

TESE DE MESTRADO

"ALIMENTOS E NUTRIÇÃO"

Departamento de Planejamento Alimentar e Nutrição

Faculdade de Engenharia de Alimentos

**OCORRÊNCIA DE OCRATOXINA A EM CAFÉ VERDE DESTINADO À
EXPORTAÇÃO PROVENIENTE DE DIVERSAS REGIÕES PRODUTORAS
BRASILEIRAS**

Candidata: Eng^a. Andréa Pittelli Boiago Gollücke

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **Andréa Pittelli Boiago Gollücke**, aprovada pela Comissão Julgadora em 01 de julho de 2002.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Débora de Queiroz Tavares

Co-orientadora: Dr^a. Marta Hiromi Taniwaki

Campinas, 01 de julho de 2002.


Prof^a. Dra. Débora de Queiroz Tavares
Presidente da Banca

UNICAMP - 2002

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIDADE 30
Nº CHAMADA TT UNICAMP
G5820
V _____ EX _____
TOMBO BCI 50294
PROC 16-837102
C _____ DX _____
PREÇO R\$ 11,00
DATA 13/08/02
Nº CPD _____

CM00171937-6

BIB ID 250723

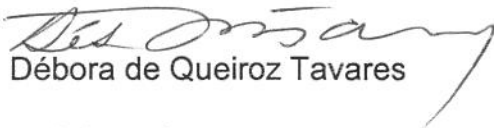
FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

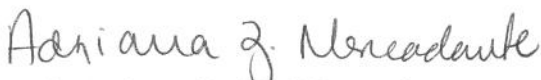
G582o Gollucke, Andréa Pittelli Boiago
Ocorrência de ocratoxina A em café verde destinado à
exportação proveniente de diversas regiões produtoras brasileiras
/ Andréa Pittelli Boiago Gollucke. – Campinas, SP: [s.n.], 2002.

Orientador: Débora de Queiroz Tavares
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Café. 2.Toxinas. 3.Legislação. 4.Processamento.
I.Tavares, Débora de Queiroz. II.Universidade Estadual de
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

Banca Examinadora:


Profª. Drª. Débora de Queiroz Tavares
Orientadora


Profª. Drª. Adriana Zerlotti Mercadante
Membro


Prof. Dr. Mauro Faber Freitas Leitão
Membro

Profª. Drª. Hillary Castle de Menezes
Membro

200237247

*Amar e trabalhar são as aptidões gêmeas
que assinalam a plena maturidade.*

Sigmund Freud

Agradecimentos:

Aos meus pais Marli e Genésio, pela vida; ao meu marido Florian, pela felicidade; às minhas mestras Débora e Marta pelo conhecimento; à Camila, Lilia, Maria Helena e Yara pela amizade; ao Urs, Ribeiro, Márcio, Hamilton e ao saudoso Dieter pelo apoio.

À Universidade Católica de Santos pela oportunidade e colaboração.

ÍNDICE

		Pág.
Parte 1	RESUMO e ABSTRACT	1
Parte 2	INTRODUÇÃO	5
Parte 3	REVISÃO: "Ocratoxina A em Café"	7
	1- INTRODUÇÃO	9
	2- CARACTERÍSTICAS DA OCRATOXINA A (OTA)	10
	3- PRODUÇÃO DE OTA	13
	3.1- Fungos produtores	13
	3.2- Fatores que afetam o crescimento do fungo e a produção de OTA em café	15
	3.3- Estabilidade da molécula de OTA e métodos de detoxicação	18
	4- TOXICIDADE	21
	4.1- Ações sobre o metabolismo <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> , transferência através da lactação	21
	4.2- Imuno supressão, ação sobre mitocôndrias e peroxidação lipídica	26
	4.3- Teratogênese, mutagênese e carcinogênese	28
	4.4- Nefropatias	30
	4.4.1- Nefropatias endêmicas em animais e humanos	30

4.4.2- Nefropatia endêmica do Balcãs	
(<i>Balkan endemic nephropathy – BEN</i>)	32
5- OCHRATOXINA A EM CAFÉ	34
5.1- Ocorrência de OTA em alimentos e no café	34
5.2- Etapas de processamento de café verde	
susceptíveis à formação de OTA	37
5.3- Efeito do transporte (terrestre e marítimo) e	
armazenamento portuário na formação de OTA	40
5.4- Processos para remover OTA do café cru	41
6- A PREPARAÇÃO DO CAFÉ PARA O CONSUMO	
E O EFEITO SOBRE OTA	43
6.1- Torração, moagem e a resistência da OTA	43
6.2- Ocorrência de OTA em café torrado/moído	46
6.3- Passagem de OTA para a bebida de café	47
6.4- Produção de café solúvel	49
6.5- Descafeinização	51
7- INGESTÃO MÁXIMA ACEITÁVEL	52
8- LEGISLAÇÃO E MEDIDAS PREVENTIVAS	54
9- CONCLUSÃO	58
10-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
Parte 4 PESQUISA: “Incidence of Ochratoxin A	
in Brazilian green coffee destined for exports”	73
Abstract	

Introduction	75
Material and Methods	76
<i>Samples</i>	76
<i>Sub-sampling</i>	77
<i>Extraction and cleanup up of OTA in coffee</i>	78
<i>HPLC</i>	78
<i>Optical and Scanning Electron Microscopy (SEM)</i>	79
Results and discussion	79
<i>Composition</i>	79
<i>Optical and Scanning Electron Microscopy (SEM)</i>	81
References	88

Parte 1 – RESUMO e ABSTRACT

RESUMO

Esta investigação analisou café cru (verde) brasileiro exclusivamente destinado à exportação quanto ao teor de ocratoxina A (OTA), antecipando-se a possíveis medidas regulatórias europeias que visam limitar a presença desta toxina em café. As amostras foram obtidas das principais regiões produtoras em seis estados brasileiros (SP, MG, BA, ES, RO, PR), das safras 1999/2000 e 2000/2001, englobando as variedades arábica e robusta, amostras de “café orgânico” e de estoque governamental. A primeira parte do estudo foi determinar a concentração de OTA nas amostras por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com técnica aperfeiçoada por Pittet et al. (1996). Os resultados apontaram que entre as 37 amostras estudadas, 20 apresentaram valores de OTA abaixo de 0,2 ng/g ou ppb (limite de detecção) e 16 amostras apresentaram contaminação entre 0,2 e 0,85 ng/g (contaminação média 0,16 ng/g entre as 36 amostras); uma amostra excluída da média apresentou 6,24 ng/g de OTA. Para a segunda etapa, 5 das 37 amostras foram divididas em duas sub-amostras: uma com grãos sadios e outra com grãos danificados (“pretos” e “ardidos”). Nas sub-amostras também foi determinado o teor de OTA com o objetivo de investigar a possível relação entre grãos danificados e ocorrência da toxina. Grãos de café das sub-amostras foram observados em Microscopia Ótica e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) a fim de verificar a presença de

microrganismos e/ou ocorrência de danos celulares. Dos 15 grãos analisados, apenas um grão, “preto”, revelou a presença de fungos e esporos. A morfologia dos grãos sadios revelou endosperma organizado, enquanto que a dos grãos defeituosos apresentou endosperma parcialmente comprimido e conteúdo celular reduzido. Todas as amostras analisadas na primeira parte deste estudo apresentaram concentração de OTA abaixo dos valores mais rígidos exigidos atualmente (8 ng/g, na Itália) e 97,3% das amostras estavam dentro do limite sugerido pelos órgãos legisladores europeus (5 ng/g). Os resultados da análise de OTA em grãos danificados e sadios mostraram correlação entre grãos danificados e concentração da toxina. Considerando os resultados obtidos nesta investigação, o café verde brasileiro destinado à exportação está apto a cumprir as exigências sanitárias atualmente estabelecidas em relação a OTA e que poderão entrar em vigor em 2003.

ABSTRACT

The present survey analyzed raw coffee for export obtained from the main producing regions of six Brazilian states: São Paulo, Minas Gerais, Espírito Santo, Rondônia, Paraná and Bahia and from two harvests (1999/2000 and 2000/2001) anticipating possible regulatory limits of ochratoxin A in coffee throughout the world, especially in the European Community. The sampling batch included Arabica and Robusta varieties as well as "organic coffee" and government stock samples. They were first investigated for their content of Ochratoxin A by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) according to methodology used by Pittet et al. (1996). Of the 37 samples, 20 presented OTA levels below the detection limit (0.2 ng/g or ppb). The toxin content ranged from <0.2 ng/g to 0.85 ng/g for 36 samples with an average of 0.16 ng/g. One sample, excluded from average and range, showed an OTA concentration of 6.24 ng/g. Following this, five of the original samples were divided into two sub-samples, one containing *sound* beans and the other damaged ones (*black* and *sour*), with the purpose of verifying a possible correlation between damage and OTA concentration. Beans from each of the sub-samples were observed under Optical and Scanning Electron Microscope in search of moulds and/or cellular modification that could indicate an infection by microorganisms. Morphology of *sound* and *sour* beans showed an organized endosperm while *black* ones showed an endosperm somewhat compressed and a badly defined cellular content. Of the 15 beans observed, one (*black*) showed the presence of moulds

and spores. All samples investigated in the first part of the study presented an OTA concentration below the lowest limit already established in Europe (8 ppb, Italy) while 97.3% were below the suggested regulatory limit of 5 ppb. Some correlation between damaged beans and OTA concentration was found in the second part of the study. According to this investigation, Brazilian green coffee for export is able to comply to established regulatory limits and those suggested for 2002.

Parte 2 – INTRODUÇÃO

A contaminação do café por ocratoxina A (OTA) é tema de preocupação sanitária do setor de produção e exportação de café, visto que vários países dirigem seus esforços para legislarem níveis mais exigentes. Além de enfrentar oscilações de preços na Bolsa de Nova Iorque e quebras de safra, os exportadores poderão se defrontar com o risco de rejeição de lotes. Alguns países importadores já adotam limites máximos para ocratoxina A em café e a União Europeia possivelmente o fará em 2003. Esta micotoxina, um possível carcinógeno em humanos, foi encontrado há décadas em cereais e derivados. Com o aprimoramento de metodologias de detecção, foi apontada em outros alimentos como soja, vinho e cacau.

A *Food and Agriculture Organization (FAO)* calcula que se a Comunidade Europeia impuser um limite máximo de 5 ppb de OTA em café verde, 7% de todo café importado pela Europa poderá ser rejeitado. A rejeição causará um prejuízo de mais de um bilhão de dólares anuais aos países produtores. Sob esta previsão, o Brasil poderia ser afetado em 220 milhões de dólares porque, nos últimos 7 anos, participou com 22% da exportação mundial, afetando negativamente a balança comercial do Brasil uma vez que o café foi o quarto item de exportações agropecuárias em 2000, contribuindo com 1,8 bilhões de dólares em divisas para o país.

Diante desta perspectiva, centros de pesquisas brasileiros têm se empenhado em investigar as formas de contaminação do café pelo fungo, locais afetados, métodos de prevenção de formação da toxina, entre outros.

O objetivo do presente estudo foi investigar o atual nível de contaminação de ocratoxina A no café brasileiro destinado à exportação e a possível relação entre grãos danificados e a contaminação pela toxina. Foram tomadas amostras de café verde arábica e robusta, provenientes de seis estados brasileiros, obtidas em duas safras consecutivas, incluindo “café orgânico” e café de estoques governamentais.

Parte 3 – ARTIGO DE REVISÃO

A ser submetido ao Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos.

OCRATOXINA A EM CAFÉ

Andréa Pittelli-Gollücke, Marta Hiromi Taniwaki, Débora de Queiroz Tavares

Resumo

A ocratoxina A (OTA) é uma micotoxina detectada principalmente em cereais e seus produtos. É nefrotóxica para humanos e carcinogênica para animais. Com metodologias de detecção mais refinadas, verificou-se a ocorrência de OTA no café e em outros alimentos. A presente revisão apresenta a forma de produção da ocratoxina A, sua toxicidade e incidência em café. Foram discutidos também o efeito do processamento na destruição da OTA, a definição de tolerância diária de OTA, a legislação e programas de prevenção.

Palavras-chave: micotoxinas; ocratoxina A; café; torração; legislação.

Summary

Ochratoxin A is a mycotoxin mostly found in cereals and their products. It is nephrotoxic to humans and carcinogenic to animals. Due to improvements in detection methodology, OTA has also been detected in other foodstuffs, such as coffee. This review describes the OTA formation, toxicity and occurrence in

coffee. The effects of coffee processing in OTA destruction, maximum tolerable intake levels, legal restrictions and prevention programs were also discussed.

Key words: mycotoxins; ochratoxin A; coffee; roasting; legislation.

1- INTRODUÇÃO

Segundo estudo do *Food and Drug Administration (FDA)* relatado por Strobel (1988), o gênero de fungo mais freqüente em café verde foi *Aspergillus*, cujo aspecto toxigênico é relevante neste substrato. A espécie de *Aspergillus* mais invasora é *A. ochraceus*, capaz de produzir cinco micotoxinas importantes: ocratoxina A e B, xantomegnina, viomeleína e vioxantina.

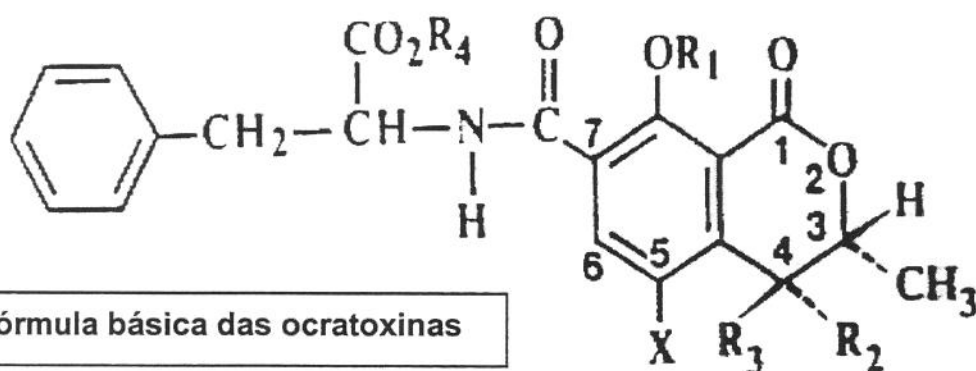
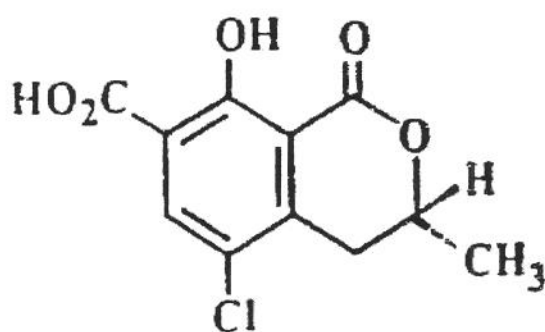
Krogh (1987) discorreu sobre o tema da incidência de ocratoxina A em alimentos: o primeiro relato ocorreu na década de 60 na África do Sul e discorria sobre metabólitos tóxicos produzidos por fungos. Nove anos depois a toxina foi encontrada em milho cultivado nos Estados Unidos, ao mesmo tempo que na Escandinávia, surgiam doenças em suínos relacionadas ao consumo de ração contaminada por fungos. Em 1978, chegou-se à conclusão que a ocratoxina A era a causa determinante de uma nefropatia suína e desde então foi associada a nefropatias crônicas em humanos. Atualmente, sabe-se que a ocratoxina A contamina vários tipos de grãos, uvas secas, vinhos, cervejas, cacau e café proveniente de vários países.

2- CARACTERÍSTICAS DA OCRATOXINA A (OTA)

A ocratoxina A ($C_{20}H_{18}ClNO_6$) é um composto com peso molecular 403,82 daltons. Steyn et al. (1970) estudaram a biossíntese de ocratoxinas e demonstraram que o grupo isocumárico, chamado de ocratoxina α (figura 1), resulta da união de uma molécula de acetil-CoA e quatro de malonil-CoA. O átomo de cloro é provavelmente derivado de cloreto de sódio e o grupo adicional COOH provém da metionina. A L-fenilalanina, proveniente da via do ácido shikímico, se liga à estrutura através do grupo carboxila, dando origem à ocratoxina A (STEYN et al., 1970; STEYN, 1993).

A figura 1 apresenta a estrutura da ocratoxina e de seus seis análogos conhecidos.

Núcleo Isocumárico
(Ocratoxina α)



Fórmula básica das ocratoxinas

FIGURA 1. Fórmula básica das ocratoxinas (Rahimtula et al. 1990).

Ocratoxina A:	X=Cl; R1=R2=R3=R4=H
Ocratoxina B:	X=H; R1=R2=R3=R4=H
Ocratoxina C:	X=Cl; R1=R2=R3=H; R4=CH3
O-metil-octatoxina C:	X=Cl; R2=R3=H; R1=R4=CH3
(4R)-4-hidroxi-ocratoxina A	X=Cl; R1=R3=R4=H; R2=OH
(4S)-4-hidroxi-ocratoxina A	X=Cl; R1=R2=R4=H; R3=OH

A OTA é um metabólito secundário produzido por fungos específicos sob determinadas condições de temperatura e atividade de água. Ao contrário dos metabólitos primários, que são compostos conhecidos e necessários para o crescimento e funcionalidade de fungos, a função biológica deste metabólito secundário não é clara. É possível que atue como defensivo natural no ambiente dos fungos, pois são ativos contra outros seres vivos (MOSS, 1987; STROBEL, 1988). Os metabólitos secundários são específicos da espécie e produzidos durante a fase estacionária da cultura; a produção não é uniforme sendo muito sensível às condições ambientais e nutricionais (MOSS, 1987). O crescimento de fungos em substrato sólido requer além das condições ambientais, o contato íntimo das hifas com a fonte de nutrientes: a produção de metabólitos secundários é consequência desta relação.

A determinação de ocratoxina A segue as mesmas etapas que aquela de outros contaminantes em alimentos: inicia-se com amostragem, limpeza, separação, seguida de detecção, quantificação e confirmação de identidade (van Egmond, 1996). A obtenção de amostras representativas é um ponto crítico na análise de micotoxinas devido ao caráter heterogêneo da contaminação. Atualmente não há um plano recomendado de amostragem para a ocratoxina A em café pelo *FDA (Food and Drug Administration)* ou pelo *Codex Alimentarius*. Gilbert (1999) sugeriu separar 20 a 30 kg de amostras extraídos a partir de 20 a 100 sub-amostras aleatórias; a seguir triturar finamente, misturar e então extrair sub-amostras para análise.

A extração de OTA da amostra é feita com uma combinação de solventes orgânicos e água ou ácidos. Para a purificação do extrato utilizam-se colunas de imunoafinidade, compostas de anticorpos monoclonais específicos para OTA, que retêm a toxina, enquanto os demais compostos não são retidos na coluna.

Em seguida, a ocratoxina A é eluída com acetonitrila e injetada em cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE). A detecção se dá por fluorescência. Embora a maioria dos estudos nos últimos anos utilize CLAE, a cromatografia em camada delgada (CCD), seguida de detecção em UV, é um método útil para separação e quantificação de OTA. No caso da quantificação por CLAE e detecção por fluorescência o limite de detecção chega a menos de 1 ng/g (van Egmond, 1996; PITTET et al., 1996).

3- PRODUÇÃO DE OTA

3.1. Fungos produtores

As ocratoxinas foram isoladas pela primeira vez em 1965 a partir de uma cultura de *A. ochraceus*. Descobriu-se depois que outras espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* eram capazes de produzir OTA, dependendo das condições climáticas: em países de clima quente, OTA é produzida principalmente por fungos dos gêneros *Aspergillus* e em zonas temperadas, por *Penicillium* (KROGH, 1987). Por esta razão, o *Aspergillus ochraceus* está associado à produção de OTA em alimentos como café, cacau e soja, enquanto

que o *Penicillium verrucosum* está associado à presença de OTA em cereais estocados nos países sub-tropicais (MOSS, 1996).

Os fungos produtores de OTA são freqüentes no solo, na vegetação em decomposição e nos grãos (MOSS, 1987). Em geral, as espécies do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* são colonizadoras mais rápidas que outros fungos xerofílicos, portanto deterioram alimentos sobretudo sob processamento incorreto e/ou umidade alta (PITT, 1985).

Mislivec et al. (1983) estudaram a incidência de fungos toxigênicos e não-toxigênicos em café de 31 países produtores na Ásia, África e Américas Central e do Sul. Das 944 amostras estudadas, os fungos foram detectados em 99,1% de grãos não desinfectados na superfície e em 47,9% dos desinfectados com solução a 5% de NaOCl. Segundo os autores, a flora dominante no grão de café antes e depois da desinfecção pertencia ao gênero *Aspergillus*. A principal espécie invasora foi *A. ochraceus*, potencial produtora de ocratoxina A, embora outras espécies toxigênicas como *A. flavus* e *A. niger* estivessem presentes.

Recentemente, Pitt et al. (2001) analisaram a distribuição de *Aspergillus ochraceus*, *A. niger* e *A. carbonarius* em mais de 400 amostras de café provenientes de quatro regiões produtoras nos estados de São Paulo e Minas Gerais. Entre os 872 organismos isolados, *A. niger* foi a espécie predominante (63%), seguida de *A. ochraceus* e outras espécies intimamente relacionadas (31%). *A. carbonarius* foi menos frequente (6%) e encontrado em apenas uma região (Alta Paulista). Ao serem testados quanto a capacidade toxigênica, 75%

das cepas de *A. ochraceus* e 77% de *A. carbonarius* produziram OTA em ágar YES (extrato de levedura + 15% de sacarose) contra 3% de *A. niger*.

Bittencourt et al. (2001), ao estudarem 93 amostras de café verde em regiões produtoras de Minas Gerais, Goiás e Bahia, encontraram 91% de contaminação por fungos, dos quais 39% foram identificados como *A. ochraceus*. Foi demonstrada uma capacidade de formar OTA em 60% das cepas estudadas.

Estes resultados confirmam o trabalho de Taniwaki et al. (1999) que analisaram a capacidade toxigênica de fungos encontrados em café proveniente de cinco regiões dos estados de São Paulo, Minas Gerais e Paraná. A maioria das cepas de *Aspergillus ochraceus* e *A. carbonarius* isoladas demonstraram ser produtores de OTA, enquanto que *A. niger* foi um produtor menos importante de OTA.

3.2. Fatores que afetam o crescimento do fungo e a produção de ocratoxina A em café

A obtenção de dados sobre as condições de crescimento e produção de OTA por *Aspergillus* é fundamental para o desenvolvimento de métodos de prevenção para formação de OTA. As condições básicas de crescimento e produção de ocratoxina A por *A. ochraceus* em meio de cultura estão na tabela 1.

TABELA 1: Condições para crescimento e produção de OTA por *A. ochraceus* em meio de cultura.

	Mínimo	Ótimo	Máximo
<u>Crescimento</u>			
Temperatura (°C)	8	24-31	37
Atividade de água	0,77-0,80	0,95-0,99	> 0,99
pH	2,2	3-8	13
<u>Produção de OTA</u>			
Temperatura (°C)	12	31	37
Atividade de água	0,83	0,95-0,99	> 0,99

Fonte: *International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF)*, 1996.

Sansing et al. (1973) estudaram os efeitos tempo e temperatura sobre a produção de OTA por *A. ochraceus* em meio ágar YES (extrato de levedura + 15% de sacarose). O pico de produção da toxina ocorreu após 10 e 12 dias de incubação a 25°C, embora não diferenciasse significativamente dos valores encontrados após 14 dias à mesma temperatura e após 6 e 8 dias a 30°C.

A influência da atividade de água (a_w) sobre o crescimento fúngico e produção de OTA em café verde por *A. ochraceus* e *A. carbonarius* foi investigada por Taniwaki et al. (2001). Grãos de café foram inoculados com

esporos de cada um dos microrganismos e incubados a 25°C sob três diferentes níveis de atividade de água: 0,80, 0,87 e 0,95. O crescimento e toxigenicidade das espécies em a_w de 0,80 foi inexpressivo. A produção de OTA por *A. ochraceus* atingiu $2,5 \times 10^3$ ng/g e $7,2 \times 10^3$ ng/g quando incubado em 0,87 e 0,95 de a_w respectivamente após 21 dias. Por sua vez, o máximo de OTA produzido por *A. carbonarius* foi 9,62 ng/g em a_w 1,00. Os resultados obtidos por Taniwaki et al. apontam o potencial toxigênico de *A. ochraceus* em café verde em $a_w > 0,87$. A manutenção do café a $a_w < 0,80$ (abaixo de 14% de umidade em base seca) é uma forma de evitar a produção de OTA. Contudo, para prevenir o crescimento fúngico e manter a qualidade do grão, a umidade deve estar em torno de 11%.

Para dimensionar o efeito de alternância de temperatura durante a secagem, armazenamento e transporte do café, Palácios-Cabrera et al. (2001) submeteram cepas de *A. ochraceus* a alterações de temperatura: 14 e 25°C (médias diurnas e noturnas nos meses de safra) em intervalos de 12 horas. O ensaio foi efetuado sob três condições de a_w (0,80, 0,87 e 0,95). A produção de OTA foi respectivamente 57,1%, 34,4% e 13,9% maior a temperaturas cíclicas do que à temperatura constante de 25°C em a_w 0,80, 0,87 e 0,95. Estes resultados indicam que a variação de temperatura entre dia e noite nos armazéns e/ou terreiro de café verde, mesmo sob baixa umidade seria um agente estimulador para a produção de OTA. De fato, à baixa atividade de água (0,80), a variação de temperatura provocou maior incremento na produção de OTA.

Urbano et al. (2001) estudaram os diferentes estágios de desenvolvimento da fruta de café arábica proveniente dos estados de São Paulo e Paraná (safra 1998/1999) quanto à susceptibilidade à infestação por fungos e produção de OTA pelos fungos infectantes. Os resultados mostraram que os grãos em contato com o chão ou manipulados apresentaram incidência 5 a 10 vezes superior de *A. ochraceus* e *A. niger* do que as cerejas e passas no pé, indicando que o contato com o chão e manipulação inadequada do café são condições favoráveis à contaminação. Os mesmos autores obtiveram OTA em 88,1% e 11,5% das cepas de *A. ochraceus* e *A. niger* isoladas, respectivamente.

Insetos podem ser vetores de contaminação do café por fungos produtores de ocratoxina A (VEGA e MERCADIER, 1998). Os autores isolaram *A. ochraceus* em grãos de café infectados por "broca do café" (*Hypothenemus hampei*) em Uganda e Benin. A broca é uma praga comum e mundial nas regiões produtoras de café, que deteriora a superfície do grão e reduz o valor comercial. Dentre os insetos investigados em Uganda e Benin, 5,3% e 17,4%, respectivamente, estavam infectados com o fungo.

3.3. Estabilidade da molécula de OTA e métodos de detoxicação

Segundo Scott (1996) a ocratoxina A é uma molécula moderadamente estável, sofrendo pouca alteração após o processamento dos alimentos. A limpeza e moagem de trigo e cevada não foram capazes de destruir OTA em

amostras naturalmente contaminadas (SCOTT, 1996). Não foi observada redução no teor de OTA durante a produção de pães com farinha artificialmente contaminada ou com inoculação de OTA antes do processo térmico. Durante o processo térmico por 25 minutos a 220°C não houve decomposição da toxina. Entretanto, após o processo de cozimento de biscoitos onde a temperatura é mais elevada houve 2/3 de redução de OTA (SUBIRADE, 1996). Bouldra et al. (1995) investigou a inativação de OTA em trigo em duas condições de umidade (seco e úmido). O resultado obtido demonstrou que OTA é relativamente estável a temperaturas até 250°C e que a presença de umidade (50%) aumenta a velocidade de decomposição da toxina a 100°C e a 150°C. Os autores observaram, entretanto, que a 200°C a presença de umidade reduz a taxa de decomposição de OTA (tabela 2).

TABELA 2. Tempo de meia-vida de OTA (BOULDRA, 1995).

Temperatura (°C)	Trigo úmido (min.)	Trigo seco (min.)
100	145	707
150	60	201
200	19	12
250	-	6

Devido à estabilidade de OTA às temperaturas usuais de cozimento, surgiram pesquisas introduzindo métodos alternativos para obter sua degradação ou eliminação.

Em estudo com ração para porcos, a adição de carvão ativado à mesma resultou em redução no nível de OTA no sangue e tecidos dos animais. Silicatos de sódio, cálcio e alumínio são capazes de adsorver OTA em rações, assim como hidróxido de sódio. Entretanto, Scott (1996) apresenta críticas aos testes de detoxicação devido ao teor de resíduos tóxicos encontrados.

Deberghes et al. (1993) estudaram a ação preventiva de meios físicos, químicos e enzimáticos sobre a produção de OTA por espécies toxigênicas de *Aspergillus* ou sob a condição de destruidores da toxina quando em meios de cultura líquido ou sólido. A exposição da cultura de *A. ochraceus* a raios UV por duas horas mostrou ser eficiente na prevenção de formação de OTA em meio líquido. Irradiação γ também mostrou-se eficiente para prevenir a formação de OTA e também para sua destruição. As doses efetivas estavam entre 2 a 3 KGy para o meio líquido e 4 a 5 KGy para o meio sólido. O efeito de congelamento (-20°C) e descongelamento repetidos (a cada 20 minutos) sobre inóculos de *A. ochraceus* em meio líquido reduziu o crescimento dos micélios. Para demonstrar a eficiência do método enzimático foi aplicada a carboxipeptidase A bovina ao inóculo. Sob a concentração de 4 a 5 U/l, a enzima demonstrou capacidade ótima para clivar a OTA existente em meio líquido.

Stander et al. (2000) testaram algumas lipases comerciais oriundas de distintos microrganismos (*Rhizopus*, *Aspergillus*, *Pseudomonas* e *Penicillium*)

quanto à capacidade de clivar OTA até compostos não tóxicos. Apenas uma lipase oriunda de *A. niger* demonstrou capacidade hidrolítica sobre a OTA separando-a em ocratoxina α (não tóxica) e fenilalanina; esta forma de inativação de ocratoxina A não está ainda comercialmente disponível.

Varga et al. (2000) testaram 70 isolados de várias espécies de *Aspergillus* quanto à habilidade de degradar a OTA. Cepas de *A. fumigatus* e de espécies negras de *Aspergillus* eliminaram 2 μg de OTA/ml do meio de cultura (YES). A cinética de detoxicação foi estudada com uma cepa de *A. niger* (CBS 120.49) não-tóxica. Em sete dias de incubação o microrganismo demonstrou, em meios líquido e sólido, ser eficaz na conversão de OTA para ocratoxina α . A quantidade de ocratoxina α aumentou nos primeiros seis dias e diminuiu gradualmente até restarem traços após 10 dias de incubação.

4- TOXICIDADE

4.1. Ações sobre o metabolismo *in vivo* e *in vitro*, transferência através da lactação

Krogh (1987) resumiu as seguintes etapas sobre o metabolismo animal da OTA: absorção, distribuição nos tecidos, transformação e excreção. Em ratos sujeitos à ingesta única de 10 mg de OTA por kg de peso corpóreo (10 mg/kg de peso) demonstrou-se que a concentração da toxina era maior na mucosa do

estômago nas primeiras 4 horas em relação ao intestino. A seguir, a absorção intestinal da toxina indicou o jejuno proximal como o local de maior absorção. A veia portal foi a seguir a principal rota de transporte, embora ocorresse também transporte pelos vasos linfáticos. Em experimentos com porcos alimentados com ração contaminada com OTA, o autor relatou presença de resíduos da toxina em quatro tecidos na seguinte ordem decrescente: rins, fígado, músculo e tecido adiposo. Krogh relata que ratos submetidos a injeção intra-peritoneal de 1 mg de OTA permitiram determinar que os rins continham duas vezes mais ocratoxina A intacta do que o fígado, após 30 minutos: os rins continham entre 4 e 5% da dose total.

Quanto às transformações metabólicas, foi demonstrado em ratos que a ocratoxina A se liga à albumina sérica *in vitro* e *in vivo*. Ratos injetados intra-peritonealmente com OTA demonstraram que 1 a 1,5% da dose administrada foi excretada na urina como (4R)-4-hidróxi-ocratoxina A e 25 a 27% como ocratoxina α . Neste experimento concluiu-se que os ratos possuem a capacidade de clivar entre 26 e 28,5% de OTA: a menor parte resultou no análogo tóxico (4-hidroxi-OTA) e a maior parte no núcleo isocumárico (ocratoxina α), considerado não-tóxico. Segundo Krogh (1987) os animais superiores excretam ocratoxina A e seus metabólitos principalmente pela urina e fezes e a seguir pela bile: ratos submetidos a ingesta de OTA, excretaram 6% de OTA, 1,5% de (4R)-4-hidróxi-ocratoxina A e entre 25 e 27% de ocratoxina α na urina; nas fezes excretaram 12% de OTA e 9% de ocratoxina α . A taxa de "clearance" de OTA dos tecidos de porcos demonstrou-se exponencial na

concentração ensaiada de 1 mg de OTA/kg de ração (KROGH, 1987). Quando submetidos à ingesta de 1 mg de OTA/kg de ração durante 1 mês e depois mantidos sem a toxina pelo mesmo período, a meia-vida dos resíduos nas amostras de rins, fígado, músculo e tecido adiposo esteve entre o 3º e 5º dia, sendo a toxina ainda detectável nos rins após 1 mês do término de exposição.

Uma vez metabolizada, a OTA exerce diversos efeitos tóxicos. A toxina demonstrou efeito inibitório da síntese de proteínas *in vitro* e *in vivo* por competição com a fenilalanina, na etapa da síntese de tRNA(phe) catalisada pela fenilanyl-tRNA sintetase. Até mesmo o metabólito de OTA, o 4-hidróxi-ocratoxina A, apresentou efeito semelhante, enquanto o núcleo ocratoxina α e o análogo ocratoxina B não demonstraram efeito sobre a enzima (DIRHEIMER, 1996). A inibição da mencionada sintetase (fenilanyl-tRNA) pôde ser revertida pela fenilalanina, o que explica o fato deste aminoácido demonstrar ação preventiva contra o efeito imuno supressor da OTA, podendo prevenir parcialmente sua ação teratogênica e nefrogênica (CREEPY et al., 1996). Análogos de OTA, com substituição de fenilalanina por outro aminoácido, demonstraram efeito inibitório semelhante sobre suas tRNA sintetases correspondentes e consequente sínteses protéicas. A OTA age também sobre aquelas enzimas que utilizam a fenilalanina como substrato causando inativações: é o caso, por exemplo, da fenilalanina hidroxilase. É interessante notar que a porção fenilalanina da molécula de OTA foi parcialmente hidroxilada a tirosina após incubação com hepatócitos (CREEPY e al., 1996), demonstrando a afinidade entre enzima e toxina.

Meisner e Selanik (1979) demonstraram 26% de inibição da gluconeogênese renal a partir do piruvato em ratos alimentados com 2 mg de OTA/kg de ração/dia por dois dias, assim como 55% de redução da atividade da enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK). Os autores relacionaram o bloqueio parcial da gluconeogênese renal à inibição da atividade de PEPCK, embora no fígado a atividade da enzima não tenha sido alterada. Estudo subsequente, ainda em ratos, Meisner e Meisner (1981) verificaram que em doses menores em relação ao estudo precedente (0,3 - 0,5 mg/kg) houve redução da atividade de PEPCK em 50%, enquanto que outras enzimas localizadas nos túbulos proximais do néfron não foram afetadas. Meisner et al. (1983) demonstraram que esta redução ocorreu em função da diminuição da concentração de mRNA codificado para PEPCK *in vivo*, embora a velocidade de transcrição do RNA de PEPCK não tenha sido alterada. A remoção da fenilalanina da estrutura da toxina impediu inibição da atividade de PEPCK e da síntese protéica *in vivo*.

Visto que a ocratoxina A tem efeito bloqueador, mesmo parcial sobre a gluconeogênese, é esperado que o metabolismo de carboidratos seja afetado. De fato, Krogh (1987) relatou que uma dose única de 15 mg de OTA/kg de peso corpóreo causou o decréscimo do nível de glicogênio no fígado de ratos e seu acréscimo no coração após 4 horas: o declínio hepático foi associado ao aumento de glicose sérica e também à diminuição de glicose-6-fosfato no fígado. Ao mesmo tempo, a atividade da enzima glicogênio sintetase no fígado decresceu e da fosforilase aumentou. Três doses diárias de 5 mg de OTA/kg de

peso corpóreo causaram diminuição da concentração de glicogênio medida ao quarto dia. Este efeito foi atribuído à inibição do transporte da glicose ao fígado, supressão de síntese de glicogênio e aceleração da metabolização do glicogênio estocado no hepatócito.

A relação de transferência de OTA através da lactação está comprovada. O leite, assim como o soro sangüíneo é um bom biomarcador para rastrear xenobióticos e entre estes a OTA (BRERA et al. 2001). Após dose intravenosa ou oral de OTA a transferência desta, do sangue para o leite, foi verificada em coelhas e ratazanas, segundo o relato de Ferrufino-Guardia et al. (2001). Entretanto, os autores citam que não ocorreu a transferência de OTA da ração para o leite de porcas. Um estudo destes autores para verificar a transferência de OTA do sangue para o leite em coelhas alimentadas repetitivamente com ração contaminada ao longo de 19 dias demonstrou três fatos interessantes, a partir do 5º dia de ensaio:

- 1- A média de ingesta de OTA foi constante ($15,6 \mu\text{g/kg}$ de peso corpóreo/dia)
- 2- A média de OTA no plasma sangüíneo manteve-se estável também ($2,9 \mu\text{g/L}$)
- 3- A quantidade de OTA acumulada no leite elevou-se gradativamente: $37,7 \text{ ng/L}$ ao 5º dia até $48,8 \text{ ng/L}$ ao 19º. dia.

Quanto à transferência de OTA para o leite de mulheres italianas foi relatado por BRERA et al. 2001 que em 67 doadoras, 63% dos leites demonstraram

presença de OTA (limite de detecção em 0,015 ng/ml). O intervalo de concentração esteve entre 0,015 ng/ml e 2,350 ng/ml.

Embora ocorram respostas diferenciadas para distintos animais, no caso dos humanos não restam dúvidas quanto à transferência de OTA de lactantes ao leite.

4.2. Imuno supressão, ação sobre mitocôndrias e peroxidação lipídica

Haubeck et al. (1981) relataram o forte efeito imuno supressor de OTA na indução da resposta imune em camundongos após injeção intra peritoneal de 0,005 μ g de OTA por kg corpóreo. Os animais receberam a dose de OTA acompanhada ou não de fenilalanina. Nos camundongos que receberam OTA + fenilalanina na concentração de 1:2 não ocorreu efeito imuno supressor. Creepy et al. (1983) investigaram o efeito imuno supressor em ratos de dois metabólitos de OTA: (4R)-4-hidróxi-ocratoxina A e ocratoxina α . O metabólito (4R)-4-hidróxi-ocratoxina A demonstrou ser quase tão ativo quanto OTA como imuno supressor causando 80% de redução das células produtoras de Imunoglobulina M (lembrando que foi 90% a redução causada pela OTA) e 93% de redução das células produtoras de Imunoglobulina G (contra 92% causada pela OTA). Quanto à ocratoxina α , esta não se mostrou eficiente como imunossupressora, indicando que a presença da fenilalanina é necessária para deflagrar a ação inibitória. Os autores acima sugerem que o efeito imunossupressor da OTA seja

causado pela inibição da síntese de proteínas por competição com fenilalanina na reação catalisada por fenilalanil-tRNA sintetase. Ademais, concluem que a parte isocumárica da molécula (ocratoxina α) não é capaz de causar imunossupressão e que a hidroxilação de núcleo isocumárico não afeta o efeito tóxico da OTA.

É freqüente a utilização de mitocôndrias *in vitro* para detectar efeitos deletérios de compostos. O estudo *in vitro* com mitocôndrias hepáticas de ratos demonstrou que a OTA inibe a respiração da organela, atuando como competidor das proteínas carreadoras localizadas na membrana interna da mitocôndria. Foi evidenciado que a entrada de OTA na mitocôndria era um processo dependente de energia, resultando em depleção do ATP intra-mitocondrial. Adicionalmente, a OTA inibia o transporte de fosfato no interior da mitocôndria, resultando em sua degeneração. Esta ação degenerativa já havia sido observada em ratos sujeitos a doses orais de 10 mg de OTA/kg de peso corpóreo (KROGH, 1987).

Outra ação tóxica de OTA é sua capacidade de formar peróxidos em lipídeos por oxidação, *in vivo* e *in vitro*, prejudicando a funcionalidade de biomembranas celulares e mitocondriais, levando a reações que podem levar à morte celular. Rahimtula et al. (1988) investigaram a ação de OTA em microssomos de fígado de ratos e observaram aumento importante da taxa de peroxidação lipídica, a qual podia ser inibida pela adição de antioxidante BHT. Os autores sugeriram que a OTA facilita a etapa de iniciação da peroxidação lipídica e/ou auxiliando a redução de Fe^{3+} a Fe^{2+} pelo NADPH ou pelo ascorbato,

através da formação do quelato OTA-Fe³⁺. *In vivo* o processo deve envolver a mediação do citocromo P-450. Omar et al. (1990) confirmaram a mediação do citocromo P-450 utilizando um sistema que incluiu vesículas de fosfolípidos, citocromo P-450 redutase, Fe³⁺, e NADPH em presença de OTA. O sistema experimental demonstrou a formação de um complexo OTA-Fe³⁺. A taxa de redução de Fe³⁺ a Fe²⁺ sofreu aumento significativo na presença de OTA, indicando que a toxina estimula a peroxidação lipídica por complexação com Fe³⁺, facilitando sua redução. Höhler (1998) relatou o efeito do uso de antioxidantes como o ácido ascórbico e a forma solúvel em água de vitamina E (Trolox C) na redução dos efeitos tóxicos de OTA em ratos e bactérias.

4.3. Teratogênese, mutagênese e carcinogênese

A ocratoxina A tem ação teratogênica sobre ratos: injeção peritonial de 5 mg de OTA/kg de peso corpóreo em camundongas grávidas ao 7° e 12° dias da gestação aumentaram a mortalidade pré-natal, produziu diminuição do peso fetal, más formações, anencefalia, anomalias oculares, faciais e digitais dos recém nascidos. Ratazanas e hamsters quando submetidas a injeções contendo OTA demonstraram efeitos similares (KROGH, 1987).

Mayura et al. (1984) estudaram a eficácia inibitória da fenilalanina sobre a capacidade teratogênica da OTA: injetaram dose única de OTA (1,75 mg/kg corpóreo) em ratazanas grávidas com e sem adição de 20 mg/kg e 25 mg/kg de peso corpóreo de fenilalanina. Houve 72% de involução embrionária e alta

incidência de más formações. Em resumo, a fenilalanina não demonstrou ação protetora quando co-administrada com OTA em níveis inferiores a 20 mg/kg. Entretanto, quando o aminoácido foi administrado em dose única em concentrações de 20 mg/kg ou 25 mg/kg de peso corpóreo, conseguiu-se redução dos efeitos teratogênicos, embora não significativa.

Para examinar a capacidade mutagênica de OTA procederam-se ensaios com *Bacillus subtilis*, *Samonella typhimurium* e *Saccharomyces cerevisiae* e os resultados foram negativos (KROGH, 1987). Em células humanas, Manolova et al. (1990) testaram *in vitro* a capacidade da ocratoxina A de induzir aberrações cromossômicas em linfócitos periféricos: o nível de aberrações *in vitro* aumentou cinco vezes em relação ao controle. Observou-se que a toxina promoveu aberrações nos cromossomos X, similares àsquelas detectadas em linfócitos de pacientes que sofrem de nefropatia endêmica, como citaremos logo adiante. Pfohl-Leszkowicz et al. (1993) estudaram o efeito genotóxico de OTA medindo a formação e o “clearance” do complexo OTA-DNA após administração oral de 2,5 mg de OTA/kg corpóreo em camundongos. Foram detectados diversos nucleotídios modificados do DNA de rins, fígado e baço, 24 horas após a administração. O rim foi o principal alvo da genotoxicidade de OTA; os nucleotídios modificados desapareceram no fígado e baço após 5 dias da administração de OTA; porém persistiram até o 16º dia nos rins.

O efeito carcinogênico de OTA em ratos está bem estabelecido. O *International Agency for Research on Cancer (IARC)* classificou a toxina como “possível carcinógeno humano baseado em *suficiente evidência* carcinogênica

obtida dos testes com animais e *evidência inadequada* para humanos” (KUIPER-GOODMAN, 1996).

Os resultados de muitos estudos com camundongos na década de 80, detectando maior incidência de tumores nos animais submetidos a dietas com ocratoxina A foram apresentados por Krogh (1987). Kuiper-Goodman (1996), em relação aos rins, comparou os efeitos tóxicos de OTA em ratos a compostos carcinógenos genotóxicos e não-genotóxicos tendo demonstrado que OTA se comporta mais como toxina carcinógena genotóxica. A conclusão está baseada (1) no evidente caráter maligno; (2) no alto índice de metástases; (3) na baixa dose de toxina necessária para o desenvolvimento do tumor e (4) na rápida progressão. Entretanto, a autora aponta inconsistências nestes estudos e alerta que mecanismos não-genotóxicos podem ser também responsáveis pelo efeito carcinogênico da ocratoxina A.

4.4 Nefropatias

4.4.1 Nefropatias endêmicas em animais e humanos

Casos de nefropatias em suínos são encontrados frequentemente na Escandinávia; a descoberta iniciou-se na Dinamarca em 1928, conforme relatou Krogh (1987). A incidência da doença em 1971 estava entre 0,6 e 65,9 casos por 10.000 porcos, dependendo da região, com epidemias registradas em 1963 e 1971, associada à alta umidade dos grãos das dietas, em função das condições

climáticas dos respectivos anos. Os estudos revelaram que a ocorrência de OTA na ração era o fator etiológico da nefropatia suína, embora a toxina citrinina pudesse estar envolvida também. Na Hungria, em 1980-1981, foi realizado um estudo epidemiológico onde encontrou-se taxa de 2,0 casos de nefropatia por 10.000 porcos; 39% dos rins doentes continham resíduos de OTA. As mudanças morfológicas causadas pela doença em porcos são caracterizadas por degeneração dos túbulos proximais, fibrose intersticial da córtex renal e perda de alguns glomérulos. Na Dinamarca, lesões renais associadas à ingesta de ocratoxina A também foram encontradas em aves (KROGH, 1987).

A correlação de OTA com nefropatias em humanos foi estudada em diversos países. Bacha et al. (1993) estudaram a relação entre a presença de OTA no sangue e casos de nefropatias na Tunísia. Dos 310 voluntários que sofriam de doenças renais, 100% apresentaram OTA no sangue analisado, em concentrações entre 25 e 100 ng/ml e média 56 ± 19 ng/ml. Na população geral, 442 amostras de sangue de voluntários foram analisadas e em 70% OTA foi detectada em concentrações entre 2 e 100 ng/ml.

Na Argélia, Khalef et al. (1993) investigaram a presença de OTA no sangue da população geral (346 voluntários) e nefropatas (84 voluntários) encontrando 66% e 95% de amostras positivas para OTA respectivamente. O teor médio de OTA foi $2,8 \pm 2,6$ ng/ml para a população geral e foi $7,4 \pm 7,1$ ng/ml para a população doente. A incidência de OTA no sangue da população dos dois países (Argélia e Tunísia) foi maior que a encontrada em outros países investigados. Hadlok (1993) analisou a incidência de OTA na população de

diversas regiões da Alemanha, compilando estudos realizados na década de 80. De 56 a 68% dos voluntários investigados apresentaram OTA no sangue em concentrações entre 0,1 e 14,4 ng/ml. Nas regiões francesas da Alsácia, Aquitânia e Alpes franceses a incidência de OTA na população foi em média 20% com concentração média 0,1 ng/ml nos anos de 1991 e 1992 (CREEPY et al., 1993). No Japão, a concentração de OTA em plasma de 184 voluntários foi investigada durante quatro anos. Estes voluntários apresentaram 85% de casos positivos, com 68×10^{-3} ng/ml de concentração média de OTA (UENO et al., 1998). No Canadá, em estudo realizado com 159 voluntários em 1990, não houve diferença significativa entre incidência de OTA no sangue de pacientes nefropatas e não-nefropatas. 40% apresentaram concentração média de 0,47 ng/ml entre os positivos para OTA (KUIPER-GOODMAN et al., 1993).

A relação entre a concentração de OTA e nefropatias está estabelecida em certos países dos Bálcãs, Escandinávia e norte da África; em outros países esta relação não é conclusiva.

4.4.2 Nefropatia endêmica dos Bálcãs (*Balkan endemic nephropathy- BEN*)

A nefropatia endêmica dos Bálcãs (BEN) é uma doença renal observada em populações da antiga Iugoslávia, Romênia e Bulgária. Nas últimas décadas, investigações etiológicas a respeito de bactérias, vírus, metais tóxicos e fatores genéticos foram conduzidas sem resultados conclusivos. BEN é uma doença crônica e endêmica que ocorre usualmente na faixa etária entre 30 e 50 anos e

que afeta mais as mulheres. É caracterizada pela redução significativa do tamanho dos rins e seu progresso leva lentamente à morte. Anatomicamente, a doença leva à degeneração tubular, fibrose intersticial e hialinização glomerular na córtex.

Há muitas similaridades entre as mudanças estruturais e funcionais renais encontrada na nefropatia endêmica dos Bálcãs e a nefropatia suína induzida por OTA. Investigações em alimentos indicaram maior exposição a OTA nas áreas endêmicas da antiga Iugoslávia (12,8%) que nas áreas de controle (1,6%) (KROGH, 1987).

Embora haja controvérsias sobre a relação entre BEN e ocratoxina A, pesquisas recentes apontam correlação entre OTA e nefropatia. Radic et al. (1997) publicaram resultados obtidos após dez anos de estudos comparativos entre habitantes de uma vila com doenças renais endêmicas e vilas de controle na Croácia. A incidência de OTA em 6.909 amostras de sangue coletadas no período atingiu 4,5% na vila com doença renal endêmica e 2,4% nas vilas de controle com concentração entre 2 e 50 ng/ml e 2 e 10 ng/ml, respectivamente. Quase todas as amostras de alimentos (cereais e feijões) e sangue coletados na região endêmica continham OTA.

As nefropatias endêmicas estão associadas, portanto à presença de OTA, embora continuem indeterminados os alvos específicos da toxina nos rins e sua forma de atuação.

5- OCRATOXINA A EM CAFÉ

5.1. Ocorrência de OTA em alimentos e no café

Os cereais (milho, trigo, aveia, cevada, centeio e arroz) são considerados os alimentos com maior incidência de ocratoxina A, contribuindo com até 50% da ingestão total de OTA no mundo (PITT, 2001). Embora a infecção dos cereais pelos fungos produtores de OTA ocorra antes e após a colheita, predomina a produção de OTA pós-colheita (PITTET, 2001). A maior parte dos registros de sua ocorrência em alimentos é proveniente da Europa Central, Balcãs e Escandinávia, onde as principais fontes de ingesta de OTA são cereais (60%), vinho (25%), suco de uva (5 a 7%) e café (5 a 7%) (PITT, 2001). Outros países como Índia, Canadá e Estados Unidos também estão susceptíveis a altos teores de OTA em certos produtos, principalmente em rações animais (PITTET, 2001). A OTA foi detectada em outros produtos como soja e feijões, cacau, uvas passas, cerveja, condimentos, rins de suínos e chouriço em várias investigações. Dados recentes da incidência de OTA em alimentos estão apresentados na tabela 3.

TABELA 3. Ocorrências recentes de OTA em alimentos (exceto café).

Alimento	País	Ocorrência Positivos/total	Contaminação (ng/g)	Referências
Cacau e derivados	Reino Unido	50/60	0,1 – 2,4	Slayne (2001)
Trigo e cevada	E.U.A.	55/486	0,2 – 31,4	Trucksess et al. (1999)
Cerveja	Dinamarca	21/21	0,2 – 0,99	Jørgensen (1998)
Uvas secas	Reino Unido	286/301	0,1 – 40,8	Slayne (2001)
Vinho tinto	Reino Unido	28/50	0,1 – 1,0	Slayne (2001)
Carne e rins de suíno	Dinamarca	64/76	0,2 – 1,3	Jørgensen (1998)
Carne e rins de aves*	Dinamarca	73/149	0,2 – 0,99	Jørgensen (1998)

* Frango, peru, pato e ganso

O café é um substrato adequado para o desenvolvimento de fungos produtores de OTA; este fato está registrado em numerosos estudos ao longo das últimas três décadas. Levi et al. (1974) analisaram 335 amostras de café verde e encontraram 22 contaminadas com OTA, onde o limite de detecção do método analítico era ≥ 20 ng/g. As amostras positivas apresentaram concentração da toxina entre 20 e 360 ng/g. Com o aprimoramento dos níveis de detecção, Micco et al. (1989) analisaram 29 amostras de café verde coletadas em porto na Itália provenientes do Brasil, América Central e África e encontraram

58% de contaminação com teores de OTA entre 0,2 e 15 ng/g (limites de detecção 0,01 ng/g). Nakajima et al. (1997) analisaram 47 amostras de café verde provenientes da Ásia, África e América do Sul e encontraram 30% de contaminação em níveis entre 0,1 ng/g (limite de detecção) e 17,4 ng/g e localizadas somente nas amostras dos continentes africano e asiático. A incidência de OTA em café verde brasileiro foi estudada por Furlani (1998): em 84 amostras obtidas de seis estados produtores, 18 apresentaram contaminação por OTA com valores entre 1,7 e 147,5 ng/g (limite de detecção 0,7 ng/g). A importância da ocorrência de OTA em café verde oriundo nos continentes produtores podem ser vistos na tabela 4.

TABELA 4. Ocorrência de OTA em café verde de várias origens nos últimos três anos.

Origem	Ocorrência Positivos/total	Contaminação (ng/g)	Referências
África	42/51	0,2 – 62,0	Heilmann et al. (1999)
África	76/84	0,5 – 48	Romani et al. (2000)
América Central	6/15	0,2 – 0,8	Heilmann et al. (1999)
América do Sul	9/10	0,1 – 4,9	Trucksess et al. (1999)
América do Sul	5/17	0,2 – 1,0	Heilmann et al. (1999)
América Latina	19/60	0,1 – 7,7	Romani et al. (2000)
Ásia	11/18	0,2 – 4,9	Romani et al. (2000)
Ásia	20/29	0,2 – 4,9	Heilmann et al. (1999)

Brasil	17/37	0,2 – 6,24	Gollücke et al. (2001)
Brasil	27/132	0,7 – 47,8	Leoni et al. (2001)

Como se observa na tabela 4, o café verde de origem africana apresenta maior concentração de OTA do que os provenientes dos demais continentes produtores em pesquisas recentes. O café brasileiro também aparece com alta concentração de OTA segundo Leoni et al. (2001), embora apresente baixa incidência (cerca de 20% de positivos). Estes resultados não concordam com os de Gollücke et al. (2001) cuja amostragem apresentou baixa concentração da toxina no café brasileiro. A provável razão da discrepância é a origem das amostras analisadas por Gollücke et al., composta exclusivamente de café verde destinado à exportação.

5.2 Etapas de processamento de café verde susceptíveis à formação de OTA

As etapas de processamento do café estão esquematizadas na figura 2. A formação de OTA poderá ocorrer durante a secagem nas duas vias do processamento de café verde.

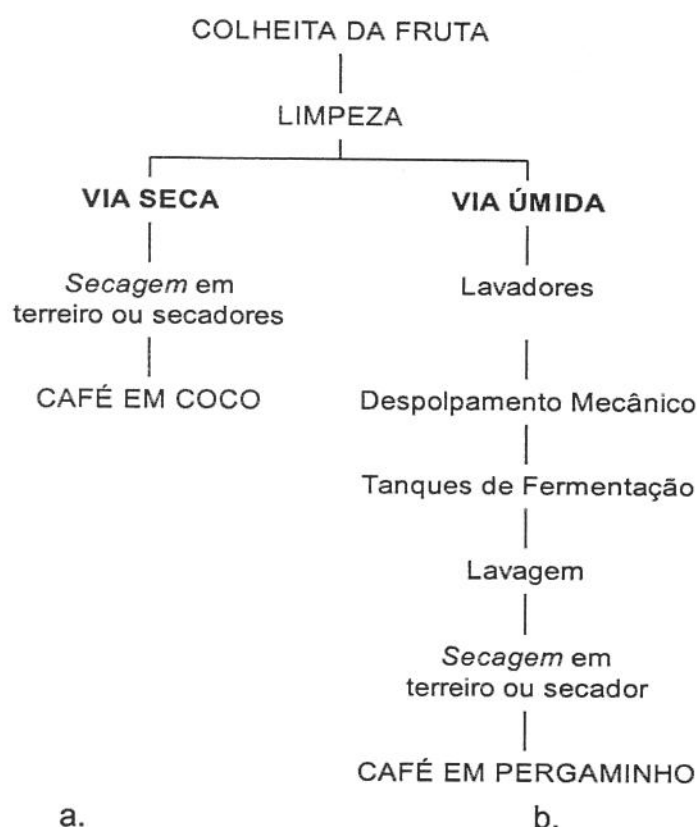


FIGURA 2. Despolpamento de café (a) pela via seca e (b) pela via úmida. (VINCENT, 1987).

Bucheli et al. (2000) investigaram a formação da toxina em café Robusta proveniente da Tailândia durante a secagem do fruto em três ensaios distintos: solo, concreto e mesa de bambu durante 20 dias. O teor de OTA no grão de café cru após a secagem foi baixo (média 0,2 ng/g) independente do piso estudado. Entretanto, o pericarpo que envolve o grão após a secagem, formando o “café coco”, apresentou contaminação irregular porém alta, chegando a 220 ng/g. Neste estudo foi relevante o grau de maturidade e integridade das cerejas do

café. Os autores concluíram que grãos danificados ou excessivamente maduros seriam mais susceptíveis ao desenvolvimento de OTA.

A avaliação microbiológica de café verde Robusta armazenado sob condições variadas, em relação à umidade e temperatura, na Tailândia não demonstrou correlação unívoca entre OTA versus umidade ou OTA versus condições precárias de armazenagem (BUCHELI et al., 1998). Os autores estudaram o efeito do armazenamento em silo industrial (sob ar-condicionado, aerado e não aerado) e em sacas (sob condições ambientais) por oito meses. OTA foi encontrada em todas as amostras analisadas durante o período de testes, com médias 4,5 ng/g (silo com ar-condicionado), 4,9 ng/g (silo aerado), 2,8 ng/g (silo não aerado) e 1,9 ng/g (sacas). Entretanto, não houve relação entre o teor de OTA e o tempo de estocagem, pois a concentração média inicial de toxina era 3,9 ng/g.

Teixeira et al. (2001) compararam os teores de OTA encontrados em 132 amostras de café verde retiradas de vários estágios do processamento de café verde proveniente de quatro fazendas nos estados de São Paulo e Minas Gerais. Os resultados apontaram o terreiro de secagem como o mais propício para a formação de OTA. Os autores identificaram alguns pontos críticos nesta etapa, observados nas fazendas analisadas: posição geográfica desfavorável, localizado em uma baixada hidrográfica muito afetada pelo orvalho matutino; ausência de periodicidade na movimentação do café no terreiro dificultando a exposição dos grãos ao sol e finalmente, altura da camada de café maior que a recomendada. Os autores apontaram que amostras cujos teores de OTA eram

mais elevados foram encontradas em fazendas onde as boas práticas agrícolas não eram praticadas.

5.3 Efeito do transporte (terrestre e marítimo) e armazenamento portuário na formação de OTA

O café é produzido, em geral, em regiões de planalto em países localizados nas zonas tropicais. No momento de exportação, o café verde (cru) parte da região produtora por transporte terrestre para o embarque sob três formas: em sacas de 60 kg dentro de contêineres, ou ensacado e conduzido em transporte aberto, ou a granel em contêiner protegido por embalagem plástica. O café é levado via marítima aos países importadores da América do Norte, Europa e Ásia. No porto de destino o café permanece nos contêineres durante o trâmite legal, sendo então transportado à indústria torrefadora.

Blanc et al. (2001) coletaram dados de umidade relativa e temperatura em três investigações. A primeira coleta, durante a armazenagem em um porto de destino no norte da Europa revelou a ocorrência de diversos períodos de condensação de vapor de água no espaço entre as sacas de café e o teto do contêiner, com longos períodos de umidade relativa acima de 85%.

A segunda fase do estudo avaliou as condições do transporte terrestre da região produtora até o porto de embarque, e o transporte marítimo até o porto de destino em condições de transporte aberto em sacas. Os autores observaram aumento importante de temperatura e umidade relativa no topo das sacas

durante o transporte terrestre, criando um ambiente propício à deterioração dos grãos. Durante o transporte marítimo não foi verificada situação crítica em relação aos parâmetros estudados.

A terceira fase do estudo foi similar à segunda. Neste caso, os parâmetros foram analisados em café a granel, transportado fechado dentro de contêiner até o porto de destino. Foi observado que durante o transporte terrestre ocorreriam condições extremas de umidade relativa e temperatura, porém sem condensação de vapor. Neste caso, o transporte marítimo e a estocagem no porto não foram situações críticas em relação aos parâmetros estudados.

O estudo de Blanc et al. (2001) indicou que a fase terrestre do transporte do café era a mais crítica para a formação de OTA. As diferenças climáticas entre os hemisférios contribuem para a variação da atividade de água dos grãos em transporte e conseqüentemente sobre a formação da toxina.

5.4. Processos para remover OTA do café cru

A seleção automática de grãos de café por método fotocromático, etapa usual no processamento de café verde para a eliminação de grãos defeituosos, mofados e pretos, foi testada por Heilmann (1999) para verificar a capacidade de eliminar grãos com OTA. Foi utilizado um equipamento de seleção cromática Elexso que utilizava a luz refletida na superfície do grão para detectar diferenças cromáticas. Ao final do procedimento obtinha-se duas categorias de grãos: os selecionados e os rejeitados. O teste foi realizado com 3 amostras cuja

concentração média era de 6,5 ng/g de OTA . Após a separação, os grãos selecionados apresentaram teor de OTA de 8,4 ng/g e os rejeitados 28,0 ng/g. O teor de 8,4 ng/g de OTA nos grãos selecionados mostrou, entretanto, que a presença de OTA não modifica necessariamente a estrutura e cor do grão de café verde. Este fato foi confirmado por Leoni et al. (2001) quando analisou 137 amostras de café brasileiro e não encontrou relação entre concentração de OTA e quantidade de defeitos, contados manualmente segundo a classificação oficial.

Outro método testado foi o tratamento com vapor. O seu uso em café verde é um processo facultativo utilizado em alguns países como a Alemanha para obtenção de cafés de sabor suave, através da remoção de compostos como o 3-metoxi-4-hidroxiestireno formado pela decomposição de ácidos do complexo do ácido clorogênico (CLARKE, 1987c). Heilmann et al. (1999) observou a redução da concentração média de OTA de 6,5 para 4,9 ng/g em 4 amostras retiradas de um lote de 3.500 kg de café verde submetido a vapor à 1,7 bar de pressão e 140°C por 40 minutos. Os resultados sugerem que o processo apresenta alguma eficiência, entretanto maior amostragem seria necessária para dimensionar a ação da vaporização.

Além da vaporização, outro processo utilizado para a obtenção de café com sabor suave é o *dewaxing*, utilizado mais freqüentemente na Alemanha. O processo consiste na remoção, através de solventes, de compostos responsáveis por determinados aromas indesejáveis, destacando-se o carboxi-5-hidroxitriptamida (C-5-HT) (CLARKE, 1987c). É um processo que utiliza os mesmos princípios da descafeinização, embora menos vigoroso. Heilmann et al.

(1999) investigou a eficiência deste processo na remoção da ocratoxina A. Três amostras de um lote de 3.000 kg foram analisadas quanto ao teor de OTA antes e após do processo de *dewaxing*. As amostras que continham nível de OTA em 6,2 ng/g, 4,7 ng/g e 8,7 ng/g antes do processo mostraram valores de 3,8 ng/g, 19,0 ng/g e 3,0 ng/g respectivamente após o tratamento com acetato de etila e vaporização à pressão de 1,27 bar e 118°C por 2 horas. Os resultados sugerem que o uso do solvente pode ter alguma eficiência na remoção de OTA, como citaremos mais adiante. O pequeno número de amostras investigados neste estudo e a inconsistência do resultado da segunda amostra não permitem avaliar mais profundamente a eficiência do processo.

6. A PREPARAÇÃO DO CAFÉ PARA O CONSUMO E O EFEITO SOBRE OTA

6.1 Torração, moagem e a resistência da OTA

A torração é um processo térmico no qual o café verde (cru) é submetido à temperatura entre 200-250°C por tempo variável, geralmente entre 5 e 15 minutos. Durante a torração ocorrem mudanças químicas com a formação de aromas e compostos com cor escura, e físicas, com perda de água e massa seca, principalmente gás carbônico e outros voláteis. A torração ocorre usualmente sob condições atmosféricas, sendo que a fonte de calor mais

comum é o ar quente obtido da combustão de gases ou outros compostos combustíveis (CLARKE, 1987d).

O processo de moagem consiste do fracionamento do grão torrado inteiro em partículas finas usualmente através de moedores de impacto. Quanto mais fina a moagem, melhor será a extração dos sólidos solúveis pela água e dos voláteis do café, embora a escolha do tamanho da partícula seja função do equipamento utilizado na extração da bebida (CLARKE, 1987d).

Até 1987 considerava-se que OTA era decomposta durante a torração e moagem dos grãos de café crus. A partir de então surgiram controvérsias sobre o efeito da torração e preparação da bebida e a resistência da toxina. As razões das discrepâncias podem ser devidas aos métodos experimentais de inoculação da OTA e à evolução dos métodos analíticos de detecção da toxina que em 1974 detectava a partir de 20 ng/g e hoje está abaixo de 0,2 ng/g (VIANI, 1996; PITTET et al., 1996; BLANC et al., 1998). A não homogeneidade de distribuição de OTA em amostras de café é um fator ainda muito intrigante e seguramente é o fator responsável pela discrepância dos resultados das pesquisas até hoje.

A tabela 5 apresenta estudos sobre a redução de OTA obtida após a torração de café registradas nas últimas duas décadas.

TABELA 5. Efeito da torração na redução de OTA

Nº. de amostras	Origem da toxina	Parâmetros de Torração	% de redução	Referências
4	Inoculação*	200°C/10-20 min	0 - 12	Tsubouchi et al. (1988)
2	natural**	5 – 6 min/torra escura	90 - 100	Micco et al. (1989)
3	natural	252°C/100-190 seg	14 - 62	Studer-Rohr et al. (1995)
2	inoculação	252°C/100-190 seg	2 - 28	Studer-Rohr et al. (1995)
6	natural	223°C / 14 min	84	Blanc et al. (1998)

* Os grãos de café foram inoculados com esporos de *Aspergillus ochraceus* e incubados.

** Grãos naturalmente contaminados.

Urbano et al. (2001) testaram 18 amostras de café arábica artificialmente contaminadas com OTA e submetidas às temperaturas de 200°C, 210°C, 220°C por 10 e 15 minutos. O nível de destruição foi distinto para cada binômio tempo/temperatura: a 200°C esteve entre 22 e 48%; a 210°C entre 39 e 65% e a 220°C entre 89 e 94%. Segundo os autores, a torração foi um procedimento efetivo na destruição de OTA nas condições estudadas dependendo do binômio tempo/temperatura adotados. Estes resultados de Urbano et al. e os dados da tabela 5 sugerem que tempo curto e temperatura baixa não favorecem a decomposição de OTA, ou seja, a temperatura deveria estar em torno de 220°C

e o tempo acima de 10 minutos. Na prática, porém, este binômio pode não produzir um produto sensorialmente aceitável para muitos consumidores.

6.2 Ocorrência de OTA em café torrado/moído

A presença de OTA em amostras comerciais de café torrado e moído foi detectada por primeira vez por Tsubouchi et al. (1988). Os autores analisaram 68 amostras comercializadas na cidade de Nagoya, Japão, em 1987, provenientes de vários países produtores na Ásia, África e América Latina e encontraram 5 amostras (7%) contaminadas em níveis entre 3,2 ng/g e 17,0 ng/g (limite de detecção: 2 ng/g). Studer-Rohr et al. (1995), analisaram 40 amostras de café torrado comercializado na Suíça quanto ao teor de OTA. Sete amostras (15%) apresentaram contaminação entre 0,2 e 1,8 ng/g.

A tabela 6 apresenta a incidência de OTA em café torrado e torrado/moído no período de 1996 a 2000 em vários países.

TABELA 6. Incidência de OTA em café torrado e torrado/moído

País de comercialização	Tipo de café	Ocorrência Positivos/total	Contaminação (ng/g)	Referências
Brasil (Campinas-SP)	Torrado e moído	23/34	0,3 – 6,5	Leoni et al. (2000)
Brasil (Belo Horizonte-MG)	Torrado e moído	41/47	0,99 – 5,87	Prado et al. (2000)

Estados Unidos	Torrado	9/13	0,1 – 1,2	Trucksess et al. (1999)
Dinamarca	Torrado	11/11	0,1 – 3,2	Jørgensen (1998)
Espanha	Torrado e moído	28/28	0,22 – 5,64	Burdespal e Legarda (1998)
Europa	Torrado e moído+solúvel	299/633	0,5 – 27,2	van d. Stegen et al. (1997)
Reino Unido	Torrado e moído	17/20	0,2 – 2,1	Patel et al. (1997)

6.3 Passagem de OTA para a bebida de café

A bebida de café é obtida a partir de um processo físico de extração sólido-líquido. As condições de contato (temperatura, pressão e tempo) são estabelecidas para que os constituintes solúveis do café sejam extraídos pela água na concentração requerida. As técnicas mais usuais de preparação da bebida são: filtração (percolação), infusão, fervura e decantação (café turco). Embora os métodos apresentem diferenças entre si, a temperatura da água varia entre 65°C e 120°C e o tempo de contato com o café varia entre 2 e 10 minutos (PICTET, 1987). A concentração de sólidos solúveis da bebida varia em

torno de 1%, entretanto este valor depende da preparação adotada e de hábitos e preferências culturais (CLARKE, 1988a).

A maioria dos estudos aponta a transferência de OTA para a bebida durante o processo de extração. Studer-Rohr et al. (1995) analisaram 40 amostras de bebida de café preparadas com café torrado/moído comercial pelo método de filtragem (filtro de papel) na proporção de 30g de café torrado/moído para 500 ml de água fervendo. A OTA foi detectada em 18 amostras de bebida, com concentração entre 0,4 e 7,8 ng por grama de café moído. Os autores também testaram a transferência a partir de café verde inoculado com OTA e concluíram que entre 25 e 50% da toxina foi encontrada na bebida, mesmo após a torração. Van d. Stegen et al. (1997) coordenaram um estudo envolvendo 9 laboratórios europeus em diferentes países, cada um utilizando o método local típico para a preparação da bebida. Os resultados mostraram transferência de 94% em média de OTA a partir de café torrado/moído (28% de coeficiente de variação).

Leoni et al. (2000) examinaram o efeito de dois métodos de preparação da bebida de café utilizados no Brasil quanto à permeação da OTA. Utilizando a filtração, cujo método consiste na adição de água fervendo ao pó previamente colocado dentro de um filtro de papel, houve transferência de 86% de OTA (15% de coeficiente de variação). Com o método tradicional, que consiste na fervura do pó de café em água e posterior filtração, observaram 74% de transferência da toxina (20% de coeficiente de variação).

Doze anos de investigação sobre a passagem da OTA durante o processo de obtenção da bebida não encerram a questão, porque Micco et al. (1989) não detectaram OTA em bebida preparada a partir amostras de café torrado artificialmente contaminado com 6 ng/g de toxina. A utilização de amostras contaminadas naturalmente versus contaminação artificial e a distribuição heterogênea de OTA nos grãos de café contribuem para a discrepância dos resultados.

6.4 Produção de café solúvel

A obtenção de café solúvel resulta de um processo complexo de extração de sólidos solúveis e de compostos voláteis a partir do café torrado/moído, seguido de secagem. O processo envolve baterias de percolação, onde o café torrado/moído é colocado em colunas estáticas paralelas e o fluxo de água quente passa por elas extraíndo os sólidos solúveis. A água, que é o solvente da operação, entra em contato com o café à temperatura de aproximadamente 100°C, embora a temperatura de alimentação da água no sistema alcance 180°C. O objetivo é obter um extrato com concentração de sólidos solúveis entre 15-25% que será seco em atomizadores ou liofilizadores até a umidade final de café solúvel entre 2 e 5% (CLARKE, 1987a,b).

Segundo Blanc et al. (1998), o processo de obtenção de café solúvel reduz o teor de OTA previamente encontrado no café verde original. Os autores observaram 13% de redução de OTA em relação ao café verde em estudo

realizado com 50 amostras de café robusta naturalmente contaminadas provenientes da Tailândia. A redução mais significativa de OTA na investigação de Blanc et al. ocorreu, entretanto, durante o processo de torração quando a concentração da toxina foi reduzida a 16% do nível presente no café cru (verde). Neste estudo, a torração foi um processo mais importante na destruição da toxina que a produção de solúvel.

A inclusão de pergaminho e cascas de café no processo de extração pode levar ao aumento de OTA no produto final (VIANI, 1996; PITTET et al., 1996), uma vez que usualmente são mais suscetíveis à contaminação (ver item 5.2). Esta prática é coibida pelos órgãos de fiscalização de alimentos em vários países.

A tabela 7 apresenta a incidência de OTA em café solúvel no período de 1996 a 2000.

TABELA 7. Incidência de OTA em café solúvel

País de comercialização	Tipo	Ocorrência Positivos/total	Contaminação (ng/g)	Referências
Brasil	Solúvel	8/10	0,31 – 1,78	Prado et al. (2000)
Brasil	solúvel	16/16	0,5 – 5,1	Leoni et al. (2000)
Espanha	solúvel	9/9	0,19 – 1,08	Burdaspal e Legarda

				(1998)
Reino Unido	solúvel	64/80	0,1 – 8,0	Patel et al.
				(1997)
Austrália	Solúvel	7/22	0,2 – 4,0	Pittet et al.
				(1996)
Estados Unidos	Solúvel	3/6	1,5 – 2,1	Pittet et al.
				(1996)
Alemanha	Solúvel	5/9	0,3 – 2,2	Pittet et al.
				(1996)

6.5 Descafeinização

O processo de descafeinização consiste na remoção da cafeína do café com o objetivo de minimizar seus efeitos fisiológicos. A operação de extração ocorre pelo contato do café verde previamente tratado com vapor a 120°C por 30 minutos com solventes apropriados, como diclorometano, acetato de etila, água ou dióxido de carbono supercrítico. As condições de extração, dependendo do método, requerem temperaturas do solvente entre 50 e 120°C, durante 8 à 10 horas de processo (KATZ, 1987).

Micco et al. (1989) submeteu uma amostra de 1 kg de café robusta verde naturalmente contaminada com 6 ng/g de OTA à descafeinização utilizando equipamentos industriais. A amostra sofreu tratamento com vapor e extração de

caféina com diclorometano. O teor de OTA após o processo revelou 60% de redução da toxina. Heilmann et al. (1999), submeteram 9.000 kg de café verde naturalmente contaminados à descafeinização com diclorometano. Três amostras do lote com concentração inicial de OTA 6,2, 4,7 e 8,7 ng/g apresentaram 75% de redução média da toxina ao final do processo.

São poucas as investigações publicadas e ainda é reduzido o número de amostras analisadas. Entretanto, é provável que a descafeinização seja um processo razoável na eliminação de OTA presente no café verde devido à afinidade da toxina por solventes orgânicos. Heilmann et al. (1999) citam patente registrada por Fabian M. em 1997 indicando redução no teor micotoxinas em café verde tratado com diclorometano e acetato de etila.

7. INGESTÃO MÁXIMA ACEITÁVEL

Em reunião realizada em fevereiro de 2001, o grupo constituído pelo *JECFA* (*Joint Expert Committee on Foods Additives* - órgão da Organização Mundial de Saúde) e pela *FAO*, concluiu que a ingestão semanal tolerável (*PTWI*) de OTA deveria ser mantida em 100 ng/kg de peso corpóreo/semana, valor estabelecido pelo mesmo comitê em 1995. O grupo concluiu que até o momento não foram identificados casos de intoxicação aguda em populações humanas comprovadamente relacionadas à ingestão de ocratoxina A (PITT, 2001).

Por outro lado, a União Européia, através do seu órgão de recomendação em alimentos o *SCF (Scientific Commission on Food)*, sugere que o nível de OTA nos alimentos seja mantido o mais baixo possível, ou seja, no intervalo entre 1,2 e 14 ng/kg de peso corpóreo/dia, preferencialmente “menor que 5 ng/kg corpóreo/dia” (equivalente a 35 ng/kg corpóreo / semana) (SLAYNE, 2001).

Na Inglaterra, a exposição humana a OTA através da dieta foi estudada em 1999, medindo-se a concentração da toxina da dieta, plasma e urina em 50 indivíduos. A exposição à toxina foi 0,26 a 3,54 ng/kg de peso corpóreo/dia, com valor médio de 0,94 ng/kg de peso corpóreo/dia; OTA foi detectada em todas as dietas. Houve correlação aceitável entre teor de OTA das dietas e o encontrado na urina e plasma (MACDONALD et al., 2001). Embora a toxina estivesse presente em todas as dietas, a exposição humana média desta população de 50 indivíduos estava dentro do limite recomendado pelo *SCF*.

Em investigação conjunta de países da Comunidade Européia constatou-se que a ingestão de OTA estava entre 0,7 e 4,7 ng/kg de peso corpóreo/dia, com média 0,8 ng/kg de peso corpóreo/dia. Os cereais e seus derivados foram os alimentos que introduziram maior quantidade de OTA à dieta (VIANI, 1996). Na atualidade, a exposição à OTA está demonstrando valores considerados seguros, ou seja, abaixo de 5 ng/kg de peso corpóreo/dia.

As pesquisas recentes apontam que os cereais (ver tabela 3) são os maiores responsáveis pela presença de OTA na dieta; o café acrescenta menos de 10% à ingesta aceitável recomendada pelo *SCF*. A tabela 8 mostra a

exposição humana a OTA através do consumo de café mensurada no último quinquênio em alguns países. A ingesta média está dentro da máxima recomendada pelo SCF.

TABELA 8. Exposição humana a OTA através do consumo de café (dados de 1995 a 2000).

País	Ingestão média ng/kg de peso corpóreo/dia	Referências
Brasil	0,4	Leoni et al. (2000)
Espanha	0,2	Burdaspal e Legarda (1998)
Dinamarca	0,2	Jørgensen (1998)
Reino Unido	0,3	Patel et al. (1997)
União Européia	0,3	van. d. Stegen et al. (1997)
Vários	0,03	Pittet et al. (1996)
Suíça	0,4	Studer-Rohr et al. (1995)

Ingestão máxima total de OTA recomendada: 5 ng/kg corpóreo/dia (SCF)

8- LEGISLAÇÃO E MEDIDAS PREVENTIVAS

Não há legislação comum adotada pela Comunidade Européia, América do Norte ou Mercosul, estabelecendo limites máximos específicos para a presença de OTA em alimentos. Segundo a FAO são 11 os países que adotaram limites máximos de OTA para alguns alimentos, sobretudo cereais e

derivados em níveis que variam entre 0 à 50 ppb (ng/g). O Brasil no momento não possui legislação específica para a incidência de OTA em alimentos. A tabela 9 apresenta os limites máximos permitidos para OTA em alimentos nos países onde são adotados.

TABELA 9. Limites máximos permitidos para OTA em alimentos.

País	Produtos	Limite (ng/g)
Uruguai	Arroz, cevada, milho	50,0
Israel	Cereais, legumes e derivados	50,0
Dinamarca	Rins de suínos	25,0
Grécia	Suco e produtos de maçã	20,0
Rep. Checa	Alimentos	20,0
Romênia	Alimentos	5,0
Dinamarca	Cereais e derivados	5,0
França	Cereais	5,0
Itália	Cereais e derivados	3,0
Suíça	Cereais	2,0
Itália	Carne de porco e derivados	1,0
Chipre	Leite e laticínios	0,5
Itália	Cacau e derivados	0,5
Itália	Cerveja	0,2
Hungria	Alimentos preservados	0

Fonte: *FAO* (1997).

O SCF (*Scientific Commission on Food*) solicitou ao órgão legislador da Comunidade Européia que imponha um limite máximo para OTA em cereais (5 ng/g) e derivados (3 ng/g) assim como em produtos secos de uvas (10 ng/g). Quanto ao café, vinho, cerveja, suco de uvas, cacau/derivados e condimentos, há um prazo até 31 de dezembro de 2003 para analisar o aporte de OTA destes alimentos na dieta humana (*Commission Regulation EC*, 2002). Alguns países já adotam isoladamente um limite máximo para OTA específico para café verde e/ou seu produto final, em níveis que estão entre 4 e 50 ng/g (tabela 10).

TABELA 10. Limites máximos permitidos para OTA em café.

País	Produtos	Limite (ng/g)	Referências
Uruguai	Café	50,0	FAO (1997)
Grécia	Café verde	20,0	FAO (1997)
Finlândia	Café verde	10,0	Food Standards (2001)
Itália	Café verde	8,0	Food Standards (2001)
Suíça	Café torrado/moído e solúvel	5,0	Heilmann et al. (1999)
Itália	Café torrado/moído e solúvel	4,0	Food Standards (2001)

O crescente número de países adotando limites sanitários para OTA poderá gerar um impacto econômico em países produtores e consumidores

(BOUTRIF e BESSY, 2001). No caso do café, países produtores significam países de economia frágil, cujas perdas econômicas repercutem com severidade. Segundo resultados do estudo coordenado pela FAO "*On Improving Coffee Quality Through Prevention of Mould Formation*", se a Comunidade Européia estabelecer limite máximo de OTA em 5 ppb para café verde, 7% das amostras do estudo da FAO seriam rejeitadas. Extrapolando estes resultados à produção mundial, poderiam ser estimadas perdas de mais de 1 bilhão de dólares anuais pelos países produtores. Adicionalmente, a Comunidade Européia contabilizaria gastos em análises laboratoriais avaliados em 500 milhões de dólares anuais (BOUTRIF e BESSY, 2001).

Segundo LÓPEZ-GARCÍA (2001) e FRANK (2001), o método *HACCP* (*Hazard Analyses and Critical Control Points*) seria eficiente no controle dos pontos críticos da produção de café tais como colheita, secagem e armazenagem, evitando a formação da toxina e as perdas econômicas proveniente da eventual rejeição de lotes. Ainda segundo López-García (2001) os objetivos da aplicação do *HACCP* serão adequados para evitar a formação de toxinas, reduzir e eliminar aquelas que já se encontram nos alimentos e desviar os alimentos irreversivelmente contaminados para outros usos em vez do consumo.

Está em andamento um programa da FAO intitulado "*Mould Reduction Project in Selected Coffee-Producing Countries*" visando prevenção da formação de fungos no café e melhoria de qualidade sensorial (VIANI e CLARKE, 2001). O Brasil e mais seis países, Colômbia, Costa do Marfim, Índia, Indonésia, Quênia e

Uganda, participam do projeto com duração de quatro anos e perseguem os seguintes objetivos:

- Identificação dos pontos críticos de controle na formação de fungos na cadeia produtiva e de processamento de café.
- Identificação dos fungos produtores de OTA e as condições de produção de toxina.
- Capacitação de laboratórios, metodologias e pessoal nos países participantes do programa.
- Desenvolvimento e teste de sistemas *HACCP*.

9- CONCLUSÃO

A ocratoxina A é um contaminante conhecido de cereais em países da Europa. Sua incidência no café tem sido investigada com mais ênfase ultimamente devido à intenção da Comunidade Européia em impor limites sanitários ao produto, embora sua contribuição à ingesta total de OTA seja minoritária.

A preocupação em minimizar a ocorrência de OTA nos alimentos é justificável, uma vez que sua toxicidade está estabelecida: a OTA mostrou ação inibitória sobre enzimas e respiração mitocondrial, ação imuno supressora e estimuladora de peroxidação lipídica, ação teratogênica, mutagênica e carcinogênica, além de estar relacionada a nefropatias endêmicas em animais e humanos.

Não há um método de detoxicação para OTA que seja efetivo e comercialmente viável; a eficácia da torração comercial do café na destruição da toxina ainda é discutível. No momento, a melhor forma de minimizar a ocorrência de OTA no café é evitar sua formação, principalmente durante a secagem quando determinadas condições de temperatura e atividade de água favorecem sua formação pelos fungos.

Apesar das investigações mostrarem que a exposição da população europeia a OTA está em um nível considerado seguro, e que o café contribui com menos de 10%, a adoção de barreiras sanitárias já está ocorrendo, podendo acarretar prejuízos aos países produtores e levando à necessidade de validar laboratórios e treinar técnicos para a detecção da toxina. A prevenção, portanto, é a forma mais simples de lidar com o problema da OTA em café, através do controle dos pontos críticos que levam à sua formação.

10- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BACHA, H.; MAAROUFI, K.; ACHOUR, A. et al. Ochratoxines et ochratoxicoses humaines en Tunisie. In: COLLOQUE INSERM. **Human ochratoxicosis and its pathologies**. Ed. E.E. Creepy, M. Castegnaro, g. Dirheimer. Bordeaux. 1993. v.231, p.111-121.

BITTENCOURT, A. M.; FARIAS, A. X.; CORRÊA, T. B. S. et al. Toxigenic potencial of *Aspergillus ochraceus* from irrigated Brazilian Cerrado coffee. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON COFFEE SCIENCE, 19th, 2001, Trieste. **Workshop on Moisture Management for Mould Prevention**. Trieste, 2001.

BLANC, M.; PITTET, A.; MUÑOZ-BOX, R. et al. Behavior of ochratoxin A during green coffee roasting and soluble coffee manufacture. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.46, p.673-675, 1998.

BLANC, M.; VUATAZ, G.; HILCKMANN, L. Green Coffee Transport Trials. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON COFFEE SCIENCE, 19th, 2001, Trieste. **Workshop on Moisture Management for Mould Prevention**. Trieste, 2001.

BOULDRA, H.; LE BARS, P.; LE BARS, J. Thermoestability of ochratoxin A in wheat under two moisture conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.61, p.1156-1158, 1995.

BOUTRIF, E.; BESSY, C. Global Significance of Mycotoxins and Phycotoxins. In: **Mycotoxins and Phycotoxins in Perspective at the Turn of the Millennium**. Proceedings of the X INTERNATIONAL IUPAC SYMPOSIUM ON MYCOTOXINS AND PHYCOTOXINS, 2000, Guarujá. Wageningen: Ed. W.J. de Koe; R.A. Samson; H.P. van Egmond et al. 2001. p.3-16.

BRERA, C.; MIRAGLIA, M.; CAVA E. et al. Ochratoxin A in human milk: Exposure assessment of babies. In: **Mycotoxins and Phycotoxins in Perspective at the Turn of the Millennium**. Proceedings of the Xth INTERNATIONAL IUPAC SYMPOSIUM ON MYCOTOXINS AND PHYCOTOXINS, 2000, Guarujá. Wageningen: Ed. W.J. de Koe; R.A. Samson; H.P. van Egmond et al. 2001. p.201-207.

BUCHELI, P.; MEYER, I.; PITTET, A. et al. Industrial Storage of Green Robusta Coffee under Tropical Conditions and Its Impact on Raw Material Quality and Ochratoxin A Content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.46, p.4507-4511, 1998.

BUCHELI, P.; KANCHANOMAI, C.; MEYER, I. et al. Development of ochratoxin A during Robusta (*Coffea canephora*) coffee cherry drying. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.48, p.1358-1362, 2000.

BURDASPAL, P. A.; LEGARDA, T. M. Ochratoxina A en Muestras de Café Comercializado en España. **Alimentaria**, Madrid, p.31-35, out. 1998.

COMMISSION REGULATION (EC) n. 466/2001. **Amending regulation setting maximum levels for certain foodstuffs**. Commission of the European Communities. Brussels, 2002.

CLARKE, R.J. Extraction. In: CLARKE, R.J.; MACRAE, R. **Coffee Technology**. Essex: Elsevier Applied Science, 1987a. p.109-145.

CLARKE, R.J. Drying. In: CLARKE, R.J.; MACRAE, R. **Coffee Technology**. Essex: Elsevier Applied Science, 1987b. p.147-199.

CLARKE, R.J. Grading, storage, pre-treatment and blending. In: CLARKE, R.J.; MACRAE, R. **Coffee Technology**. Essex: Elsevier Applied Science, 1987c. p.35-58.

CLARKE, R.J. Roasting and Grinding. In: CLARKE, R.J.; MACRAE, R. **Coffee Technology**. Essex: Elsevier Applied Science, 1987d. p.73-107.

CREEPY, E.E.; STORMER, F.C.; RÖSCHENTHALER, R. et al. Effects of two metabolites of ocratoxin A, (4R)-4-hydroxyochratoxin A and ochratoxin α , on immune response in mice. **Infection and Immunity**. Washington, v.39, n.3, p.1015-1018, 1983.

CREEPY, E.E.; CASTEGNARO, M.; GROSSE, Y. et al. Etude de l'ochratoxicose humaine dans trois régions de France: Alsace, Aquitaine et région Rhône-Alpes. In: COLLOQUE INSERM. **Human ochratoxicosis and its pathologies**. Ed. E.E. Creepy, M. Castegnaro, g. Dirheimer. Bordeaux. 1993. v.231, p.147-158.

CREPPY, E. E.; BAUDRIMONT, I.; BELMADANI, A. et al. Aspartame as a preventive agent of chronic toxic effects of ochratoxin A in experimental animals. **Food Additives and Contaminants**, London, v.13, suplem., p.51-52, 1996.

DEBERGHES, P.; DEFFIEUX, G.; GHARBI, A. et al. Détoxification de l'ochratoxine A par des méthodes physiques, chimiques et enzymatiques. In: COLLOQUE INSERM. **Human ochratoxicosis and its pathologies**. Ed. E.E. Creepy, M. Castegnaro, g. Dirheimer. Bordeaux. 1993. v.231, p.75-82.

DIRHEIMER, G. Mechanistic approaches to ochratoxin toxicity. **Food Additives and Contaminants**, London, v.13, suplem., p.45-48, 1996.

FAO Food and Nutrition Paper N. 64. **Worldwide Regulations for Mycotoxins**, 1995. Roma, 1997.

FERRUFINO, E. V.; TANGNI, E. K.; PONCHAUT, S. et al. Lactation transfer of ochratoxin A in rabbits fed a naturally contaminated diet. In: **Mycotoxins and Phycotoxins in Perspective at the Turn of the Millennium**. Proceedings of the Xth INTERNATIONAL IUPAC SYMPOSIUM ON MYCOTOXINS AND PHYCOTOXINS, 2000, Guarujá. Wageningen: Ed. W.J. de Koe; R.A. Samson; H.P. van Egmond et al. 2001. p.173-180.

FOOD STANDARDS AGENCY. www.foodstandards.gov.uk/food_surv.htm
Londres.

FRANK, J. M. Development of critical control points for preventing ochratoxin A accumulation in coffee. In: **Mycotoxins and Phycotoxins in Perspective at the Turn of the Millennium**. Proceedings of the Xth INTERNATIONAL IUPAC SYMPOSIUM ON MYCOTOXINS AND PHYCOTOXINS, 2000, Guarujá. Wageningen: Ed. W.J. de Koe; R.A. Samson; H.P. van Egmond et al. 2001. p.289-298.

FURLANI, R. P. Z. **Ochratoxina A em café brasileiro**. Campinas: 1998. 61p. Tese (Mestre em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

GILBERT, J. Occurrence significance, sampling and analysis. **Ochratoxin A in Coffee Workshop**. CSL York. 1999.

GOLLÜCKE, A.P.B.; TANIWAKI, M.H. TAVARES, D.Q. Occurrence of ochratoxin A in raw coffee for export from several producing regions in Brazil. In: 19th INTERNATIONAL CONFERENCE ON COFFEE SCIENCE, 2001, Trieste. **Workshop on Moisture Management for Mould Prevention**. Trieste, 2001.

HADLOK, R.M. Human ochratoxicosis in Germany updating 1993. In: COLLOQUE INSERM. **Human ochratoxicosis and its pathologies**. Ed. E.E. Creepy, M. Castegnaro, g. Dirheimer. Bordeaux. 1993. v.231, p.141-145.

HAUBECK, H.D; LORKOWSKI, G.; KÖLSCH, E.; RÖSCHENTHALER, R. Immunossupression by ochratoxin A and its prevention by phenylalanine. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.41, p.1040-1042, 1981.

HEILMANN, W.; REHFELDT, A. G.; ROTZOLL, F. Behaviour and reduction of ochratoxin A in green beans in response to various processing methods. **European Food Research Technology**, Berlin, 209, p.297-300, 1999.

HÖHLER, D. Ochratoxin A in food and feed: occurrence, legislation and mode of action. **Zeitschrift für Ernährungswissenschaft**, v.37, n.1, p. 2-12, 1998.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS - ICMSF. 1996. **Microorganisms in Foods 5**. London: Blackie Academic & Professional. 513 p.

JØRGENSEN, K. Survey on pork, poultry, coffee, beer and pulses for ochratoxin A. **Food Additives and Contaminants**, London, v.15, n.5, p.550-554, 1998.

KATZ, S.N. Decaffeination of Coffee. In: CLARKE, R.J.; MACRAE, R. **Coffee Technology**. Essex: Elsevier Applied Science, 1987. p.59-71.

KHALEF, A.; ZIDANE, C.; CHAREF, A. et al. Ochratoxicose humaine en Algérie. In: COLLOQUE INSERM. **Human ochratoxicosis and its pathologies**. Ed. E.E. Creepy, M. Castegnaro, g. Dirheimer. Bordeaux. 1993. v.231, p.123-127.

KROGH, P. Ochratoxins in Food. In: Edit. Palle Krogh. **Mycotoxins in Food**. London: Academic Press, 1987. 97-121.

KUIPER-GOODMAN, T.; OMINSKI, K.; MARQUARDT, R.R. et al. Estimating human exposure to ochratoxin A in Canada. In: COLLOQUE INSERM. **Human ochratoxicosis and its pathologies**. Ed. E.E. Creepy, M. Castegnaro, g. Dirheimer. Bordeaux. 1993. v.231, p.167-174.

KUIPER-GOODMAN, T. Risk assessment of ocratoxin A: na update. **Food Additives and Contaminants**, London, v.13, suplem., p.53-57, 1996.

LEONI, L. A. B.; FURLANI, R. P.Z.; VALENTE SOARES, L. M. et al. Ochratoxin A in brazilian roasted ans instant coffee. **Food Additives and Contaminants**, London, v.17, n.10, p.867-870, 2000.

LEONI, L. A. B.; FURLANI, R. P.Z.; VALENTE SOARES, L. M. et al. Ochratoxin A in Brazilian Green Coffee. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 21, n.1, p.105-107, 2001.

LEVI, C.P.; TRENK, H.L. e MOHR, H.K. Study of the occurrence of ochratoxin A in green coffee beans. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, Baltimore, v.57, n.4, p.866-870, 1974.

LOPEZ-GARCIA, R. Mycotoxin management: an integrated approach In: **Mycotoxins and Phycotoxins in Perspective at the Turn of the Millennium**. Proceedings of the Xth INTERNATIONAL IUPAC SYMPOSIUM ON MYCOTOXINS AND PHYCOTOXINS, 2000, Guarujá. Wageningen: Ed. W.J. de Koe; R.A. Samson; H.P. van Egmond et al. 2001. p.261-269.

MacDONALD, S. J.; LANGTON, S.; BRERETON P. A. Assesment of Human Exposure to ochratoxin A in the UK-relationship between dietary intake and

plasma and urine levels. In: **Mycotoxins and Phycotoxins in Perspective at the Turn of the Millennium**. Proceedings of the Xth INTERNATIONAL IUPAC SYMPOSIUM ON MYCOTOXINS AND PHYCOTOXINS, 2000, Guarujá. Wageningen: Ed. W.J. de Koe; R.A. Samson; H.P. van Egmond et al. 2001. p.181-188.

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

MAYURA, K.; PARKER, R.; BERNDT, W.; PHILLIPS, T.D. Ochratoxin A-induced teratogenesis in rats: partial protection by phenylalanine. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.48, n.6, p.1186-1188, 1984.

MEISNER, H. e SELANIK, P. Inhibition of renal gluconeogenesis in rats by ochratoxin. **Biochemical Journal**, London, v.180, p. 681-684, 1979.

MEISNER, H. e MEISNER P. Ochratoxin A, an in vivo inhibitor of renal phosphoenolpyruvate carboxykinase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v.208, n.1, p.146-153, 1981.

MEISNER, H.; CIMBALA, M.A. e HANSON, R.W. Decrease of renal phosphoenolpyruvate carboxykinase RNA e poly(A)+ RNA level by ochratoxin A. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v.223, n.1, p.264-270, 1983.

MICCO, C.; GROSSI, M.; MIRAGLIA, M.; BRERA, C. A study of the contamination by ochratoxin A of green and roasted coffee beans. **Food Additives and Contaminants**, London, v.6, p. 333-339, 1989.

MISLIVEC, P.B.; BRUCE, V.R.; GIBSON, R. Incidence of toxigenic and other molds in green coffee beans. **Journal of Food Protection**. Des Moines, v.46, n.11, p.969-973, 1983.

MOSS, M.O. Food Mycology. In: Edit. by Palle Krogh. **Mycotoxins in Food**. London: Academic Press. 1987. p 3-34.

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

NAKAJIMA, M.; TSUBOUCHI, H.; MIYABE, M. et al. Survey of aflatoxin B1 and ochratoxin A in commercial green coffee beans by high-performance liquid chromatography linked with immunoaffinity chromatography. **Food and Agricultural Immunology**, Norwich, v.9, p. 77-83, 1997.

OMAR, R.F.; HASINOFF, B.B.; MEJILLA, F. Et al. Mechanism of ochratoxin A stimulated lipid peroxidation. **Biochemical Pharmacology**. Oxford, v.40, n.6, p.1183-1191, 1990.

PALÁCIOS-CABRERA, H. A.; TANIWAKI, M. H.; MENEZES, H.C. et al. Optimization of *Aspergillus ochraceus* inoculation in coffee for isothermal studies, simulating storage and maritime transport of raw coffee. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON COFFEE SCIENCE, 19th, 2001, Trieste. **Workshop on Moisture Management for Mould Prevention**. Trieste, 2001.

PATEL, S.; HAZEL, C. M.; WINTERTON, A. G. M. et al. Survey of ochratoxin A in UK retail coffees. **Food Additives and Contaminants**, London, v.14, n.3, p.217-222, 1997.

PFOHL-LESZKOWICZ, A.; GROSSE, Y.; KANE, A. et al. Differential DNA adduct formation and disappearance in three mouse tissues after treatment with mycotoxin ochratoxin A. **Mutation Research**, Amsterdam, n.289, p.265-273, 1993.

PICTET, G. Home and cathering brewing of coffee. In: CLARKE, R.J.; MACRAE, R. **Coffee Technology**. Essex: Elsevier Applied Science, 1987. p.221-256.

PITT, J.I. **Funghi and Food Spoilage**. Sydney: Academic Press. 1985. 413 p.

PITT, J.I.; TANIWAKI, M.H.; TEIXEIRA, A.A. et al. Distribution of *Aspergillus ochraceus*, *A. niger* and *A. carbonarius* in coffee in four regions of Brazil. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON COFFEE SCIENCE, 19th, 2001, Trieste. **Workshop on Moisture Management for Mould Prevention**. Trieste, 2001.

PITT, J.I. The importance of ochratoxin A in foods: report on the 56th meeting of JECFA, Geneva, February, 2001. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON COFFEE SCIENCE, 19th, 2001, Trieste. **Abstracts**. Trieste, 2001.

PITTET, A.; TORNARE, D.; HUGGETT, A. et al. Liquid chromatographic determination of ochratoxin A in pure and adulterated soluble coffee using an immunoaffinity column cleanup procedure. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.44, n.11, p.3564-3569, 1996.

PITTET, A. Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds: a decade in review. In: **Mycotoxins and Phycotoxins in Perspective at the Turn of the Millennium**. Proceedings of the Xth INTERNATIONAL IUPAC SYMPOSIUM ON MYCOTOXINS AND PHYCOTOXINS, 2000, Guarujá. Wageningen: Ed. W.J. de Koe; R.A. Samson; H.P. van Egmond et al. 2001. p.153-172.

PRADO, G.; OLIVEIRA, M.S.; ABRANTES, F.M. et al. Incidência de ocratoxina A em café torrado e moído e café solúvel consumido na cidade de Belo Horizonte, MG. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v.20, n.2, p. 192-196, 2000.

RADIC, B.; FUCHS, R.; PERAICA, M. et al. Ochratoxin A in human sera in the area with endemic nephropathy in Coratia. **Toxicology Letters**. Irlanda, v.91, p.105-109, 1997.

RAHIMTULA, A.D.; BÉRÉZIAT, J.C.; BUSSACCHINI-GRIOT; et al. Lipid peroxidation as a possible cause of ochratoxin A toxicity. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v.37, n.23, p. 4469-4477, 1988.

ROMANI, S.; SACCHETTI, G.; LÓPEZ, C.C. et al. Screening on the occurrence of ochratoxin A in green coffee beans of different origins and types. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.48, p.3616-3619, 2000.

SANSING, G.A.; DAVIS, N.D.; DIENER, U.L. Effect of time and temperature on ochratoxin A production by *Aspergillus ochraceus*. **Canadian Journal of Microbiology**. v.19, p.1259-1263, 1973.

SCOTT, P. M. Effects of processing and detoxification treatments on ochratoxin A: introduction. **Food Additives and Contaminants**, London, v.13, suplem., p.19-21, 1996.

SLAYNE, M. A. Ochratoxin A in food in the UK. In: **Mycotoxins and Phycotoxins in Perspective at the Turn of the Millennium**. Proceedings of the Xth INTERNATIONAL IUPAC SYMPOSIUM ON MYCOTOXINS AND PHYCOTOXINS, 2000, Guarujá. Wageningen: Ed. W.J. de Koe; R.A. Samson; H.P. van Egmond et al. 2001. p.143-149.

STANDER, M.A.; BORNSCHEUER, U.T.; HENKE, E. et al. Screening of commercial hydrolases for the degradation of ochratoxin A. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.48, p.5736-5739, 2000.

STROBEL, R. G. K. Allergens and Mould Toxin Contaminants. In: CLARKE, R.J.; MACRAE, R. **Coffee Physiology**. Essex: Elsevier Applied Science, 1988. p.388.

STUDER-ROHR, I.; DIETRICH, D.R.; SCHLATTER, J. et al. The occurrence of ochratoxin A in coffee. **Food Chemistry and Toxicology**, London, v.33, n.5, p.341-355, 1995.

STEYN, P.S.; HOLZAPFEL, C.W.; FERREIRA, N.P. The biosynthesis of the ochratoxins, metabolites of *Aspergillus ochraceus*. **Phytochemistry**. London, v.9, n.9, p.1977-1983, 1970.

STEYN, P.S. Ochratoxin A: its chemistry, conformation and biosynthesis. In: COLLOQUE INSERM. **Human ochratoxicosis and its pathologies**. Ed. E.E. Creepy, M. Castegnaro, g. Dirheimer. Bordeaux. 1993. v.231, p.51-58.

SUBIRADE, I. Fate of ochratoxin A during breadmaking. **Food Additives and Contaminants**, London, v.13, suplem., p.25-26, 1996.

TANIWAKI, M.H.; PITT, J.I.; URBANO, G.R. et al. Funghi producing ochratoxin A in coffee. In: **INTERNATIONAL CONFERENCE ON COFFEE SCIENCE**, 18th, Helsinki. 1999 p.239-247.

TANIKAWI, M. H.; URBANO, G.R.; CABRERA-PALÁCIOS, H.A. et al. Influence of water activity on mould growth and ochratoxin A production in coffee. In: **INTERNATIONAL CONFERENCE ON COFFEE SCIENCE**, 19th, 2001, Trieste. **Workshop on Moisture Management for Mould Prevention**. Trieste, 2001.

TEIXEIRA, A.A.; TANIWAKI, M.H.; PITT, J.I. et al. The presence of ochratoxin A in coffee due to local conditions and processing in four regions of Brazil. In: **INTERNATIONAL CONFERENCE ON COFFEE SCIENCE, 19th**, 2001, Trieste. **Workshop on Moisture Management for Mould Prevention**. Trieste, 2001.

TRUCKSESS, M. W.; GILER, J.; YOUNG, K. et al. Determination and survey of ochratoxin A in wheat, barley and coffee-1997. **Journal of AOAC International**, Baltimore, v.82, n.1, 1999.

TSUBOUCHI, H.; TERRADA, H.; YAMAMOTO, K. et al. Ochratoxin A found in commercial roast coffee. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Washington, v.36, p.540-542, 1988.

UENO, Y.; MAKI, S.; LIN, J. et al. A 4-year study of plasma ochratoxin A in a selected population in Tokyo by immunoassay and immunoaffinity column-linked HPLC. **Food and Chemical Toxicology**, Elmsford, v.36, p.445-449, 1998.

URBANO, G.R., LEITÃO, M.F.F.; VICENTINI, M.C. et al. Preliminary studies on the destruction of ochratoxin A in coffee during roasting. In: **INTERNATIONAL CONFERENCE ON COFFEE SCIENCE, 19th**, 2001, Trieste.

van d. STEGEN, G.; JÖRISSEN, U.; PITTET, A. et al. Screening of European coffee final products for occurrence of ochratoxin A (OTA). **Food Additives and Contaminants**, London, v.14, n.3, p.211-216, 1997.

VAN EGMOND, H. P. Analytical methodology and regulations for ochratoxin A. **Food Additives and Contaminants**, London, v.13, suplem., p.11-13, 1996.

VARGA, J.; RIGÓ, K.; TERÉN, J. Degradation of ochratoxin A by *Aspergillus* species. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.59 p.1-7, 2000.

VEGA, F. e MERCADIER, G. Insects, coffee and ochratoxin A. **Florida Entomologist**, v.81, n.4, 1998.

VIANI, R. Fate of ochratoxin A during processing of coffee. **Food Additives and Contaminants**, London, v.13, suplem., p.5-9, 1996.

VIANI, R. CLARKE, R. CFC/ICO/FAO Mould reduction project in selected coffee-producing countries. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON COFFEE SCIENCE, 19th, 2001, Trieste. **Workshop on Moisture Management for Mould Prevention**. Trieste, 2001.

VINCENT, J. C. Green Coffee Processing. In: CLARKE, R.J.; MACRAE, R. **Coffee Technology**. Essex: Elsevier Applied Science, 1987. p.1-33.

Parte 4 ARTIGO DE PESQUISA

(A ser submetido à Food Additives and Contaminants)

Incidence of ochratoxin A in Brazilian raw coffee destined for export

A. B. Pittelli-Gollücke, M. H. Taniwaki, D. Q. Tavares

Abstract

The presence of ochratoxin A (OTA) in foods has led some countries to establish regulatory limits. Although coffee is not a major source of OTA in human consumption, the European Community (EC) may establish limit for this toxin in coffee in the near future. Such measures may affect producing countries, generating large economic losses. This study analysed the OTA content in 37 samples of Brazilian raw coffee from various regions for the export market. The results showed an OTA content ranging from < 0.2 ng/g to 0.85 ng/g with an average of 0.16 ng/g. One sample showed a content of 6.24 ng/g. Twenty samples (54%) presented OTA levels below the detection limit of 0.2 ng/g, while 97.5% of the samples showed OTA concentrations below 5 ng/g and 100% were below 8 ng/g. Five samples were then divided into two sub-samples: one of *sound* beans and the other of *defective beans* (*black* and *sour* beans) and tested for OTA. The toxin content of *sound* bean samples ranged from 0.22 to 0.80 ng/g (average 0.46 ng/g) and that for *defective* sample from 0.42 to 17.46 (average 4.52 ng/g). No morphological differences in the endosperm of *sound*, *black* and *sour* beans were observed under optical microscopy. One *black* bean depicted the presence of mould and spores on observation under a Scanning Electron

Microscope (SEM). According to this investigation, Brazilian green coffee for export complies with most of the proposed limits.

Keywords: coffee, export, Brazil, ochratoxin A

Introduction

Ochratoxin A (OTA) is a nephrotoxic and possible carcinogenic mycotoxin mostly found in cereals and cereal products in Europe. It is produced by some species of *Aspergillus* and *Penicillium* as a secondary metabolite. Ochratoxin A inhibits protein synthesis both *in vitro* and *in vivo* through competition with phenylalanine and it was also found to increase lipid peroxidation, leading to further cell and mitochondrial damage (Dirheimer, 1996). Due to health concerns, the FAO/WHO Joint Expert Committee on Food Additives and Contaminants (JECFA) established a provisional tolerable weekly intake of 100 ng / kg body weight (bw) (JECFA, 1995). Moreover, the EC Scientific Committee on Food (SCF) recommends that levels of OTA should be reduced as much as possible, i.e., 'below 5 ng/kg bw / day'.

Reports have shown OTA incidence in other foodstuffs such as wine (MAFF, 1999), beer (Jørgensen, 1998), cocoa (MAFF, 1999), dried wine fruits (MAFF, 1999) and green and roasted coffee (Patel et al., 1997; Trucksess et al., 1997). Although a minor contributor to the dietary intake of OTA, coffee has received special attention in the last few years (Pittet, 2001). As a consequence, some countries such as Italy, Switzerland, Finland and Greece have set regulatory

limits with maximum OTA values ranging from 4 to 20 ppb (ng/g). The EC might establish a limit in the near future.

According to estimates of the Institute for Scientific Information on Coffee (ISIC) implemented by FAO, if the EC establishes a regulation for OTA on the proposed level (5 ppb), 7% of coffee batches worldwide would exceed this amount (Boutrif & Bessy, 2001). The rejected shipments would lead to economic losses to producing countries of over one billion dollars and an extra 500 million dollars to the EC alone on laboratory costs.

Brazil is the largest coffee producer and exporter with a 22% average market share in the last seven years (Silva, 2001). Research on OTA occurrence in green, roasted and soluble coffee produced in Brazil has been carried out (Taniwaki et al., 1999; Leoni et al., 2000; Leoni et al., 2001; Urbano et al., 2001). However, to date, no investigation has been reported on Brazilian green coffee exclusively destined for export, which would be directly impacted by the regulatory limits of importing countries. The objectives of the present work were to quantify OTA in green coffee samples obtained from export batches, to verify a possible correlation between coffee defects versus incidence of OTA and to search for morphological susceptibility of *defective* beans to microbial invasion.

Material and Methods

Samples

Thirty seven samples of Brazilian green coffee were obtained from export companies in Santos, comprising 6 states, 2 harvest years, arabica and robusta,

“organic” and government stock samples, as shown in table 1. The 1 kg samples were obtained from the 1999/2000 and 2000/2001 harvests for all origins except for Bahia (dry process) (2000/2001) and government stock (1987/1988).

Table 1. Composition of samples according to origin and type.

Origin	Number of samples	Type
São Paulo	9	Arabica
Minas Gerais	9	Arabica
Espírito Santo	6	Arabica & Robusta
Rondonia	3	Robusta
Parana	3	Arabica
Bahia (wet process)	3	Arabica
“Organic”	2	Arabica
Bahia (dry process)	1	Arabica
Government stock	1	Arabica

Sub-sampling

Five of the original samples were divided into two sub-samples. One of *black* and *sour* beans and the other containing only *sound* beans. *Black* and *sour* beans are considered coffee defects, probably a result of over-ripe cherries, deficient drying in field and/or undesirable fermentation, which could lead to infestation by OTA producing microorganisms and consequently OTA formation (Silva, 2000).

Extraction and cleanup of OTA in coffee

The extraction and cleanup procedures of OTA in the coffee samples were performed according to Pittet et al. (1996). Twenty five grams of the finely blended samples were mixed with 200 ml of methanol/3% aqueous sodium hydrogen carbonate (50:50). The suspension was blended for 3 min at medium speed with a Polytron homogenizer and then filtered through a 55 mm Whatman GF/B glass microfiber filter under low vacuum. Five milliliters of the filtrate were transferred to a cylinder and the volume then completed to 100 ml with phosphate-buffered saline (PBS). The whole extract was applied to the immunoaffinity column at 2-3 ml/min with the aid of a vacuum pump. The column was then washed with 10 ml distilled water, followed by 4 ml methanol. The eluate was collected and evaporated to dryness under a nitrogen stream at 40°C. The residue was resuspended in 1 ml of the High Performance Liquid Chromatograph (HPLC) mobile phase.

HPLC

The HPLC equipment used was a Shimadzu SCL-10AVP (Shimadzu Corporation, Japan) chromatograph with an automatic injector. Toxin detection was obtained with a Shimadzu RF-10AXL fluorescence detector operating at excitation and emission wavelengths of 330 nm and 470 nm respectively. A Supelcosil™6 LC-18 (5µm particle size, 4.6 mm x 250 mm) column (Supelco, USA) with a Hypersil guard column (5µm particle size, 4.6 mm x 25 mm) and a mobile phase a solution in the proportion of 42% acetonitrile / 58% 4 mM sodium

acetate/acetic acid (19:1) was used. The injection volume of the extract was 50 μ l at a flow rate of 1.0 ml/min.

Optical and Scanning Electron Microscopy (SEM)

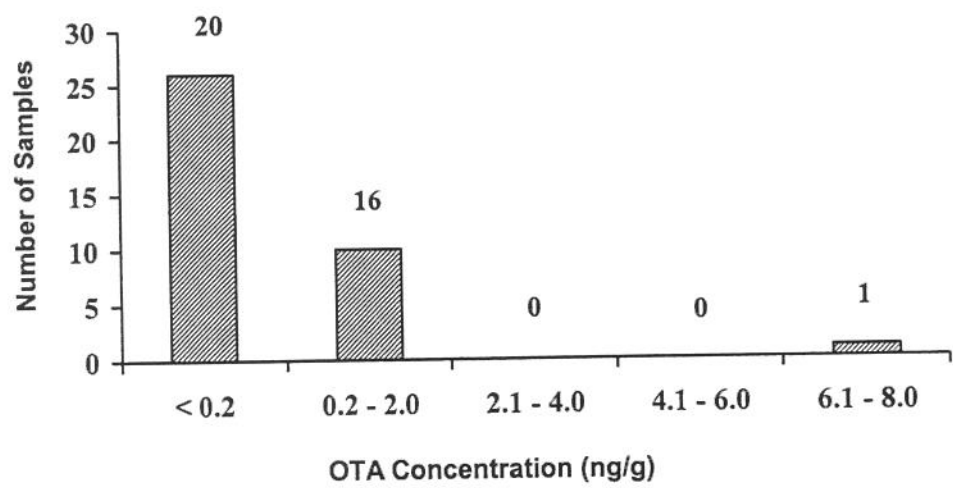
In five samples the beans were separated according to the official coffee classification into *sound*, *black* and *sour*. In all 15 beans were observed separately under optical microscopy and SEM. For the optical analysis, the beans were held directly in the microtomy (no previous inclusion), and cut into sections of about 5 μ m. Observations were made without previous staining; the morphology being enhanced by means of polarization lenses. As for SEM preparation, the coffee beans were cut in half, de-fatted with acetone for 3 hours and placed in an incubator overnight. After sputtering with gold the beans were observed under SEM at 10 kV of acceleration.

Results and discussion

Composition

Of the 37 original coffee samples analysed, 36 presented OTA content ranging from < 0.2 ng/g to 0.85 ng/g with an average of 0.16 ng/g. One sample showed a content of 6.24 ng/g. Twenty samples (54%) presented OTA levels below the detection limit of 0.2 ng/g and 97.5% of the samples showed OTA concentration below 5 ng/g (Figure 1). No correlation between coffee origin and OTA levels was found.

Figure 1. Data obtained from a batch of 37 samples of Brazilian export raw coffee from several producing regions (average of duplicates) (detection limit of 0.2 ng/g).



The results of the OTA investigation of *sound* and *defective* sub-samples are presented in table 2. Except for one, all sub-samples showed higher contents of OTA than the original samples, most likely due to the heterogeneity of contamination. Samples 3, 4 and 5 showed good correlation between OTA content and defects. The average OTA level was 0.46 ng/g in *sound* sub-samples and 4.52 ng/g in the *defective* sub-sample. Heilmann (1999) reported similar findings with the use of a colour sorting machine to separate *defective* beans. Leoni et al (2001), however, found no correlation between OTA contamination and defected beans using total defects counting according to the Brazilian classification system.

Table 2. Concentration of OTA (ng/g) in the original raw coffee samples and after separation into two sub-samples: sound and defective (black and sour) (detection limit of 0.2 ng/g).

Sample	Original content	Sound beans	Black and Sour beans
1	0.31	0.61	n.d.
2	< 0.2	0.42	0.42
3	< 0.2	0.22	17.46
4	< 0.2	0.25	3.88
5	< 0.2	0.80	0.84

Optical and Scanning Electron Microscopy

Visually, *sound* beans had the typical green colour and good appearance. *Black* ones, known to be a result of over-ripening or deficient drying, presented a dark colour. *Sour* beans, consequence of the same process failures, presented a brown, shiny aspect. The results of optical microscopy depicted no significant morphological differences in the endosperm of *sound*, *sour* and *black* beans as shown in figures 2 to 7. (Differences in colour represent the best polarized light used in each observation). The cells were practically empty of contents due to the dryness of beans. Furthermore, no mould, bacteria or yeast contaminations were found using this technique. Using SEM, the morphology of the *sound* and *sour* coffee beans also showed an organized endosperm with cells containing the contracted cytoplasm (figures 8 and 9). The *black* ones showed a somewhat

compressed endosperm and badly defined cellular contents (figure 10). Of 15 coffee beans, only one (*black*) depicted the presence of moulds and spores under SEM (figure 11).

There may be a correlation between higher quality of export coffee beans and lower concentration of OTA. However, *defective* beans characterised as *sour* and *black* do not necessarily correspond to OTA contamination. It was not possible to correlate the visual aspect of *sour* and *black* beans with obvious damage to the endosperm structure, which could indicate susceptibility to mould invasion. The results of this investigation reveal an OTA concentration in Brazilian raw coffee for export, which is lower than previous data obtained for raw coffee produced in that country (Taniwaki et al., 1999; Leoni et al., 2000; Leoni et al., 2001; Urbano et al., 2001). According to the present survey, Brazilian raw coffee for export complies with the regulatory limits in vigour.

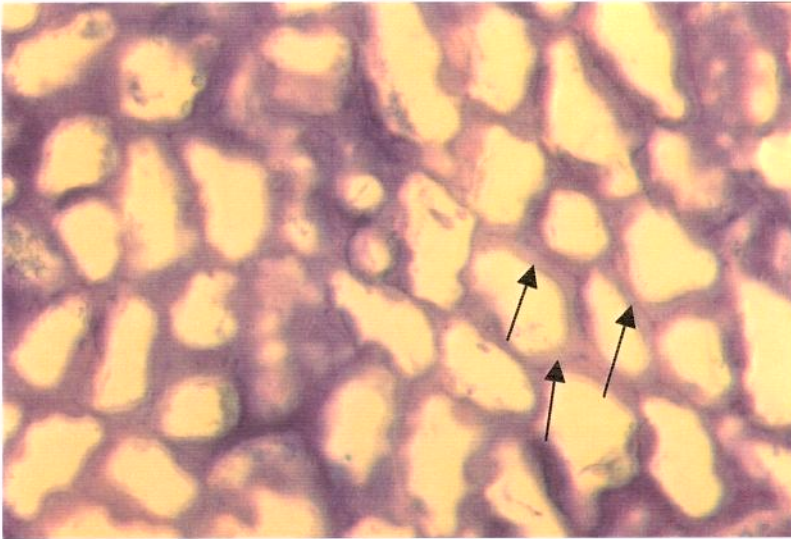


Figure 2: Optical microscopy of *sound* Robusta coffee bean (25 x)

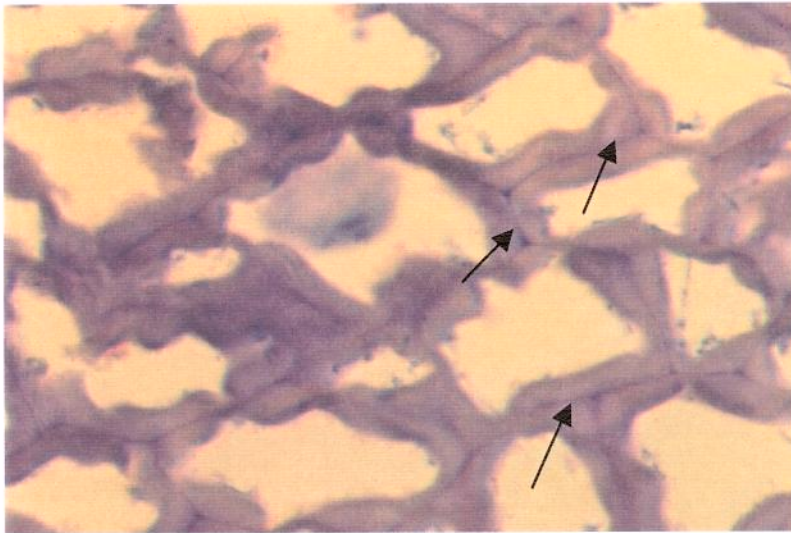


Figure 3: Optical microscopy of *sour* Robusta coffee bean (40 x)

Figures 2 and 3 show normal tissues for both *sound* and *sour* beans. Cell walls show their characteristic shape and thickness ($\uparrow$), while the middle lamellae is defined by the brilliant cresyl blue dye.

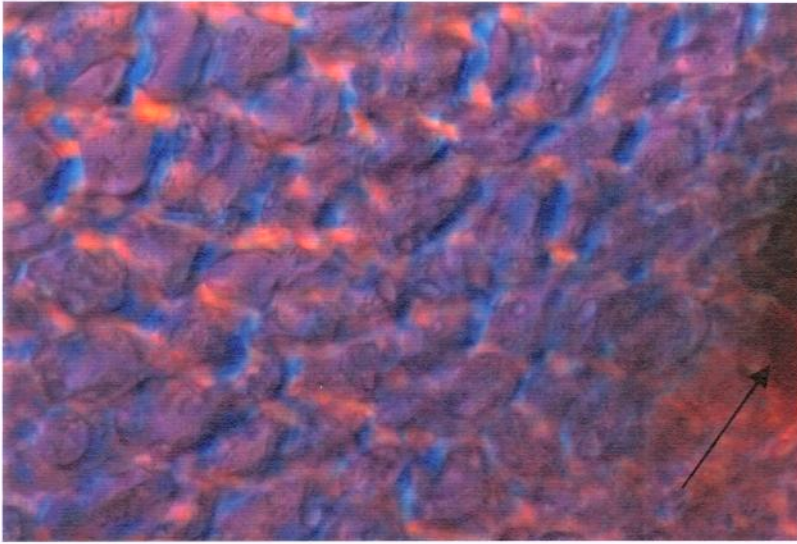


Figure 4. Optical microscopy of *black* Robusta coffee bean (25 x)

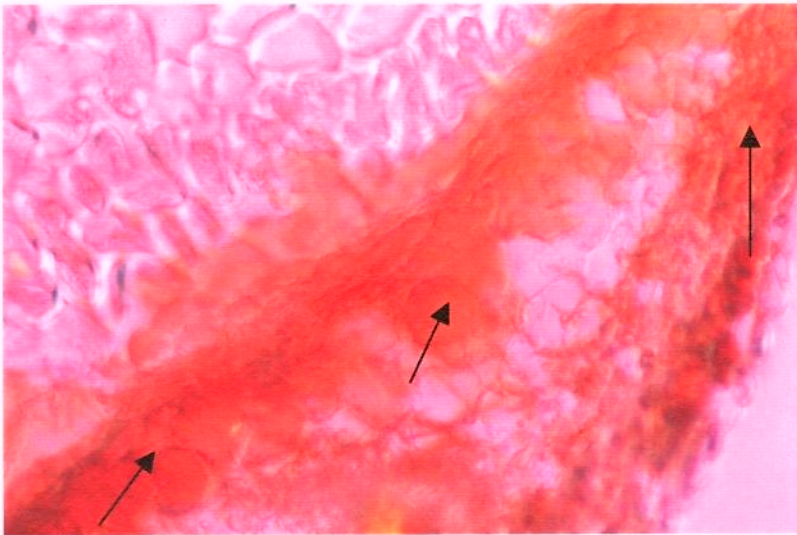


Figure 5. Optical microscopy of *black* Robusta coffee bean (25 x)

The arrows indicate the tissues of endosperm in figures 4 and 5 whose cells have lost their organization. Diffusion of cell contents occurred due to the high level of moisture. There were no signs of mould contamination.

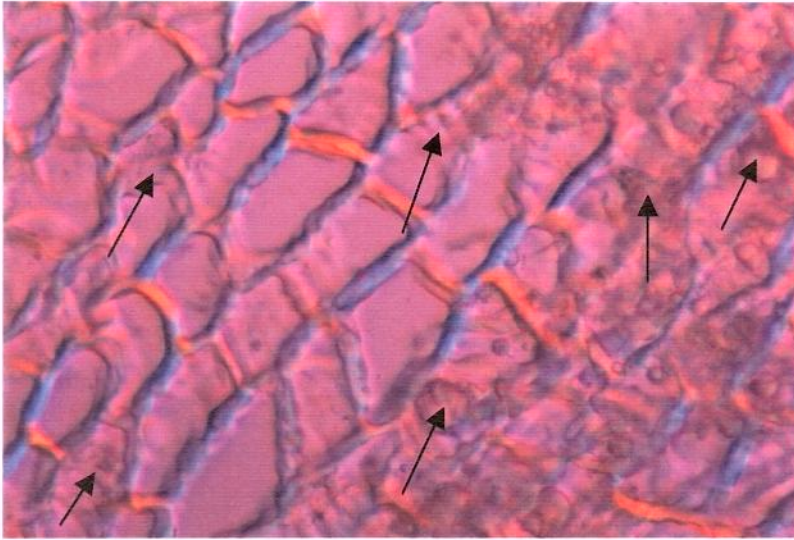


Figure 6. Optical microscopy of *black* Arabica coffee bean (25 x)

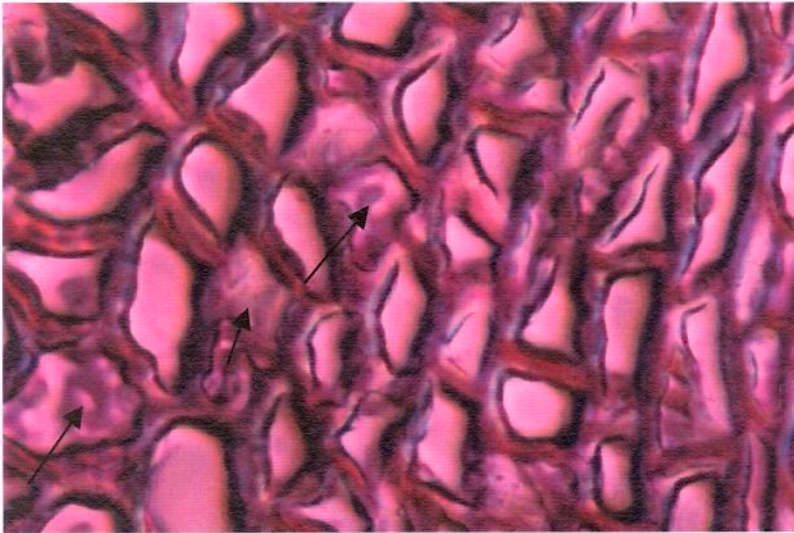


Figure 7. Optical microscopy of *black* Arabica coffee bean (40 x)

Although an outside black skin was closely attached to the beans in figures 6 and 7, the endosperm looked normal. Some cells show fragments of their inner contents or cellulosic portions (↑).

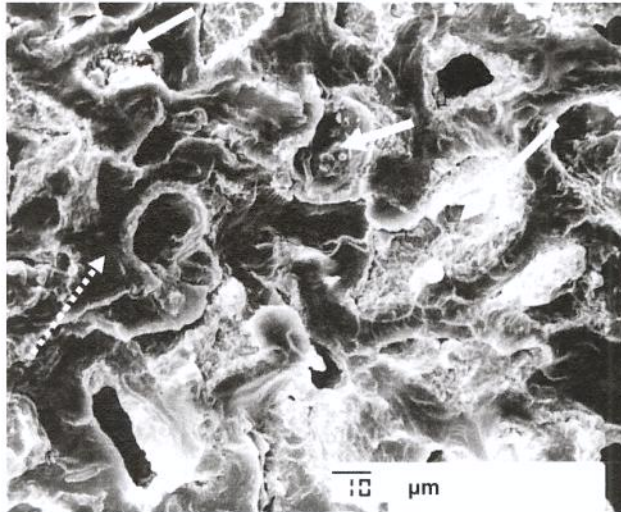


Figure 8 – Endosperm of *sound* raw coffee bean on Scanning Electron Microscopy. Cell walls (dotted arrow) are thick in *Coffea* and cytoplasm is depicted (↑) though not preserved (750 x).

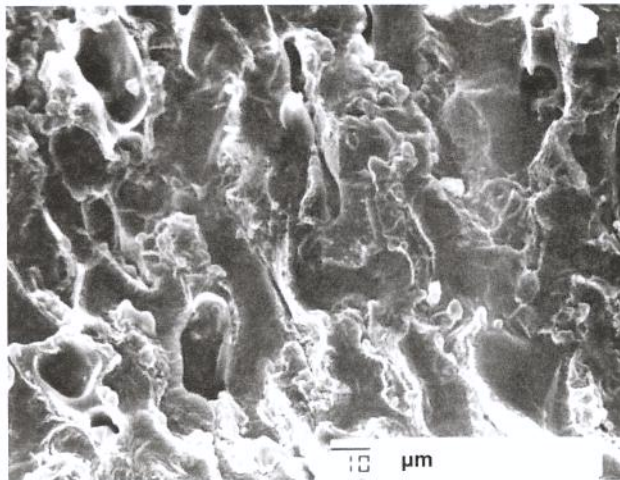


Figure 9 – Endosperm of *sour* raw coffee bean on Scanning Electron Microscopy. Cell walls and cytoplasm do not differ from *sound* beans (750x).

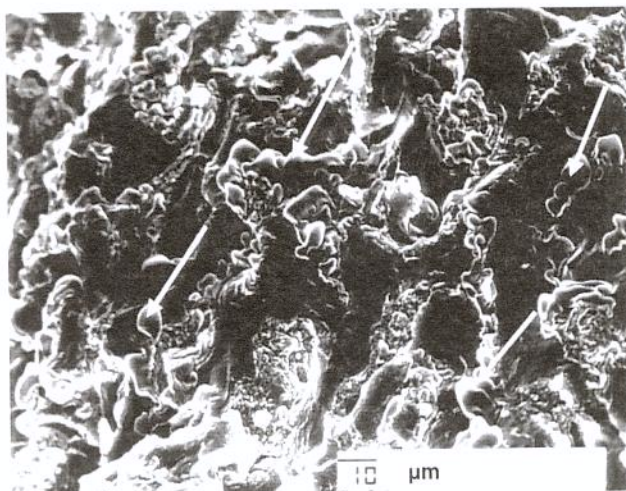


Figura 10 – Endosperm of *black* raw coffee bean on Scanning Electron Microscopy. *Black* beans are smaller; microscopy demonstrates a compression of cells, possibly due to abrupt water loss. Oil is emerging from cells, also observed with *sound* and *sour* beans (†) (750 x).

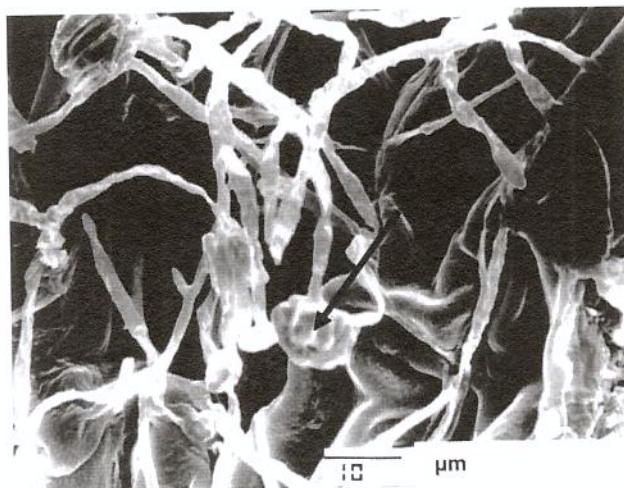


Figure 11 – Endosperm of the only coffee bean (*black*) that depicted the presence of mould and spores (†) enclosing an apparently normal endosperm (Scanning Electron Microscopy) (1500 x).

References

BOUTRIF, E.; BESSY, C. Global Significance of Mycotoxins and Phycotoxins. In: **Mycotoxins and Phycotoxins in Perspective at the Turn of the Millennium**. Edited by W. J. De Koe, R. A. Samson, H. P. Van Egmond, J. Gilbert e M. Sabino. p. 3-16, 2001.

DIRHEIMER, G. Mechanistic approaches to ochratoxin toxicity. **Food Additives and Contaminants**, London, v.13, suplem., p.45-48, 1996.

HEILMANN, W.; REHFELDT, A. G.; ROTZOLL, F. Behaviour and reduction of ochratoxin A in green beans in response to various processing methods. **European Food Research Technology**, 209, p.297-300, 1999.

JECFA, 1995. **Technical Report Series n. 859** (Geneva: Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives)

JØRGENSEN, K. Survey on pork, poultry, coffee, beer and pulses for ochratoxin A. **Food Additives and Contaminants**, London, v.15, n.5, p.550-554, 1998.

LEONI, L. A. B.; FURLANI, R. P.Z.; VALENTE SOARES, L. M.; OLIVEIRA, P. L. C. Ochratoxin A in brazilian roasted beans and instant coffee. **Food Additives and Contaminants**. London, v.17, n.10, p.867-870, 2000.

LEONI, L. A. B.; FURLANI, R. P.Z.; VALENTE SOARES, L. M.; OLIVEIRA, P. L. Ochratoxin A in Brazilian Green Coffee. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, n. 21 (1), p.105-107, 2001.

MAFF. Ministry of Agriculture, Fisheries and Foods, 1999. 1998 Survey on retail products for ochratoxin A. Food Surveillance Information Sheet n. 173

PATEL, S.; HAZEL, C. M.; WINTERTON, A. G. M.; GLEADLE, A. E. Survey of ochratoxin A in UK retail coffees. **Food Additives and Contaminants**, London, v.14, n.3, p.217-222, 1997.

PITTET, A.; TORNARE, D.; HUGGETT, A.; VIANI, R. Liquid chromatographic determination of ochratoxin A in pure and adulterated soluble coffee using an immunoaffinity column cleanup procedure. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.44, n.11, p.3564-3569, 1996

PITTET, A. Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds: a decade in review. In: **Mycotoxins and Phycotoxins in Perspective at the Turn of the Millennium**. Edited by W. J. De Koe, R. A. Samson, H. P. van Egmond, J. Gilbert e M. Sabino. p. 153-172. 2001

SILVA, J. M. Curso de classificação e degustação de café verde. 2001. Edited by Associação Comercial de Santos. Santos. p.66-69.

TANIWAKI, M. H.; PITT, J.I.; URBANO, G. R.; TEIXEIRA, A. A.; LEITÃO, M. F. F. Funghi producing ochratoxin A in coffee. In: ASIC 18°. Colloque. **Abstract Book**, Helsinque, 1999. p.239-247.

TRUCKSESS, M. W.; GILER, J.; YOUNG, K.; WHITE, K. D.; PAGE, S.W. Determination and survey of ochratoxin A in wheat, barley and coffee- 1997 **Journal of AOAC International**, Baltimore, v.82, n.1, 1999.

URBANO, G. R.; TANIWAKI, M. H.; LEITÃO, M. F. F.; VICENTINI, M.C. Occurrence of ochratoxin A-producing fungi in raw Brazilian coffee. **Journal of Food Protection**, London, v.64, n.8, p.1226-1230, 2001.