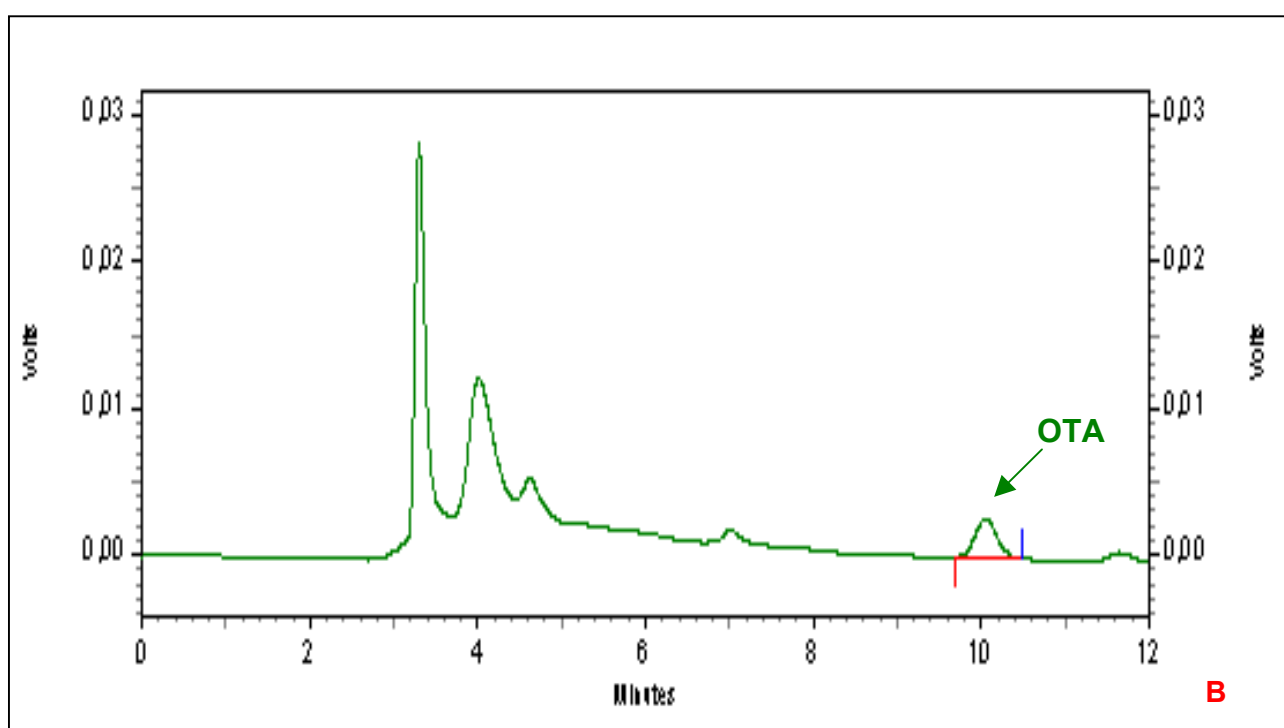
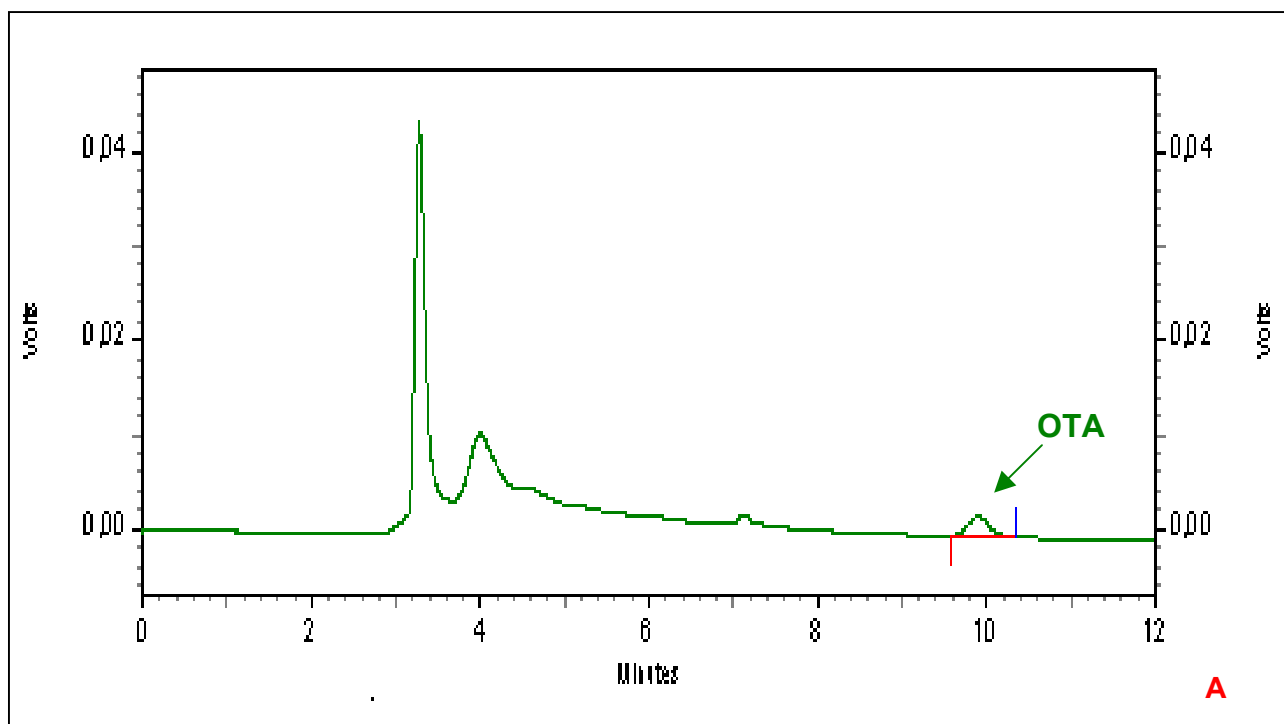
Os resultados referentes à avaliação da contaminação de OTA nas sub-amostras de café cru são apresentados na Tabela 10.

O sinal da OTA foi observado no tempo de retenção entre 9,5 e 10,5 min, completamente separado dos interferentes para café beneficiado (Figuras 11 A e B) e para café torrado (Figuras 12 A e B). A OTA presente nas amostras foi quantificada utilizando uma curva de calibração com soluções padrão de OTA  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  com, no mínimo, cinco concentrações diferentes de OTA atendendo a faixa de contaminação de 0,12 a 30,00  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (Figura 13).

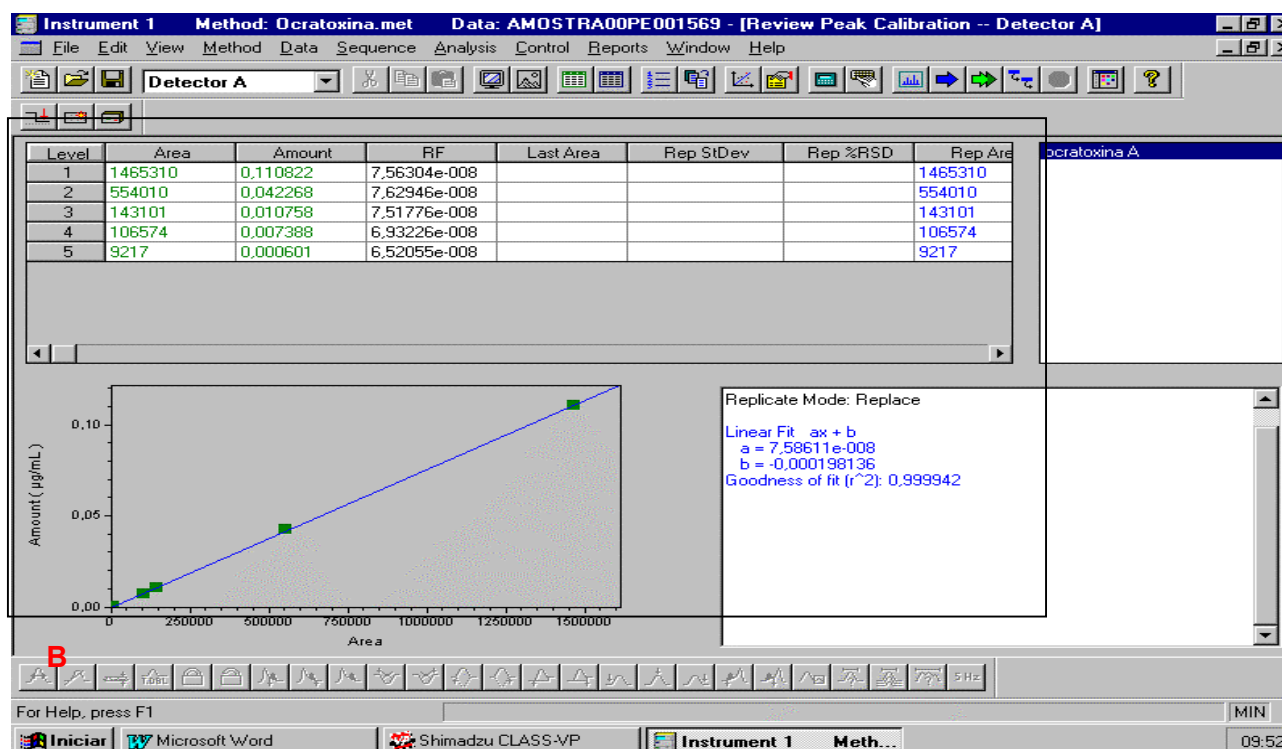
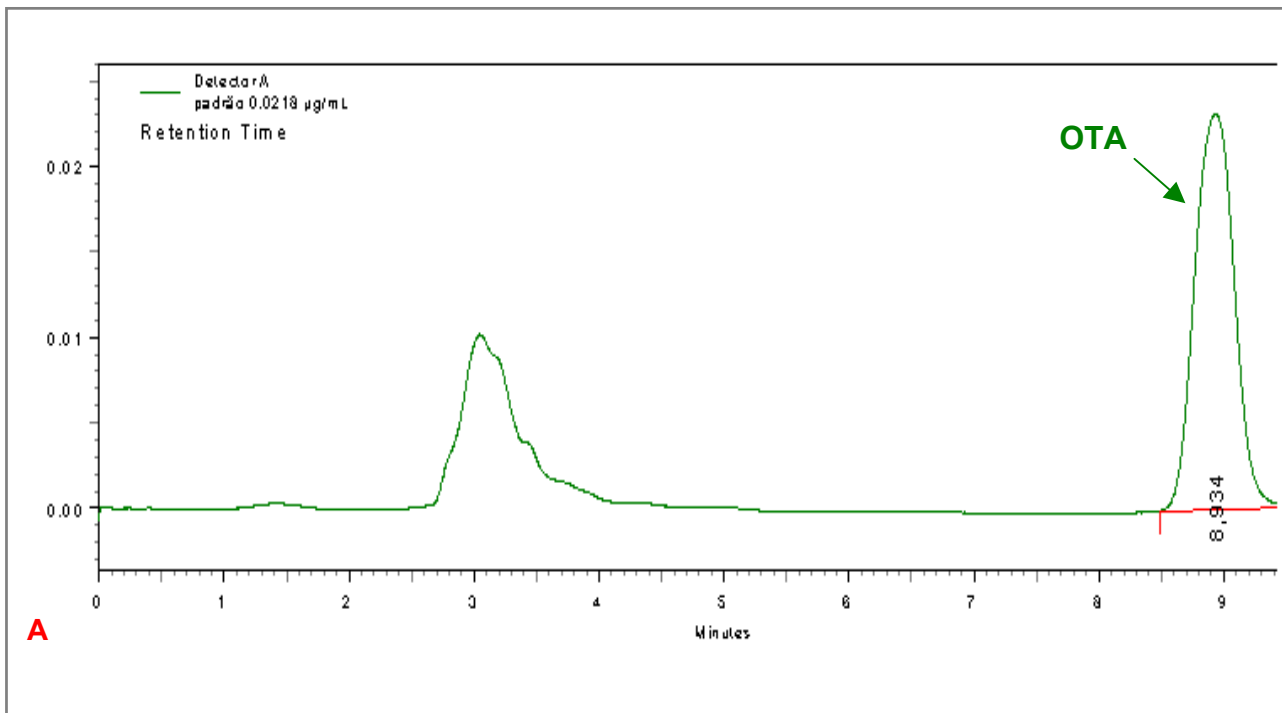




**Figura 11:** Cromatogramas obtidos para amostras de café beneficiado (A) artificialmente e (B) naturalmente contaminadas com OTA.



**Figura 12:** Cromatograma obtido para amostras de café torrado (A) artificialmente e (B) naturalmente contaminadas com OTA



**Figura 13:** (A) Cromatograma da solução padrão de OTA na concentração de 0,0218 µg/mL (B) curva de calibração de OTA obtida para 5 concentrações da solução padrão,  $r^2=0,999942$

**Tabela 10:** OTA determinada nas três sub-amostras de café beneficiado para cada um dos quatro lotes de café beneficiado

| Amostra | OTA determinada em cada sub-amostra ( $\mu\text{g}$ OTA /kg café cru) | Contaminação média de cada lote ( $\mu\text{g}$ OTA /kg café cru) | Desvio padrão | Coefficiente de variação (%) |       |
|---------|---|---|---------------|------------------------------|-------|
| Lote 1  | A1  | 19,75   | 16,3          | 6,0                          | 37,0  |
|         | A5  | 9,34  |               |                              |       |
|         | A9  | 19,80   |               |                              |       |
| Lote 2  | A1  | 23,20   | 11,7          | 10,3                         | 88,1  |
|         | A5  | 8,25  |               |                              |       |
|         | A9  | 3,52  |               |                              |       |
| Lote 3  | A1  | 7,51  | 20,3          | 26,0                         | 127,5 |
|         | A5  | 3,32  |               |                              |       |
|         | A9  | 50,20   |               |                              |       |
| Lote 4  | A1  | 6,62  | 7,5           | 4,2                          | 56,6  |
|         | A5  | 12,03   |               |                              |       |
|         | A9  | 3,72  |               |                              |       |

### 5.3 OTA NAS AMOSTRAS DE CAFÉ TORRADO

As seis sub-amostras de café torrado foram analisadas em duplicata para determinação da OTA. As contaminações determinadas nas amostras de café torrado podem ser observadas nas Tabelas 11 e 12, para a torra clara/média e a torra escura, respectivamente. O efeito da torração na degradação da OTA pode ser observado na Figura 14.

**Tabela 11:** OTA determinada nas sub-amostras de café após a torra clara/média

| Amostra | Contaminação de OTA (µg OTA /kg café torrado) | Contaminação de OTA (µg OTA /kg café torrado) considerando a perda de massa | Contaminação média por sub-amostra (µg OTA /kg café torrado) | Contaminação média por lote (µg OTA /kg café torrado) | Desvio padrão (%) | Mediana (µg OTA /kg café torrado) | Coefficiente de variação (%) |      |
|---------|---|---|--|---|-------------------|-----------------------------------|------------------------------|------|
| Lote 1  | A4  | 2,37  | 2,13   | 2,36  | 3,34              | 7,89                              | 51,42                        |      |
|         |   | 2,88  | 2,59   |   |                   |                                   |                              |      |
|         | A6  | 11,52   | 10,37  | 9,16  |                   |                                   |                              | 6,50 |
|         |   | 8,83  | 7,95   |   |                   |                                   |                              |      |
| A10     |   | 9,06  | 8,15   | 7,99  |                   |                                   |                              |      |
|         |   | 8,70  | 7,83   |   |                   |                                   |                              |      |
| Lote 2  | A4  | 7,20  | 6,48   | 6,48  | 2,74              | 1,87                              | 113,93                       |      |
|         |   | -   | -  |   |                   |                                   |                              |      |
|         | A7  | 2,08  | 1,87   | 2,78  |                   |                                   |                              | 2,41 |
|         |   | 4,10  | 3,69   |   |                   |                                   |                              |      |
|         | A8  | ND  | ND   | ND  |                   |                                   |                              |      |
|         | ND  | ND  |  |   |                   |                                   |                              |      |

**Observações:** Análises realizadas em duplicata. Sub-amostra 6 referente ao lote 2 foi perdida durante a torra e para a sub-amostra 4 deste mesmo lote não foi possível a análise em duplicata, devido à problemas analíticos. ND = não determinado (menor que o limite de detecção do método – 0,12 µg/kg)

**Tabela 11 (continuação):** OTA determinada nas sub-amostras de café após a torra clara/média

| Amostra   | Contaminação de OTA (µg OTA /kg café torrado) | Contaminação de OTA (µg OTA /kg café torrado) considerando a perda de massa | Contaminação média por sub-amostra (µg OTA /kg café torrado) | Contaminação média por lote (µg OTA /kg café torrado) | Desvio padrão (%) | Mediana (µg OTA /kg café torrado) | Coefficiente de variação (%) |
|-----------|---|---|--|---|-------------------|-----------------------------------|------------------------------|
| A4        | 0,00  | 0,00  | 0,16   |   |                   |                                   |                              |
|           | 0,35  | 0,32  |  |   |                   |                                   |                              |
| Lote3 A6  | 3,97  | 3,57  | 3,41   | 4,79  | 4,9               | 3,4                               | 102,8                        |
|           | 3,62  | 3,25  |  |   |                   |                                   |                              |
| A7        | 13,18   | 11,87   | 10,79  |   |                   |                                   |                              |
|           | 10,78   | 9,71  |  |   |                   |                                   |                              |
| A2        | 2,78  | 2,51  | 2,89   |   |                   |                                   |                              |
|           | 3,65  | 3,28  |  |   |                   |                                   |                              |
| Lote 4 A6 | 2,85  | 2,56  | 2,49   | 3,16  | 0,8               | 2,9                               | 25,6                         |
|           | 2,69  | 2,42  |  |   |                   |                                   |                              |
| A8        | 4,90  | 4,41  | 4,09   |   |                   |                                   |                              |
|           | 4,19  | 3,77  |  |   |                   |                                   |                              |

**Observações:** Análises realizadas em duplicata. Sub-amostra 6 referente ao lote 2 foi perdida durante a torra e para a sub-amostra 4 deste mesmo lote não foi possível a análise em duplicata, devido à problemas analíticos. ND = não determinado (menor que o limite de detecção do método – 0,12 µg/kg).

**Tabela 12:** OTA determinada nas sub-amostras de café após a torra escura

| Amostra | Contaminação de OTA ( $\mu\text{g}$ OTA /kg café torrado) | Contaminação de OTA ( $\mu\text{g}$ OTA /kg café torrado) considerando a perda de massa | Contaminação média por sub-amostra ( $\mu\text{g}$ OTA /kg café torrado) | Contaminação média por lote ( $\mu\text{g}$ OTA /kg café torrado) | Desvio padrão (%) | Mediana ( $\mu\text{g}$ OTA /kg café torrado) | Coefficiente de variação (%) |
|---------|---|---|--|---|-------------------|---|------------------------------|
| Lote 1  | A3  | ND  | ND   | 0,63  | 0,84              | 0,45  | 134,3                        |
|         |   | ND  | ND   |   |                   |   |                              |
|         | A2  | ND  | ND   |   |                   |   |                              |
|         |   | ND  | ND   |   |                   |   |                              |
|         | A7  | -   | -  |   |                   |   |                              |
|         | 2,46  | 1,97  | 1,97   |   |                   |   |                              |
|         | A8  | 1,89  | 1,51   | 1,20  |                   |   |                              |
|         |   | 1,12  | 0,90   |   |                   |   |                              |
| Lote 2  | A2  | 2,11  | 1,69   | 2,66  | 0,80              | 2,76  | 29,9                         |
|         |   | 2,91  | 2,33   |   |                   |   |                              |
|         |   | 4,00  | 3,20   |   |                   |   |                              |
|         | A3  | 4,26  | 3,40   |   |                   |   |                              |

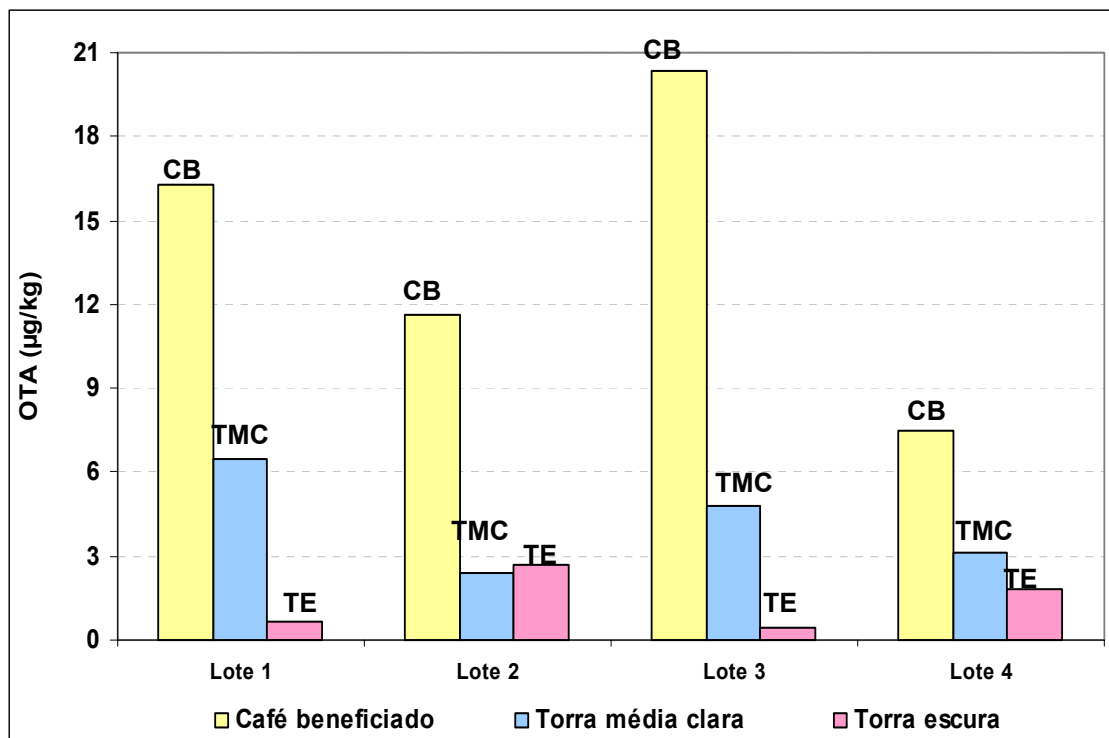
**Observações:** Análises realizadas em duplicata. Sub-amostra 7 referente ao lote 1 não foi possível a realização da análise em duplicata, devido à problemas analíticos. ND = não determinado (menor que o limite de detecção do método – 0,12  $\mu\text{g}/\text{kg}$ )

Tabela 12 (continuação): OTA determinada nas sub-amostras de café após a torra escura

| Amostra | Contaminação de OTA ( $\mu\text{g}$ OTA /kg café torrado) | Contaminação de OTA ( $\mu\text{g}$ OTA /kg café cru) | Contaminação média por sub-amostra ( $\mu\text{g}$ OTA /kg café cru) | Contaminação média por lote ( $\mu\text{g}$ OTA /kg café cru) | Desvio padrão | Mediana ( $\mu\text{g}$ OTA /kg café cru) | Coefficiente de variação |
|---------|---|---|--|---|---------------|---|--------------------------|
| Lote 3  | A2  | 0,42  | 0,33   | 0,36  | 0,46          | 0,47                                      | 18,6                     |
|         |   | 0,48  | 0,38   |   |               |   |                          |
|         | A3  | 0,70  | 0,56   | 0,51  |               |   |                          |
|         |   | 0,58  | 0,46   |   |               |   |                          |
|         | A8  | 0,64  | 0,51   | 0,50  |               |   |                          |
|         |   | 0,61  | 0,49   |   |               |   |                          |
| Lote 4  | A3  | 2,18  | 1,74   | 1,59  | 1,83          | 1,92                                      | 41,3                     |
|         |   | 1,79  | 1,43   |   |               |   |                          |
|         | A4  | 2,62  | 2,10   | 2,48  |               |   |                          |
|         |   | 3,58  | 2,87   |   |               |   |                          |
|         | A7  | 0,80  | 0,64   | 1,41  |               |   |                          |
|         |   | 2,72  | 2,18   |   |               |   |                          |

**Observações:** Análises realizadas em duplicata. Sub-amostra 7 referente ao lote 1 não foi possível a realização da análise em duplicata, devido à problemas analíticos. ND= não determinado (menor que o limite de detecção do método – 0,12  $\mu\text{g}/\text{kg}$ )





**Figura 14:** Contaminação média de OTA observada em sub-amostras de café beneficiado e café torrado obtidas de 4 lotes diferentes (CB: café beneficiado, TMC: torra média clara, TE: torra escura)

As médias dos resultados obtidos nas três sub-amostras de café beneficiado naturalmente contaminadas foram utilizadas para estimar a contaminação dos lotes, sendo este valor tomado como 100% da ocratoxina A no lote. Dessa forma, a degradação da OTA com a torra foi determinada para os quatro lotes de café avaliados (Tabelas 13 e 14).

**Tabela 13:** Degradação da Ocratoxina A observada para café após a torra clara/média

| <b>Lote</b> | <b>Contaminação do lote de café cru (<math>\mu\text{g}</math> OTA /kg café cru)</b> | <b>Contaminação do lote de café torrado (<math>\mu\text{g}</math> OTA /kg café cru)</b> | <b>% de OTA resultante no lote após a torra</b> | <b>% de OTA degradada</b> |
|-------------|---|---|---|---------------------------|
| 1           | 16,30   | 6,50  | 40  | 60                        |
| 2           | 11,66   | 2,41  | 21  | 79                        |
| 3           | 20,34   | 4,79  | 24  | 76                        |
| 4           | 7,46  | 3,16  | 42  | 58                        |

De acordo com a Tabela 10 e com a Figura 14 a contaminação no Lote 1 variou de 9,34 a 19,84  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , com desvio padrão de 6,0 e coeficiente de variação de 37,0%. O nível de contaminação de OTA no lote é de 16,30  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , estimado pela média das três sub-amostras analisadas. A contaminação de OTA determinada para esse lote, após a torra clara média, varia de 2,36 a 9,16  $\mu\text{g}/\text{kg}$  com desvio padrão de 3,34 e coeficiente de variação de 51,4%. A contaminação média obtida após a torra é de 6,50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , que representa 40% da OTA inicialmente presente no Lote, significando que 60% da OTA foi degradada com a torra (Tabela 13).

Para Lote 2, a contaminação varia de 3,52 a 23,20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  com desvio padrão de 10,27 e coeficiente de variação de 88,1%. O nível de contaminação no Lote, estimado pela média é de 11,7. A contaminação média obtida foi de 7,5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , valor este atribuído como contaminação do Lote. A contaminação média de OTA determinada para esse lote, após a torra clara média, varia de nd a 6,48  $\mu\text{g}/\text{kg}$  com desvio padrão de 2,74 e coeficiente de variação de 113,93%. A contaminação média obtida após a torra é de 2,41  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , que representa 21% da OTA inicialmente presente no Lote, significando que 79% da OTA foi degradada com a torra (Tabela 13).

O lote 3 apresenta contaminação variando de 3,32 a 50,20  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , apresentando um desvio padrão de 25,94 e um coeficiente de variação de 127,80% com média de 20,3, estimada para o Lote. A contaminação média de OTA determinada para esse lote, após a torra clara média, varia de 0,16 a 10,79  $\mu\text{g}/\text{kg}$  com desvio padrão de 4,92 e

coeficiente de variação de 102,81%. A contaminação média obtida após a torra é de 4,79µg/kg, representando 24% da OTA inicialmente presente no Lote, significando que 76% da OTA foi degradada com a torra (Tabela 13).

Para o Lote 4 observa-se uma variação na contaminação de 3,72 a 12,03 µg/kg, com desvio padrão de 4,22 e coeficiente de variação de 56,6%. A contaminação média obtida foi de 7,5 µg/kg, valor este atribuído como contaminação do Lote. A contaminação média de OTA determinada para esse lote, após a torra clara média, varia de 2,49 a 4,09µg/kg, com desvio padrão de 0,81 e coeficiente de variação de 25,63%. A contaminação média obtida após a torra é de 3,16 µg/kg, que representa 42% da OTA inicialmente presente no Lote, significando que 56% da OTA foi degradada com a torra (Tabela 13).

**Tabela 14:** Degradação da Ocratoxina A observada para café após a torra escura

| Lote | Contaminação do lote de café cru (µg OTA /kg café cru) | Contaminação do lote de café torrado(µg OTA /kg café cru) | % de OTA                               |                    |
|------|--|---|--|--------------------|
|      |  |   | resultante no lote após a torra escura | % de OTA degradada |
| 1    | 16,30  | 0,63  | 4                                      | 96                 |
| 2    | 11,66  | 2,66  | 23                                     | 77                 |
| 3    | 20,34  | 0,46  | 2                                      | 98                 |
| 4    | 7,46   | 1,83  | 25                                     | 75                 |

A avaliação da degradação de OTA foi feita com a torra escura, no lote 1, verifica-se que o nível de contaminação de OTA varia de nd (não determinado) a 1,97 µg/kg, com média de 0,63 µg/kg, o que representa apenas 4% da contaminação inicialmente presente, significando que 96% da OTA foi degradada com a torra (Tabela 14).

Quando a avaliação da degradação de OTA foi feita com a torra escura, no lote 2, verificou-se que o nível de contaminação de OTA varia de 2,01 a 3,30 µg/kg, com média de 2,66 µg/kg, representando 23% da contaminação inicialmente presente, significando que 97% da OTA foi degradada com a torra (Tabela 14). Para esse lote, a

torra escura foi avaliada apenas em duas sub-amostras, uma vez que uma das sub-amostras foi perdida na etapa da torra.

Na avaliação da degradação de OTA feita após a torra escura, no lote 3, verificou-se que o nível de contaminação de OTA varia de 0,36 a 0,51 µg/kg, com média de 0,46 µg/kg, representando apenas 2% da contaminação inicialmente presente, significando que 98% da OTA foi degradada com a torra (Tabela 14).

Quando a avaliação da degradação de OTA foi feita com a torra escura, no lote 4, verificou-se que o nível de contaminação de OTA varia de 1,41 a 2,48 µg/kg, com média de 1,83 µg/kg, o que representa 25% da contaminação inicialmente presente, significando que 75% da OTA foi degradada com a torra (Tabela 14).

A degradação média da OTA, observada para os quatro lotes, foi de 68% para a torra clara/média e de 87% para a torra escura. Com os dados encontrados há indicativos de que, quando a amostra é submetida a uma temperatura mais alta (necessária para obtenção da torra escura) a degradação de OTA é favorecida.

Uma avaliação dos dados apresentados nas Tabelas 13 e 14 mostra que, para o lote 2, a degradação de OTA para a torra clara foi superior a da torra escura. O alto coeficiente de variação determinado tanto para o café cru como para café torrado indica uma distribuição heterogênea da OTA no lote, o que pode justificar os resultados encontrados.

Muitos dos estudos existentes avaliaram a degradação da OTA utilizando amostras artificialmente contaminadas analisadas, os poucos estudos realizados com amostras naturalmente contaminadas não reportam os procedimentos de amostragem, que é conhecido e bastante discutido como etapa determinante nas análises de ocratoxina A em café. Conforme mostrado na figura 3, a heterogeneidade da distribuição da OTA na amostra é significativa e, conforme discutido pelo Dr. Whitaker a amostragem contribui com 90% dos erros cometidos nas análises.

As recuperações percentuais obtidas para as amostras artificialmente contaminadas com solução padrão de ocratoxina A, utilizadas no controle das bancadas de análise,

variaram de 101 a 104% para café beneficiado e de 70 a 110% para amostras de café torrado, conforme pode ser observado na Tabela 15. Esses resultados estão de acordo com os critérios de aceitabilidade estabelecidos para o método de análise, significando que os dados obtidos para as amostras analisadas são confiáveis.

Os condensados dos gases, obtidos durante a torra do café, não apresentaram contaminação por ocratoxina A. Dessa forma, a diminuição observada na contaminação da OTA pode ser associada à degradação deste composto.

#### 5.4 CONTROLE DAS ANÁLISES

O controle na execução dos procedimentos de análise para determinação de OTA foi realizado pela análise de amostras de café beneficiado e torrado, artificialmente contaminadas com solução padrão de OTA. As amostras artificialmente contaminadas, e amostra branco (contaminação  $<0,12 \mu\text{g}/\text{kg}$ ) foram analisadas juntamente com as sub-amostras de café beneficiado e café torrado e os resultados avaliados com relação à recuperação percentual (Tabela 15).

**Tabela 15:** Resultados de análise e recuperações obtidas nas análises das amostras de café beneficiado e café torrado, artificialmente contaminadas com OTA

| Amostra          | Contaminação teórica ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) | Contaminação determinada ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) | Recuperação (%) |
|------------------|--|--|-----------------|
|                  | -  | nd   | -               |
| Café beneficiado | 4,23   | 4,31   | 102             |
|                  | 6,00   | 6,21   | 104             |
|                  | 5,07   | 5,26   | 104             |
|                  | 5,07   | 5,11   | 101             |
| Café torrado     | 8,50   | 5,89   | 70              |
|                  | 8,50   | 9,50   | 110             |
|                  | 5,07   | 3,94   | 78              |
|                  | 8,50   | 5,89   | 84              |
|                  | -  | nd   | -               |
|                  | -  | nd   | -               |
|                  | -  | nd   | -               |
|                  | -  | nd   | -               |

**Observação:** nd = não determinado (menor que o limite de detecção do método –  $0,12 \mu\text{g}/\text{kg}$ )

## **5.5 AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE OTA NOS CONDENSADOS DOS GASES**

Os condensados dos gases, obtidos durante a torra do café, foram analisados qualitativamente (volume total) para avaliar se a diminuição da concentração da ocratoxina A no café torra foi decorrente da transferência da OTA inicialmente presente no café beneficiado para o condensado. Não foi verificada a presença de OTA nos condensado dos gases de todas as amostras analisadas.

## 6. CONCLUSÃO

---

Pode-se concluir, com base nos resultados obtidos, que a contaminação de OTA em todos os lotes diminui após a torra, sendo essa queda acentuada com o grau da torra. O uso de um plano de amostragem validado para café e o uso de um método analítico validado para análise de OTA traz segurança com relação à qualidade dos dados obtidos. Dessa forma, os resultados obtidos nesse trabalho vêm mostrar que muitos dados encontrados em artigos, com grandes variações na degradação da OTA, podem estar relacionados com a metodologia de amostragem e de análise utilizados.

Considerando a degradação de 68%, obtida quando a torra clara média é realizada, lotes de café contaminados com 20 µg/kg, apresentaria contaminação de 6,4 µg/kg, o que os tornaria impróprio para exportação para muitos países, inclusive para os países Europeus, nossos principais compradores. Já com a torra escura, observa-se uma degradação média de 87% da OTA inicialmente presente. Uma contaminação inicial de 20 µg/kg no café cru seria reduzida para 2,6 µg/kg.

Considerando um residual de 32% de OTA (6,4 µg/kg para torra clara/média) e a provável transferência de 80% para a bebida (Blanc *et. al.*, 1998) estima-se que 150 mL do café feito com 50g/L de pó contribui com a ingestão de aproximadamente 38ng de OTA. E o residual de 13% (2,6 µg/kg para torra escura), resultaria na ingestão de 15ng.

Considerando que nosso país ainda não possui legislação para ocratoxina A, e considerando que esse café contaminado com OTA, após a torra, estaria provavelmente sendo destinado para consumo interno a população estaria sendo exposta à contaminação de OTA.

Finalmente, as seguintes considerações finais podem ser feitas: (1) Os dados obtidos indicam a necessidade de continuidade do estudo; (2) a avaliação da degradação da OTA com a torra, partindo de uma massa maior de amostra de café beneficiado (16 kg?) e um número maior de sub-amostras e ainda (3) fazer a avaliação repetida do estudo de degradação de OTA com a torra utilizando o mesmo lote.



## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

Anklam, E., Stroka, J., Boenke, A., 2002. Acceptance of Analytical Methods for Implementation of EU Legislation with a Focus on Mycotoxins. *Food Control*, 13, 173-183.

AOAC – Association of Official Analytical Chemist, 1998. Natural Toxins. *Official Methods of AOAC International*. Chapter 49, 39-40. 16th edition, 4th revision. (Software Adobe and E-DOC/CJS).

AOAC – Association of Official Analytical Chemist, 2000. Natural Toxins. *Official Methods of AOAC International*. 2, 49, 1-64. 17th edition. Edited by William Horwitz.

Blanc, M., Pittet, A., Viani R., 1998. Behaviour of Ochratoxin A During Coffee Roasting and Soluble Coffee Manufacture. *Journal of Agric. Food Chem.* 46, 673-675.

Bucheli, P., Taniwaki, M., 2002. Review: Research on the Origin, and on the Impact of the Pos-harvest Handling and Manufacturing on the Presence of Ochratoxin A in Coffee, *Food Additives and Contaminants*, 19, 655-665.

Borges, M. L. A., Franca, A. S., Oliveira, L. S., Correa, P. C. e Glória, M. B. A, 2002. Estudo da Variação da Coloração de Café Arábica Durante a Torra em Diferentes Condições de Aquecimento, *Revista Brasileira de Armazenamento*, v. Especial Café, 5, 3-8.

Boudra, H., Le Bars, P., J., 1995. Thermostability of Ochratoxin A in Wheat under Two Moisture Conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* March, 1156-1158.

Cantáfora, A., Grossi, M., Miraglia, M., Benelli, L., 1983. Determination of Ochratoxin A in Coffee Beans Using Reversed-phase High Performance Liquid Chromatography. *Riv. Soc. Ital. Sci. Aliment.* 12, 103-108.

Clarke, R.J., Macrae, R., 1985. Coffee: Chemistry, *Elsevier Science Publishers LTD.* 1, 306p.

Coker, R. and Whitaker, T., 2001. Monograph, Sampling 14 February 2001. Revised Draft 1, I:/JECFA sampling working paper2.

CODEX ALIMENTARIUS, 1999. Codex Committee on Food Additives and Contaminants, 31<sup>st</sup> session. *Position Paper on Ochratoxin A*, CX/FAC 99/14, Rome, Italy.

DOU - Portaria MA/SNAD/SFA, no 07, de 09/11/1988, publicada no *Diário Oficial da União* em 14/11/1988.

DOU - Métodos de Referência para Análise de Ocratoxina A em Café Verde, DOU, *Diário Oficial da União*, Instrução Normativa SDA, no. 09, 24/03/2000, seção 1, 35-41.

DOU - Resolução RDC no. 274, de 15/10/2002, publicada no Diário Oficial da União, no. 201, seção 1, p.45-46 de 16/10/2002.

Encarnação, R. O., Lima, D. R., 2003. *Café & saúde humana*. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA Café, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, DF. 64p.

Entwisle, A. C., Williams, A. C., Mann, P. J., Russel, J., Slack, P. T., Gilbert, J. 2001, Combined Phenyl Silane and Immunoaffinity Column Clean-up HPLC for the Determination of Ochratoxin A in Roasted Coffee: Collaborative Study. *Journal of AOAC International*, 84, 444-450.

FAO, 1995. *Food and Nutrition Paper 64*, (Rome: FAO).

FAO, 1997. *World Regulations for Mycotoxins. A compendium*.

Floriane, C. G., 1999. *Café: a Certificação é o Caminho*. Belo Horizonte: IMA. 18p. (*Agro Técnico* – IMA, n. 1).

Gale Group, 2001/2002. *The food institute report. World coffee production to reach record level in 2001/2002*.

Jørgensen, K., 1998. Survey of Pork, Poultry, Coffee, Beer and Pulses for Ochratoxin A. *Food Additives and Contaminants*, 15, 550-554.

Leoni, L. A. B., Soares, V., M., L., Oliveira, P., L., C., 2000. Ochratoxin A in Brazilian Roasted and Instant Coffee. *Food Additives and Contaminants*, 17, 867-870.

Levi, C. P., Trenk, H. L., Mohr, H. K., 1974. Study of the Occurrence of Ochratoxin A in Green Coffee Beans. *Journal of Association of Official Analytical Chemist*, 57, 866-871.

Levi, C.P., 1975. Collaborative Study of a Method for the Determination of Ochratoxin A in Green Coffee. *Journal of Association of Official Analytical Chemist*, 58, 258-262.

Levi, C., 1980. Mycotoxin in Coffee, *Journal of Official Analytical Chemists*, 63, 1282-1285

Matiello, J. B., 1991. O café: do cultivo ao consumo. *Coleção do Agricultor – Grãos*, editora Globo Rural, 320p.

Micco, C., Grossi, M., Miraglia, M., Brera, C., 1989. A Study of the Contamination by Ochratoxin A of Green and Roasted Coffee Beans. *Food Additives and Contaminants*, 3, 333-339.

Moss M. O., 1996. Mode of Formation of Ochratoxin A. *Food Additives & Contaminants*, 13, Supplement, 5-9.

Nakajima, M., Terada, H., Hisada, K., Tsubouchi, H., Yamamoto, K., Uda, T., Itoh, Y., Kawamura, O., Ueno, Y., 1990. Determination of Ochratoxin A in Coffee Beans and Coffee Products by Monoclonal Antibody Affinity Chromatography. *Food and Agricultural Immunology*, 2, 189-195.

Nakajima, M., Tsubouchi, H., Miyabe, M. and Ueno, Y., 1997. Survey of Aflatoxin B<sub>1</sub> and Ochratoxin A by High-Performance Liquid Chromatography Linked with Immunoaffinity Chromatography. *Food and Agricultural Immunology*, 9, 77-83.

Patel, S., Hazel, C. M., Winterton, A. G. M., Gleadle, A. E., 1997. Survey of Ochratoxin A in UK Retails Coffee. *Food Additives and Contaminants*, 14, 217-222.

Pittet, A., Tornare, D., Huggett, A., Viani, R., 1996. Liquid Chromatographic Determination of Ochratoxin A in Pure and Adulterated Soluble Coffee Using an Immunoaffinity Column Clean up Procedure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 3564-3569.

Pittet, A., Royer, D., 2002. Rapid, Low Cost Thin Layer Chromatographic Screening for the Detection of Ochratoxin A in Green Coffee at Control Level Of 10 µg/kg. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 243-247.

Prado G., Oliveira M. S., Abrantes F. M., Santos L. G., Veloso T., Barroso R. E. S., 2000. Incidência de Ocratoxina A em Café Torrado e Moído e em Café Solúvel Consumido em Belo Horizonte, MG. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 20, 2, 192-196.

Romani S., Pinnavaia, G. G., Rosa, M. D., 2003. Influence of Roasting Levels on Ochratoxin A Content in Coffee. *J. Agric. Food Chem.*, 5, 5168-5171

Saes, M. S. M., Farina, E. M. Q., 1999. O Agribusiness do Café no Brasil – Universidade de São Paulo. 230p.

Sibanda, L., de Daeger, S., Van Peteghem, 2002, Optimization of Solid-Phase Clean-up Prior to Liquid Chromatographic Analysis of Ochratoxin A in Roasted Coffee. *Journal of Chromatography A*, 959, 327-330.

Santos, E. A., Vargas, E. A., 2002. Immunoaffinity Column Clean-up and Thin Layer Chromatography for the Determination of Ochratoxin A in Green Coffee. *Food Additives and Contaminants*, 19, 447-458.

Scott, P. M, 1996. Effects of Processing and Detoxification Treatment on Ochratoxin A: Introduction. *Food Additives & Contaminants*, 13, Supplement, 19-21.

Scott, P. and Trucksess, M. W., 1997. Application of Immunoaffinity Columns to Mycotoxin Analysis. *Journal of AOAC International*, 80, 941-949.

Scott, P. M, Kanhere, S. R., Lau, B. P.-Y, Lewis, D. A., Hayward, S., J. J., Ryan, and Kuiper-Goodman, T., 1998. Survey of Canadian Human Blood Plasma for Ochratoxin A. *Food Additives and Contaminants*, 15, 555-562.

Soliman, K. M., 2002. Incidence, Level, and Behavior of Aflatoxins During Coffee Bean Roasting and Decaffeination, *J. Agric. Food Chem.* 50, 7477-7481

Studer-Rohr, I., Dietrich, D.R., Schlatter, J., Schlatter, C., 1994. Ochratoxin A and Coffee. *Mitt. Gebiete Lebensmittelunters. Hyg.*, 85, 719 – 727.

Studer-Rohr, I.; Dietrick, D. R.; Schlatter, J.; Schlatter, C, 1995. The Occurrence of Ochratoxin A in Coffee. *Food and Chemical Toxicology*; 33 (5) 341-355.

Taniwaki M., H., Urbano G. R., Vicentini M. C., Teixeira A. A., Leitão M. F. F., 1999. Ochratoxin Producing Fungi in Coffee. *Report on the workshop - Enhancement of Coffee Quality by Reduction of Mould Growth*, ASIC, Helsinki, August, 1999.

Terada, H., Tsubouchi, H., Yamamoto, K., Hisada, K. Sakabe, Y., 1986. Liquid Chromatography Determination of Ochratoxin A in Coffee Beans and Coffee Products. *Journal of Association of Official Analytical Chemists*, 69, 960-964.

Trucksess, M. W., Giler, J., Young, K., White, K. D., Page, S. W., 1999. Determination and Survey of Ochratoxin A in Wheat, Barley and Coffee – *Journal of AOAC International*, 82, 85-89.

Tsubouchi H., Yamamoto K., Hisada K., Sakabe Y., and Udagawa S., 1987. Effect of Roasting on Ochratoxin A Level in Green Coffee Beans Inoculated with *Aspergillus Ochraceus*. *Mycopathology*, 97, 111-115.

Tsubouchi, H., Terada, H., Yamamoto, K., Hisada, K., Sakabe, Y., 1988. Ochratoxin A Found in Commercial Roast Coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36, 540-542.

van der Stegen, G. H. D., Jorissen, U., Pittet, A., Saccon, M., Steiner, W., Vincenzi, M., Winkler, M., ZAPP, J. and Schalatter, C., 1997. Screening of European Coffee Final Products for Occurrence of Ochratoxin A (OTA). *Food Additives and Contaminants*, 14, 211-216.

van der Stegen, G. H. D., Essens, P J. M., and van der Lijn, J., 2001. Effect of Roasting Conditions on Redution of ochratoxin A in Coffee, *J. Agric. Food Chem.*, 49, 4713-4715.

van Egmond, H., 1996. Analytical Methodology and Regulations for Ochratoxin A. *Food Additives and Contaminants*, 13, Supplement, 11-13.

Viani R., 1996. Fate of Ochratoxin A (OTA) During Processing of Coffee. *Food Additives & Contaminants*, 13, Supplement, 29-33.

Viani R., 2000. Effect of Processing on Ochratoxin A [OTA] Content of Coffee. ASIC, Switzerland.

Vargas, E. A., Santos, E. A., Pittet, A., 2002. Collaborative Study Submitted for consideration by AOAC International: D-2 Protocol - Determination of ochratoxin A in green coffee by immunoaffinity column clean-up and HPLC. Ministério da Agricultura e do Abastecimento, Brasil. 28p.

Vargas, E. A., Whitaker, T. B., Santos, E. A., Slate, A., B., Lima, F. B., França, R. C. A., 2004 (a), Testing Green Coffee for Ochratoxin A, next term part II: Observed Distribution of Ochratoxin A – Artigo aceito para publicação conforme Doc 04120 da AOAC.

Vargas, E. A., Whitaker, T. B., Santos, E.A., Slate, A., B., Lima, F. B., França, R. C. A., 2004 (b), Testing Green Coffee for Ochratoxin A, next term part I: estimation of variance compoments. *Journal of AOAC International*, 87, 4, 884-891.

Wilkens, J., Jörinssen, U. Abbau von 1999. Ochratoxin A Beider Production von Röstkaffee. In proeedings 21 Mykotoxin-Workshop Jena, June 7-9, 1999 Rosner, H., Kiestein, P., Eds.BGVV: Jena, Germani,; pp245-251

Whitaker, T. B., Park, D. L., 1994. Problems Associated With Accurately Measuring Aflatoxin in Foods And Feeds: Errors Associated with Sampling, Sample Preparation and Analysis. "The Toxicology of Aflatoxins", Eds: D.L. Eaton and J.D. Groopman, Academic Press, San Diego, CA, USA,.433-450.

WHO, 1996, Toxicological Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants. Prepared by the 44<sup>th</sup> Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Addtives, WHO Food Additives Series 35, Geneva, 363-376.

WHO, 2001, Report of the 56th Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Geneva, Switzerland, 6-15 February.

Zambolim, L., 2001. Tecnologias de Produção de Café com Qualidade – Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Fitopatologia. Viçosa, MG. 259p.

Zambolim, L., 1999. Livro de Palestras: Encontro sobre Produção de Café com Qualidade – Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Fitopatologia. Viçosa, MG. 14 e 15 de setembro de 1999. 648p.