

FERRAMENTAS PARA CERTIFICAÇÃO DA QUALIDADE FITOSSANITÁRIA DO CAFÉ EM RELAÇÃO À CONTAMINAÇÃO POR OCRATOXINA A¹

Eugenia A. VARGAS, Eliene A. SANTOS, Luciana de CASTRO
Ministério da Agricultura e do Abastecimento, Laboratório Vegetal de Minas Gerais. e-mail: micotoxin-mg@agricultura.gov.br, gena@cdlnet.com.br.

RESUMO: O estabelecimento de limites de tolerância para a presença de ocratoxina em café verde, torrado e/ou solúvel tem fortes implicações econômicas para o Brasil e para os demais países produtores, que em sua maioria são países em desenvolvimento. As ferramentas tecnológicas - sistema de qualidade laboratorial, métodos analíticos e plano de amostragem, capacitação e treinamento - para a certificação da qualidade fitossanitária do café em relação à contaminação por ocratoxina A estão sendo disponibilizadas pelo Laboratório de Micotoxinas/LAV-MG, no âmbito do PNP&D Café, para que o Brasil possa assegurar a qualidade do seu café, na comercialização interna e exportação.

PALAVRAS-CHAVE: ocratoxina A, café, métodos analíticos e amostragem

ABSTRACT: The establishment of tolerance levels for the presence of ocratoxin a in green coffee, toasted and for soluble has strong economic impact in Brazil and other coffee producers countries which are usually developing countries. The technological tools-laboratory quality system, capacitation and training - for fitosanitary certification of coffee in relation to ocratoxin A contamination has become available in the Mycotoxin Laboratory/LAV-MG, PNP&D Café to assure the quality of the brazilian coffee comercialized internally and abroad.

INTRODUÇÃO

A Ocratoxina A (OA) é uma substância produzida por algumas espécies fúngicas do gênero *Aspergillus* e *Penicillium*, considerada um potente agente nefrotóxico e carcinogênico (1, 2, 3). A Internacional Agency for Research on Cancer (1993) classificou a OA como substância do Grupo 2B. Esta é produzida no café principalmente na etapa de pós-colheita, quando os grãos de café são transportados e armazenados em condições de umidade relativa alta e/ou ainda úmidos (6).

No Brasil não existe ainda uma avaliação representativa da contribuição da bebida café para a ingestão diária de OA, uma vez que os dados de contaminação de OA em café verde e torrado não são significativos para a caracterização da extensão da contaminação da produção nacional e devido à falta de uma avaliação consensual sobre a degradação de OA durante o processo de torrefação (13, 14, 15).

A União Européia tem discutido a necessidade do estabelecimento de limite de tolerância para OA em alguns alimentos, dentre eles o café, enquanto que o Codex *Alimentarius* (3, 8) tem levantado a relevância da contribuição do café para a ingestão de OA. A ingestão diária de OA na Europa varia de 0,7 a 4,7 ng/kg/peso corpóreo (média = 1,8 ng/kg/peso corpóreo). Os cereais e seus derivados são a principal fonte de OA na dieta (50%), seguidos do café torrado, cerveja, vinho (6). O Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA) do Codex *Alimentarius*, considerando a carcinogenicidade da OA, estabeleceu a ingestão semanal tolerável provisória (PTWI) de 0,10 µg/kg peso corpóreo (0,014 µg/kg peso corpóreo/dia) (2, 3, 7). Alguns países, como a Itália (4 µg/kg) (11), Grécia (20 µg/kg), República Checa (20 µg/kg) e Romênia (5 µg/kg) (7), vem adotando limites de tolerância para a presença de OA em café verde e para alimentos em geral.

O estabelecimento de limites de tolerância para a presença de OA em café verde, torrado e/ou solúvel tem fortes implicações econômicas para o Brasil e para os demais países produtores, que em sua maioria são países em desenvolvimento.

A imposição de barreiras restritivas e de limites aceitáveis cada vez menores, da ordem de parte por bilhão (µg/kg) para OA, condiciona os países produtores de café à necessidade de implantação de sistema da garantia da qualidade analítica, de qualificação de pessoal técnico e de adoção de técnicas avançadas de análise, que propiciem precisão, exatidão e sensibilidade analítica e planos de amostragem apropriados para a avaliação da qualidade fitossanitária do café em relação a OA.

Os métodos analíticos e planos de amostragem são ainda ferramentas fundamentais na implementação dos princípios Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP) na cadeia produtiva do café com vista ao controle da contaminação por OA, possibilitando o correto mapeamento da cadeia e a implementação de ações com vistas à correção de práticas de manejo.

Considerando a natureza não homogênea da contaminação de produtos agrícolas (lote) por micotoxinas e que a aplicação de planos apropriados de amostragem é componente principal na avaliação correta da contaminação de uma amostra (produto, lote, carga, etc) por micotoxinas, juntamente com os métodos analíticos, o estabelecimento destes procedimentos tem sido matéria de muita preocupação desde longa data, e discussões contínuas são realizadas na busca de procedimentos internacionais harmonizados (3).

Há problemas únicos associados à amostragem de alimentos e produtos agrícolas por micotoxinas, que não são os mesmos em relação a outros contaminantes. A amostragem de grãos para análise de micotoxinas segue um padrão diferente da utilizada para classificação dos mesmos. Estudos experimentais delineados para determinar as características da distribuição das micotoxinas, especialmente as aflatoxinas em milho e amendoim (9), mostraram que esta é de distribuição binomial negativa e que: a) geralmente uma pequena porcentagem de grãos de um lote estão contaminados e que alguns deles podem conter uma concentração extremamente elevada; b) a variabilidade dos resultados de testes diferentes de uma mesma amostra é grande; c) para amostras pequenas, a variância da amostragem é, geralmente, a maior fonte de variação; d) a distribuição dos resultados das amostras em teste é positivamente distorcida acerca da concentração da toxina do lote (9, 10). Em geral, o estabelecimento das características de um plano amostral é um processo caro e que requer delineamento estatístico, amostragem intensa e métodos analíticos validados, sensíveis e precisos para avaliação da contaminação de um determinado lote por OA em níveis tão baixos quanto ppb ($\mu\text{g}/\text{kg}$).

Métodos analíticos oficiais são métodos que foram validados por um estudo colaborativo interlaboratorial, para os quais as características do método tais como repetibilidade, reprodutibilidade, especificidade e limites de detecção/quantificação foram determinadas. O processo de validação de métodos oficiais é rigoroso e inevitavelmente lento, uma vez que são necessários vários meses para se organizar este processo e devido à existência de exigência e requisitos de procedimentos, por parte de órgãos oficiais como Association of Official Analytical Chemist (AOAC).

Desde 1998, o Laboratório de Micotoxinas/LAV-MG do Ministério da Agricultura e do Abastecimento (MA) vem com o apoio do Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café (CBP&D Café) e do Programa Nacional de Controle de Micotoxinas em Produtos, Subprodutos e Derivados de Origem Vegetal (PNCMV), em parceria com Instituições do Núcleo do Pós Colheita implementando vários estudos objetivando o estabelecimento de ferramentas tecnológicas para a avaliação e controle da contaminação do café por OA, como o desenvolvimento e validação de métodos analíticos para determinação de OA em café verde, torrado e solúvel, treinamento e qualificação de técnicos, implantação de sistemas de qualidade laboratorial e amostragem.

MATERIAL E MÉTODOS

O desenvolvimento e validação de métodos analíticos para determinação de OA em café verde, torrado e solúvel vem sendo implementado com base nas Normas da International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) (21), European Union (22) e em Boenke (20). As características dos métodos são definidas em termos de linearidade da curva de calibração, especificidade, sensibilidade, precisão, repetibilidade dentro de um mesmo dia e entre dias. O desenvolvimento e implementação de um plano de amostragem será realizado com base nos trabalhos desenvolvidos pela FAO (9) para aflatoxinas em amendoim e milho. A característica da distribuição da contaminação será determinada, assim como as curvas de operação características (OC), com a definição dos riscos para o produtor (comerciante, exportador) e para o consumidor (comprador, importador). Modelo matemático para o plano será estabelecido. O treinamento regular de técnicos vem sendo realizado pelo Laboratório de Micotoxinas/LAV-MG nas suas dependências, e anualmente em Kobe/Japão em cooperação com a Japan International Co-operation Agency (JICA), Hyogo International Center (HIC). A edição e publicação de trabalhos técnicos, manuais, vídeos vem sendo coordenada e realizada pelo Laboratório de Micotoxinas em parceria com instituições integrantes do Núcleo Pós-colheita do PNP&D Café.

Os objetivos deste trabalho foram:

Desenvolver, padronizar e validar métodos analíticos para OA em café verde e torrado e/ou solúvel empregando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (19) com detecção por fluorescência,

cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCDAE)/densitometria associada à purificação por imunoafinidade e técnicas de ELISA e fluorimetria;

Disponibilizar as metodologias validadas para quantificação de OA em café verde, torrado e solúvel para o Segmento da Agroindústria do Café, órgãos de pesquisa e órgãos oficiais de classificação e de fiscalização no Brasil;

Oficializar por meio de estudo colaborativo junto à AOAC International, o método analítico para a determinação de OA em café verde para ser utilizado pelo segmento café no monitoramento da ocorrência de OA em café verde, em disputas, revisões e periciais internacionais sobre níveis de contaminação de lotes de café brasileiros por OA;

Estabelecer, implantar e oficializar plano de amostragem para a determinação de OA em café verde;

Editar e publicar manual e vídeos de treinamento em métodos analíticos e plano de amostragem;

Treinar técnicos de laboratórios em métodos de análise para OA em café verde, torrado e solúvel e em amostragem de café verde e apoiar as instituições do Núcleo do Pós-colheita do PNP&D Café na implantação da pesquisa de OA.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

- Foi implantado um sistema de referência da garantia da qualidade laboratorial com base nas normas internacionais ISO 17025 no Laboratório de Referência de Micotoxinas/LAV-MG;
- Vários estudos foram implementados nos últimos dois anos e /ou estão em andamento na área de desenvolvimento e validação de métodos analíticos para determinação e triagem de OA em café verde, torrado e/ou solúvel por CLAE/imunoafinidade e CCDAE/Densitometria, fluorimetria e ELISA:

Validação intralaboratorial do método para determinação de OA em café verde por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (19) e Fluorimetria (18) publicação de Instrução Normativa e Portaria de Normatização dos mesmos no Diário Oficial da União: BRASIL. Métodos Analíticos de Referência para Análise de Micotoxinas em Produtos de Origem Vegetal. Instrução Normativa no. 09 de 24 de março de 2000, Diário Oficial da União. no. 62, 30 de março de 2000, seção 1, pg.35 – 41; e BRASIL. Métodos de triagem e quantificação de ocratoxina A em café verde por fluorimetria. Portaria no. 12 de 03 de abril de 2000, Diário Oficial da União. no. 81, 327 de abril de 2000, seção 1, pg.10-12.

Elaboração do Protocolo de Estudo colaborativo para validação interlaboratorial do método validado intralaboratorialmente para determinação de OA em café verde por CLAE e submissão à aprovação da AOAC International que contará com a participação de 20 laboratórios brasileiros, da Europa e Ásia: VARGAS, E. A., SANTOS, E.A., PITTET, A. Collaborative Study Submitted for consideration by AOAC International: Determination of ochratoxin A in green coffee by immunoaffinity column clean up and HPLC. Ministério da Agricultura e do Abastecimento, Laboratório de Micotoxinas/LAV-MG, Brasil. 28p. 1999.

- Avaliação de Kits de ELISA comerciais VERATOX e R-Biopharm para análise e triagem de OA em café verde (16,17);
- Automação via ASPEC do método para determinação de OA em café verde e torrado;
- Realização de Workshop sobre a garantia da qualidade analítica, planos de amostragem, métodos analíticos para determinação de OA em café e planos de amostragem: Workshop: Micotoxinas em Café. Ministério da Agricultura e Abastecimento, EMBRAPA e Consórcio Brasileiro para Pesquisa e Desenvolvimento do Café. 21-23, setembro 1999, Belo Horizonte, MG;

Edição e Publicação de Vídeo de treinamento do método para determinação de OA em café verde por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência: Vídeo: Determinação de ocratoxina A em café verde por imunoafinidade e cromatografia líquida de alta eficiência. 15 min. Realizado pelo Ministério da Agricultura e Abastecimento, EMBRAPA e Consórcio Brasileiro para Pesquisa e Desenvolvimento do Café. Produzido pelo Laboratório de Micotoxinas/LAV-MG. Belo Horizonte, MG. Brasil. 1999;

- Treinamento e qualificação de técnicos brasileiros em técnicas de CLAE, CCDAE, ELISA e Fluorimetria em cooperação com a JICA, HIC e o MA;
- Implementação dos estudos em planos de amostragem:

Elaboração do protocolo de implantação dos estudos, com o apoio do USDA/USA, e que define o número e tamanho dos lotes a serem estudados; o tamanho da amostra a ser analisada; o moinho a ser utilizado; o número de amostras, subamostras e repetições serem analisadas e o método analítico a ser utilizado.

- Apresentação dos trabalhos desenvolvidos no âmbito do PNP&D café em congressos e encontros técnicos:
- Desenvolvimento e padronização de metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para quantificação de ocratoxina A (OTA) em café. IX Encontro Nacional de Micotoxinas - I Simpósio em Armazenagem Qualitativa de Grãos do Mercosul. Anais. 18 a 21 de maio, Florianópolis, Brasil, 1998
 - Use of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection and quantification of ochratoxin A in green coffee. X International IUPAC Symposium on Mycotoxin and Phycotoxins, 21 a 25 de maio, em Guarujá, São Paulo.
 - In-house validation of immunoaffinity/fluorometric method for determination of ochratoxin A in green coffee. X International IUPAC Symposium on Mycotoxin and Phycotoxins, 21 a 25 de maio, em Guarujá, São Paulo.
 - In-house validation of a method for determining ochratoxin A in green coffee, beans and corn by immunoaffinity column with high performance liquid chromatography, The 114th AOAC INTERNATIONAL Annual Meeting & Exposition, Philadelphia, USA, September, 2000.
 - Automation of the analysis of ochratoxin A in roasted coffee by immunoaffinity column and high performance chromatography using a ASPEC XL system, The 114th AOAC INTERNATIONAL Annual Meeting & Exposition, Philadelphia, USA, September, 2000.

CONCLUSÃO

A implantação da qualidade laboratorial com bases nas normas ISO 17025; a implementação de estudos, estabelecimento e disponibilização de métodos analíticos para determinação de OA em café verde, e torrado, e treinamento de técnicos de laboratórios, além da disponibilização de material técnico significam um grande avanço no estabelecimento das ferramentas para a certificação fitossanitária da qualidade do café em relação a ocorrência da OA. A implementação de estudos na área de amostragem com vistas à caracterização do perfil da distribuição da contaminação de OA em café e estabelecimento de plano oficial de amostragem será fundamental para que o Brasil possa assegurar a qualidade do seu café, garantindo desta forma sua comercialização interna e exportação e a garantia da segurança do consumidor. A validação de métodos de referência e de triagem para café solúvel deverá ser realizada junto ao setor do Agronegócio do café com vistas ao controle da qualidade do café em todas as etapas da cadeia produtiva.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1)ROHR, I.S.; SCHLATTER, C.; DIETRICH, D.R.; SCHLATTER, J.,1994, *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.* **85**, 719 – 727. (2)KUIPER-GOODMAN, T., 1996, Risk Assessment on ochratoxin A: an update. *Food additives and contaminants*, **13** (supplement), 53-57. (3)CODEX ALIMENTARIUS, 1999, Codex Committee on Food Additives and Contaminants, 31st session. Position paper on ochratoxin A, CX/FAC 99/14, Rome, Italy. (4)BRASIL. PNCMV. Diário Oficial da União, Portaria MA/SDA no. 230, 10/jun/1997, publicada em 11/Jun/1997. (5)IARC - International Agency for Research on Cancer, 1993, *Some naturally occurring substances, food items and constituents, heterocyclic aromatics amines and mycotoxins*, Geneva, Suíça. (6)ILSI. Conclusions from the Workshop on Ochratoxin in Food, organized by ILSI Europe in Aix-en-Provence, January, 1996. *Food Additives and Contaminants*, v. 13, Supplement, 1-3 (1996). (7)FAO, 1997, World regulations for mycotoxins 1995. A compendium. FAO Food and Nutrition Paper 64 (Rome: FAO). (8)CODEX ALIMENTARIUS, 2000, Report of the 32nd session of the Codex Committee on food additives and contaminants- Alinorm 01/12. Beijing, People's Republic of China, 20-24 March. (9)FAO, 1993, Sampling plans for aflatoxin analysis in peanuts and corn. Report of a technical consultation. FAO: Rome. 76 p. (10)FONSECA, H., 1999, Amostragem: Representatividade e Técnicas utilizadas. ESALQ/USP. 21 p. Não publicado. (11)Ministerio delle finanze, 1996, Dipartimento Dogane, Circolare 76, Roma, Italia. (12)Ministério da Agricultura e Abastecimento - MA. Versão preliminar do Programa Nacional de Controle de Micotoxinas em Produtos, Subprodutos e Derivados de Origem Vegetal - PNCMV, 59p. (1997). (13)LEVI, C., TRENK, H. L., and MOHR, H. K., 1974, Study of the occurrence of ochratoxin A in green coffee beans. *Journal of AOAC*, **57**, 866-871. (14)STUDER-ROHR, I; DIETRICH, D. R.; SCHLATTER, J.; SCHLATTER, C., 1993, *ASIC*. **15**, 443 – 452. 91 (5)BLANC, M., PITTET, A., MUNOZ-BOX, R. and VIANI, R. 1998. Behaviour of ochratoxin A during coffee roasting and soluble coffee manufacture. *Journal of Agric. Food Chem.* **46**, 673-675. (16) RIDASCREEN®FAST Ochratoxin A. R-Biopharm GmbH, Darmstadt, Germany. (17)VERATOX® Ochratoxin Instruction Manual, Neogen Corporation, USA. (18)VICAM Ochratest Instruction Manual, 1999. (19)PITTET, A., TORNARE, D., HUGGETT, A., VIANI, R. Liquid chromatographic determination of ochratoxin A in pure and adulterated soluble coffee using an immunoaffinity column clean up procedure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **44** (11), 3564-3569, 1996. (20)BOENKE, A., 1998, Method validation for mycotoxin determination in food and foodstuffs. *Trends in Analytical Chemistry*, **17**, 10-17. (21)IUPAC, 1995, Harmonized Guidelines for internal analytical control in analytical chemistry laboratories. Prepared by Michael Thompson and Roger Wood. *Pure and Applied Chemistry*, **67**, 4, 649-666. (22)European Community, 1998, Commission Regulation 98/53/EC of 16 July. Official Journal of the European Community. L 201/93 à 101, Luxembourg.

AVISO

ESTA PUBLICAÇÃO PODE SER ADQUIRIDA NOS
SEGUINTE ENDEREÇOS:

FUNDAÇÃO ARTHUR BERNARDES

Edifício Sede, s/nº. - Campus Universitário da UFV
Viçosa - MG
Cep: 36571-000
Tels: (31) 3891-3204 / 3899-2485
Fax : (31) 3891-3911

EMBRAPA CAFÉ

Parque Estação Biológica - PqEB - Av. W3 Norte (Final)
Edifício Sede da Embrapa - sala 321
Brasília - DF
Cep: 70770-901
Tel: (61) 448-4378
Fax: (61) 448-4425