



**ESTUDO DE VIABILIDADE PARA PRODUÇÃO DO
CANDIDATO A MATERIAL DE REFERÊNCIA
CERTIFICADO DE OCRATOXINA A NO CAFÉ TORRADO
E MOÍDO**

Caroline Figueiredo Petronilho

Projeto de Final de Curso

Orientador(es)

Prof. Karen Signori Pereira, D. Sc.

Co-orientador(es)

Raquel Duarte da Costa Cunha Bandeira, D. Sc.

Janaína Marques Rodrigues, D.Sc.

Agosto de 2018

ESTUDO DE VIABILIDADE PARA PRODUÇÃO DO CANDIDATO A MATERIAL DE REFERÊNCIA CERTIFICADO DE OCRATOXINA A NO CAFÉ TORRADO E MOÍDO

Caroline Figueiredo Petronilho

Projeto de Final de Curso submetido ao Corpo Docente da Escola de Química, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Bacharel em Engenharia de Alimentos.

Aprovado por:

Prof.IVALDO ITABAIANA JUNIOR, D. Sc.

Prof. DANIEL WEINGART BARRETO, D. Sc.

NATHALI RICARDO BARBOSA DE LIMA, M. Sc.

Orientado por:

Prof. KAREN SIGNORI PEREIRA, D. Sc.

RAQUEL DUARTE DA COSTA CUNHA BANDEIRA, D. Sc.

JANAÍNA MARQUES RODRIGUES, D. Sc.

Rio de Janeiro, RJ - Brasil

Agosto de 2018

Petronilho, Caroline Figueiredo.

Estudo de viabilidade para produção do candidato a Material de Referência Certificado de Ocratoxina A no café torrado e moído / Caroline Figueiredo Petronilho. Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2018.
VII, 44 p.; il.

(Monografia) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 2018.
Orientador(es): Prof. Karen Signori Pereira e Raquel Duarte da Costa Cunha Bandeira e Janaína Marques Rodrigues

1. Café. 2. Material de Referência Certificado. 3. Ocratoxina A. 4. Monografia. (Graduação – UFRJ/EQ). 5. Prof. Karen Signori Pereira e Raquel Duarte da Costa Cunha Bandeira e Janaína Marques Rodrigues I. Título.

Dedico esse trabalho aos meus pais por todo apoio dado durante essa trajetória.

“Nunca foi sorte, sempre foi Deus.”

Leandro Sapucahy

AGRADECIMENTOS

É bem difícil agradecer a todos que estiveram comigo durante essa longa caminhada. Em primeiro lugar, quero começar por essa força maior que eu chamo de Deus que esteve ao meu lado em todos os momentos. Tristes e felizes, e até mesmo naqueles onde eu achava que nada mais tinha solução, Ele estava ali me confortando ainda que eu me sentisse sozinha.

Seguindo a ordem, quero agradecer aos meus pais que muitas vezes deixaram de viver os sonhos deles para sonharem junto comigo o meu sonho. Sem eles nada disso teria sido possível. Reconheço e sou eternamente grata por tudo que eles representam na minha história.

Agradeço também a mim mesma pela paciência e resiliência dedicada todos esses anos. Existiram muitos momentos difíceis onde a primeira coisa que a maioria das pessoas faria seria largar tudo e seguir outro caminho. Mas eu não me deixei abater. Fui determinada e cumpri meu propósito. Hoje posso dizer que sou feliz por ter conseguido chegar até aqui.

Não menos importante, devo muitos agradecimentos aos meus amigos. Foram eles que seguraram as piores barras dessa trajetória comigo. E também foram eles que me disseram inúmeras vezes que poderia demorar, mas que eu conseguiria. É difícil citar todos eles, são muitos nomes e alguns podem se sentir chateados caso não sejam mencionados mas tenho alguns que não podem ficar de fora. Renata Cerruti, Fábio Luiz, Ivo Lima, Jéssica Troyack, Michel Koureiche, Desirèe Araújo, Nathali Ricardo, Wallace de Souza e Caliana Oliveira, muito obrigada por cada cerveja aberta numa mesa de bar, por cada conselho (mesmo que eu não tenha seguido todos), por cada abraço. Enfim, eu amo vocês!

Quero agradecer também a minha família, principalmente minha Tia Marta que durante muitos anos cedeu a sua casa para ser também o meu abrigo. E ao meu Tio Valdir, que onde quer que esteja nesse momento tenho certeza de que está muito orgulhoso por eu ter concluído essa etapa.

Não posso deixar de agradecer minhas companheiras de trabalho no Inmetro, Raquel, Érika e Giovana. Sem elas esse trabalho jamais teria se realizado. Muito obrigada, meninas.

E por fim, agradeço ao meu namorado, Nathan, por nesses últimos dois anos ter sido o meu porto seguro. Obrigada por acreditar mais em mim do que eu mesma. Obrigada por me incentivar e não me deixar desistir. Obrigada por estar ao meu lado e sonhar junto comigo.

Resumo do Projeto de Final de Curso apresentado à Escola de Química como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Bacharel em Engenharia de Alimentos.

ESTUDO DE VIABILIDADE PARA PRODUÇÃO DO CANDIDATO A MATERIAL DE REFERÊNCIA CERTIFICADO DE OCRATOXINA A NO CAFÉ TORRADO E MOÍDO

Caroline Figueiredo Petronilho

Orientador Responsável: Prof. Karen Signori Pereira, D. Sc.

Outros Orientadores: Raquel Duarte da Costa Cunha Bandeira, D. Sc.

Janaína Marques Rodrigues, D.Sc.

O café é um produto de significativa importância no cenário nacional e internacional, com legislação específica em relação às suas características e à presença de contaminantes, dentre eles a ocratoxina A (OTA). A ocratoxina A é uma micotoxina produzida por algumas espécies de fungos filamentosos pertencentes ao gênero *Aspergillus* e *Penicillium* e é, entre todas as ocratoxinas, a mais tóxica e a mais relevante. No Brasil, o limite máximo de OTA em café torrado é de 10 µg/kg e na União Europeia de 5,0 µg/kg. Portanto, há necessidade de uma medição confiável desse contaminante e para isso requer-se o uso de materiais de referência certificados (MRC). O preparo de um lote candidato a MRC de OTA em café torrado foi realizado no Inmetro, produzindo-se 195 frascos, contendo cada um 50 g de café contaminado com OTA na concentração aproximada de 5 µg/kg. Ao total, 10 (dez) frascos foram selecionados de maneira aleatória para serem submetidos ao estudo de homogeneidade e 20 (vinte) frascos para o estudo da temperatura de referência a -20°C e 4 °C, os resultados dos testes de ANOVA e valor-p levaram à conclusão de que o lote candidato a MRC de OTA em café torrado produzido era homogêneo e estável a temperatura de -20°C.

Palavras-chave: Café; Material de Referência Certificado; Ocratoxina A.

ÍNDICE

Capítulo 1: INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	1
1.1 Introdução.....	1
1.2 Objetivo.....	2
Capítulo 2: DESENVOLVIMENTO E METODOLOGIA	3
2.1 O café	3
2.1.1 Composição química do café	4
2.1.2 Processamento do café	6
2.1.2.1 Separação de sementes	7
2.1.2.2 Secagem dos grãos.....	8
2.1.2.3 Torrefação e resfriamento	9
2.1.2.4 Descanso	10
2.1.2.5 Moagem	10
2.1.2.6 Embalagem.....	11
2.1.2.7 Estocagem	11
2.2 Micotoxinas.....	11
2.2.1 Ocratoxina A (OTA).....	13
2.2.1.1 Toxicologia da Ocratoxina A.....	14
2.3 Legislação Brasileira	15
2.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	16
2.4.1 Espectrometria de massas em série (EM/EM)	17
2.5 Experimental	18
2.5.1 Preparo do Café Torrado e Moído	19
2.5.2 Preparo de Soluções.....	20
2.5.3 A análise	23
2.5.4 Produção do MRC.....	24
2.5.4.1 Homogeneidade.....	26
2.5.4.2 Temperatura de Referência (4 °C e -20 °C).....	28
2.5.5 Quantificação de Ocratoxina A	29
Capítulo 3: RESULTADOS E DISCUSSÕES	32
3.1 Resultados.....	32
3.1.2 Homogeneidade.....	32
3.1.3 Temperatura de Referência (4 °C e -20 °C)	33
Capítulo 4: CONCLUSÕES	38
Capítulo 5: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39

Capítulo 1: INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1.1 Introdução

O seguinte trabalho tem como tema central o café e a produção de um padrão de ocratoxina a nessa matriz. A Associação Brasileira da Indústria de Café estimou que em 2016, o Brasil teve 34,64% de participação na produção, com 51,4 milhões de sacas produzidas, tendo o estado de Minas Gerais como líder na produção com cerca de 28 milhões de sacas produzidas.

O Brasil também possui o maior consumo interno de café, com cerca de 20,5 milhões de sacas/ano segundo dados de 2016. Com o passar dos anos, observa-se que o consumidor tem dado mais importância à qualidade dos produtos e especialmente ao risco que estes podem oferecer a sua saúde.

Assim como a maioria dos alimentos, o café está propenso a contaminações, que podem ocorrer, no momento anterior ou posterior a colheita e durante o transporte e armazenamento. Dentre os principais contaminantes pode-se dar destaque às micotoxinas. As micotoxinas são substâncias químicas tóxicas produzidas por fungos. No que diz respeito a saúde humana e de animais, a contaminação por micotoxina é um problema grave pois já foram observados efeitos carcinogênicos, imunotóxicos, teratogênicos e nefrotóxicos.

A micotoxina de mais estudo no café é a Ocratoxina A, que é um metabólito secundário produzido por fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium*. No gênero *Aspergillus* as principais espécies são: *Aspergillus ochraceus*, *A. carbonarius* e *A. niger* e pelo gênero *Penicillium* é *Penicillium verrucosum*.

A presença de Ocratoxina A em alguns alimentos já foi identificada, dentre eles: milho, cerveja, vinho, suco de uva, passas, frutas secas, cacau, temperos, produtos animais e no café verde, torrado e solúvel.

O tema proposto é de extrema relevância e para corroborar tal fato, pode-se citar a Resolução – RDC N° 7 da ANVISA de 18 de fevereiro de 2011 que determina um limite máximo de 10 µg/kg de Ocratoxina A no café torrado moído ou em grão.

O estabelecimento de limites é essencial para determinação dos níveis de segurança para exposição humana. Diante do risco que representa a Ocratoxina A como contaminante do café para a saúde do consumidor e perante ao fato de que o café é um produto de grande relevância tanto para a economia brasileira como mundial, os limites de segurança exigidos para exportação estão cada vez maiores, e a produção de alimentos seguros e de alta qualidade vem se mostrando uma exigência crescente principalmente pelos agentes de controle e fiscalização.

Além disso, torna-se cada vez mais necessário o desenvolvimento de análises que avaliem os níveis dessa micotoxina no café visando à qualidade e a segurança no consumo do alimento e prevenindo possíveis imposições de barreiras técnicas à exportação do produto.

1.2 Objetivo

O objetivo deste trabalho é avaliar a viabilidade técnica de se produzir um Material de Referência Certificado (MRC) para Ocratoxina A no café torrado e moído utilizando a técnica de Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas em série. Para a realização dessas análises, é vital a confecção de padrões. Porém no Brasil ainda não há uma produção desse padrão para Ocratoxina A em café torrado e moído, e quando necessário é preciso que se faça a exportação de tal produto. Por conta disso, seria essencial e de extrema magnitude a produção de um padrão interno que pudesse proporcionar uma menor dependência e necessidade de exportação do produto.

O trabalho possui três partes. Na primeira parte são apresentadas as características físicas e químicas do café, as características químicas da Ocratoxina A; também é mostrado o nível de legislação disponível dentro desse tema e o funcionamento do equipamento utilizado. Na segunda parte, é apresentada o desenvolvimento da técnica e a produção de um mini-lote do padrão de Ocratoxina A em Café Torrado e Moído. E na terceira parte são mostrados e discutidos os resultados obtidos para estabilidade e homogeneidade do produto.

Capítulo 2: DESENVOLVIMENTO E METODOLOGIA

2.1 O café

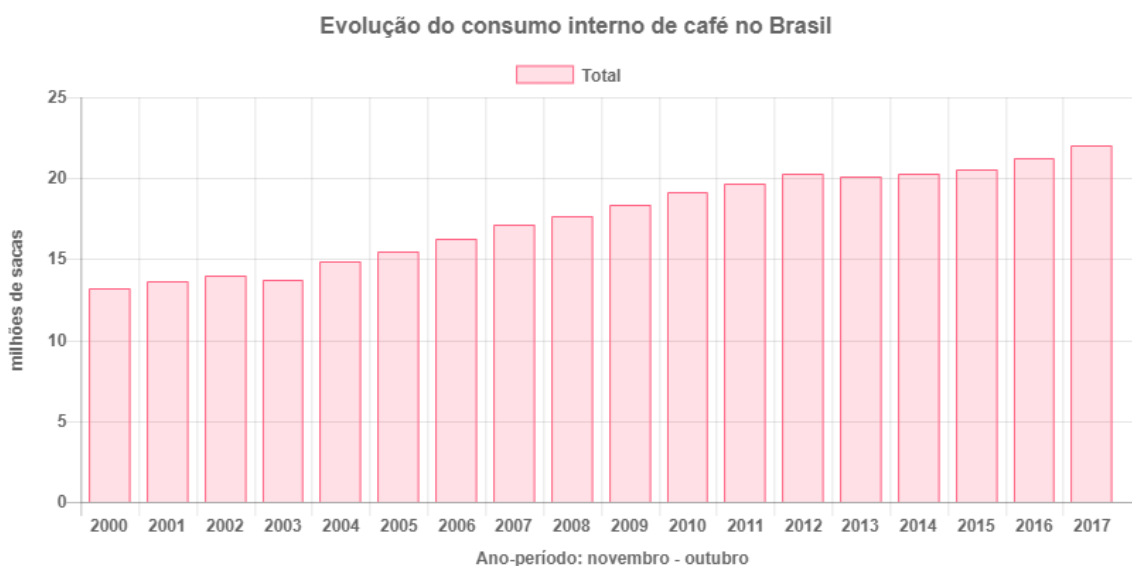
O café pertence à família *Rubiacea*, gênero *Coffea*, sendo que as principais espécies cultivadas economicamente no Brasil e no mundo são *Coffea arabica* e *Coffea canephora*, conhecidas internacionalmente como café arábica e café robusta, respectivamente, já que robusta é a variedade mais cultivada de *C. canephora*. No Brasil, a variedade de *C. canephora* mais cultivada é a Conillon. (CHARRIER, 1978; FAZUOLI, 1986; SAKIYAMA ET AL., 1999)

Nos últimos anos, o Brasil vem sendo o maior produtor e exportador mundial de café, além disso, o consumo interno brasileiro continua crescendo a cada ano. Para o mundo e para o Brasil, o café tem sido um produto muito importante no ponto de vista econômico, pois atualmente é o segundo produto mais comercializado do mundo, perdendo apenas em valor para o petróleo (ABIC, 2018).

O consumo brasileiro de café mantém-se quase estável e acima de 20 milhões de sacas. Em 2017, registrou-se um aumento de 0,8 milhões, totalizando 22 milhões de sacas, contra 21,2 milhões de sacas em 2016, conforme Figura 1. O consumo per capita resultou 5,10 kg habitante/ano de café torrado, em comparação com os 5,03 kg habitante/ano de café torrado em 2016 (ABIC, 2018).

Segundo a Conab, a produção dos Cafés do Brasil será de 58,04 milhões de sacas e a produção mundial de 160 milhões de sacas em 2018. A produção da espécie arábica no nosso País atingirá o volume de 44,33 milhões de sacas e a produção mundial desse tipo de café 97,43 milhões de sacas. Em relação à produção de café conilon, a safra será de 13,71 milhões de sacas no Brasil e de 62,24 milhões de sacas em nível mundial.

Figura 1: Evolução do consumo interno do café no Brasil



Fonte: ABIC 2018.

Desde seu cultivo até o produto final, o café chega às mesas de pessoas do mundo inteiro, gerando uma quantidade significativa de empregos e divisas para o Brasil, desta forma, este produto ocupa um lugar relevante na balança comercial. Entretanto, esta posição de liderança vem sendo gradativamente ameaçada por países que têm investido amplamente em pesquisa e *marketing* visando melhorar a qualidade do seu produto. Aos poucos, o café brasileiro vem deixando de ser popularmente conhecido como o melhor café do mundo para dar lugar ao café da Colômbia e de outros países da América Central, África e Oceania (ABIC, 2018).

Um conhecimento detalhado da composição química do café e sua relação com a qualidade do café brasileiro tornam-se indispensáveis para a valorização do produto, tanto no mercado interno quanto no mercado externo (FARAH, 2004).

2.1.1 Composição química do café

A composição química do café depende da espécie e da variedade em questão, e também de outros fatores como região de origem, práticas

agrícolas, grau de maturação do fruto do café, processamento, condições de estocagem. Durante a torra ocorrem diversas mudanças químicas, sendo elas grandes responsáveis pelo aroma e sabor final da bebida (TOLEDO, L. B.; BARBOSA, A. T, 1997).

O grão de café (café verde) possui além de uma grande variedade de minerais como potássio (K), magnésio (Mg), cálcio (Ca), sódio (Na), ferro (Fe), manganês (Mn), rubídio (Rb), zinco (Zn), cobre (Cu), estrôncio (Sr), cromo (Cr), vanádio (V), bário (Ba), níquel (Ni), cobalto (Co), chumbo (Pb), molibdênio (Mo), titânio (Ti) e cádmio (Cd); aminoácidos como alanina, arginina, asparagina, cisteína, ácido glutâmico, glicina, histidina, isoleucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, tirosina, valina; lipídeos como triglicerídeos e ácidos graxos livres, açúcares como sacarose, glicose, frutose, arabinose, galactose, maltose e polissacarídeos.

Adicionalmente o café também possui uma vitamina do complexo B, a niacina (vitamina B3, PP ou "Pelagra Preventing" do inglês) e, em maior quantidade que todos os demais componentes, os ácidos clorogênicos, na proporção de 7 a 10 %, isto é, 3 a 5 vezes mais que a cafeína, conforme mostra a Tabela 1. Porém apenas a cafeína é termo-estável, ou seja, não é destruída com a torrefação excessiva. As demais substâncias, como aminoácidos, açúcares, lipídeos, niacina e os ácidos clorogênicos, são preservadas, formadas ou mesmo destruídas durante o processo de torra (TOCI, 2006).

Os teores médios dos principais constituintes químicos dos cafés crus das espécies Arábica são eles: água (8 a 12 %), cafeína (1 a 2,5 %), proteínas (9 a 16 %), minerais (2,5 a 4,5 %), lipídios (10 a 18 %), carboidratos (20 a 25 %), sólidos solúveis (25 a 31 %), açúcares totais (5 a 10 %), açúcares redutores (0 a 5 %), ácidos clorogênicos (2 a 8,4 %) e a trigonelina (0,7 a 1,4 %). No entanto, essa composição química depende do grão cru, depende dos fatores genéticos, ambientais e condições de manejo pré e pós-colheita (CHAGAS, 1994).

Dentre esses compostos, sobressaem os açúcares, compostos fenólicos (ácidos clorogênicos), cafeína, compostos voláteis, ácidos graxos, proteínas e algumas enzimas, cuja presença, teores e atividades conferem ao café um sabor e aroma peculiares. A formação do aroma é um processo bastante

complexo, sendo que alguns de seus precursores são os lipídios, a sacarose e a trigonelina. Por outro lado, os ácidos clorogênicos e a cafeína são precursores da acidez do café (AGUIAR, 2005).

O conhecimento da composição química do café tem importância devido aos componentes que são originados a partir do processo de torrefação. Os ácidos orgânicos são quimicamente estáveis e os aldeídos podem ser oxidados a ácidos, assim como o ácido clorogênico, quando aquecido, quebra-se nos ácidos caféico e químico. Estas são as principais mudanças que ocorrem na bebida do café e muitas vezes, são também acompanhadas por alterações detectáveis no sabor (MENDONÇA, 2005).

Quadro 1: Substâncias Presentes no Grão de Café (conforme torra) e na Bebida.

Substância	Presente no grão na seguinte condição	Presente na bebida
Cafeína (1 a 2,5 %)	termo - estável	X
Niacina (0,5 %)	depende de torra ideal	X
Ácidos clorogênicos (2 a 8,4 %)	torra ideal	X
Aminoácidos	torra ideal	X
Sais Minerais	torra ideal	
Açúcares	torra ideal	
Lipídeos	torra ideal	
Diversos (pigmentos, cinzas, etc)	depende de torra ideal	X

Fonte: ABIC, 2018.

2.1.2 Processamento do café

As etapas de processo produtivo do café exigem cuidados, pois são fundamentais para a garantia de um alimento saudável e seguro. Sendo assim, a utilização de técnicas adequadas de colheita e pós-colheita do café são essenciais para obtenção de um produto de boa qualidade e com melhor rentabilidade (FERREIRA, 2010).

Na colheita, os frutos devem estar em seu ponto máximo de maturação, e não devem entrar em contato com a terra, para evitar a contaminação por microrganismos. Após a colheita os frutos devem passar por uma pré-limpeza, retirando as impurezas vindas do campo, e lavagem, o mais rápido possível, que tem a finalidade de retirar poeira e selecionar aqueles frutos que estão com diferentes fases de maturação (HALAL, 2008).

Dos processamentos dos grãos de café, o mais simples envolve procedimentos como seleção de semente, secagem dos grãos, torrefação e moagem dos grãos secos (HALAL, 2008).

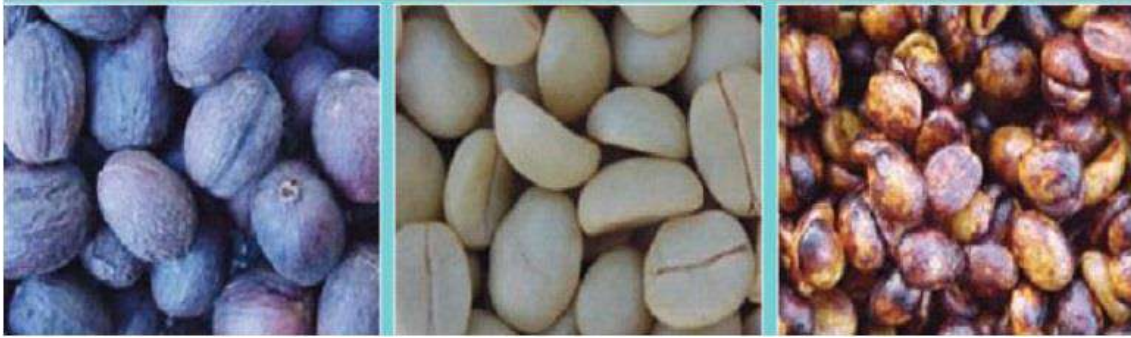
O café pode ser classificado por diferentes formas, em função do número de defeitos, tipo da bebida, grau de moagem e grau de torra. Na etapa de torrefação, ocorrem consideráveis mudanças químicas responsáveis pelo aroma e sabor final da bebida, que fazem do café um dos produtos mais modificados durante o processamento (HALAL, 2008).

2.1.2.1 Separação de sementes

A separação da polpa do fruto consiste na produção de café natural, café cereja descascado ou despulpado. Segundo Gonzalez (2004), o café natural é aquele processado por via seca, o qual o grão é seco com a polpa e a mucilagem, com isso permitindo a transferência do sabor adocicado ao grão. O café cereja descascado é aquele em que a polpa é completamente removida e a mucilagem não é, ou é apenas levemente removida.

A Figura 2 contém imagens do café natural, despulpado e cereja descascado.

Figura 2: Café natural, café despulpado e café cereja descascado



Fonte: GONZALEZ, 2004

2.1.2.2 Secagem dos grãos

Preparo do café por via seca

O produto sai direto da lavoura para ser seco com casca ao natural em terreiros ou secadores mecânicos. Antes de serem enviados a secagem, os frutos passam por equipamentos de lavagem e separação de café, a qual faz a limpeza, retirada de impurezas e seleção dos frutos, propiciando uma secagem específica e uniforme, melhorando a classificação de tipo do produto. Há o controle também dos grãos fermentados na planta, por efeito das condições climáticas, durante a mudança do estágio maduro para seco e contribui para melhorar a qualidade da bebida (GONZALEZ, 2004).

Preparo do café por via úmida

Trata-se do processo de preparo do café, tendo a fase de fermentação com posterior lavagem, para eliminação da mucilagem por processo fermentativo, originando o café despulpado, apresentando melhor classificação quanto ao tipo e bebida. Este preparo propicia a diminuição do volume para secagem, requerendo menor área de terreiro e com menos tempo de secagem, melhora também a qualidade do produto, porém exigem investimentos em

infraestrutura, maior requisição de mão de obra e elevado custo operacional (GONZALEZ, 2004).

Preparo do café por via semi-úmida

Este preparo do café se adota principalmente em regiões com alto índice de pluviosidade e umidade que prejudicam a colheita e a secagem dos grãos. Os frutos colhidos são colocados para secarem separadamente, havendo apenas a ocorrência do prévio descascamento dos frutos cereja, sem passar pelo tanque de fermentação, resultando no café cereja descascado de qualidade bem superior, apresentando uma melhor classificação de bebida, propiciada pela alta atividade da enzima polifenoloxidase, maior índice de coloração e mais baixo teor de acidez (GONZALEZ, 2004).

2.1.2.3 Torrefação e resfriamento

A torrefação é responsável pela transformação do grão verde em grão torrado para a confecção da bebida. Esse desenvolvimento está relacionado com o tempo e a temperatura utilizados durante o processo. Na Figura 3 pode-se visualizar o café verde e após a torrefação.

Figura 3: Café verde e após a torrefação



Fonte: (COFFEERESEARCH, 2018)

Primeiramente o café verde é colocado no elevador de grãos crus, o qual transportará a matéria-prima ao torrador. No torrador, que funciona a gás, o café passa pelo tratamento térmico a uma temperatura de 200 °C, num tempo de torra de no máximo 25 minutos para adquirir as características desejadas. Os voláteis provenientes da torra do café são liberados pelo sistema de exaustão do torrador. O café após torrado passará por um sistema de resfriamento através de ar frio por um tempo de 5 minutos. Depois dos grãos torrados e resfriados são depositados por sistema de elevador pneumático no silo para grãos torrados com capacidade para 1350 kg. Os voláteis provenientes do esfriamento dos grãos torrados são liberados pelo sistema de exaustão do resfriador. O resfriamento é um processo sucessivo e rápido que visa condensar no interior do grão as substâncias aromáticas, responsável pelo aroma e sabor do café, são dois métodos normalmente utilizados: ar ou água (GONZALEZ, 2004).

2.1.2.4 Descanso

É necessário que os grãos fiquem em repouso por um determinado período de tempo para que aconteça um equilíbrio da umidade interna do grão, sendo que após a torrefação, os grãos tornam-se mais leves devido à perda de umidade (MELLITA, 2018)

2.1.2.5 Moagem

Moagem é o processo no qual os grãos torrados são triturados até se transformarem em pó fino. Esses grãos de café devem ser conservados inteiros e frios antes da moagem. Ela é realizada em moinhos apropriados, observando-se a granulação correta. O processo de moagem prepara o café para uma filtragem mais rápida e uma melhor extração do aroma e sabor da bebida (MELITTA, 2018).

2.1.2.6 Embalagem

Depois de moído, o café é embalado a vácuo e colocado em embalagens cartonadas. Na presença de umidade o envelhecimento do café torrado é mais rápido, comprometendo a fragrância e o sabor da bebida, sendo que os aromas do café são sensíveis à oxidação atmosférica. Para manter o bom sabor e o aroma do café torrado e moído, retardando o processo de oxidação natural do produto, usa-se o processo de embalagem auto-vácuo (MELITTA, 2018).

Para HOFFMANN (2001) existem embalagens a vácuo que preservam as características do café por períodos de tempo maiores, podendo preservar o café em até 18 meses, porém, em embalagens tipo “almofada”, o prazo de consumo não deve exceder 180 dias.

2.1.2.7 Estocagem

Os grãos torrados e moídos precisam ser monitorados e armazenados de forma apropriada na fábrica, com a finalidade de evitar contaminações por microrganismos. A estocagem das embalagens prontas do café torrado e moído será feita na sala de estoque da indústria. Um armazém deve possuir o telhado perfeito; piso isolado do chão, a fim de ser evitada umidade, boa ventilação, tanto na parte inferior como na parte superior do armazém (GONZALEZ, 2004).

2.2 Micotoxinas

O termo micotoxina é derivado da palavra grega “mykes” que significa fungo e do latim “toxican” que significa toxinas. O termo é usado para designar um grupo de compostos produzidos por algumas espécies fúngicas durante seu crescimento (IAMANAKA et al., 2010).

Micotoxinas são toxinas produzidas pelo metabolismo secundário de fungos que ocorrem nos alimentos e rações, produzidas sob condições ambientais específicas, no campo, no período pós-colheita, durante o

armazenamento, processamento e distribuição (FREIRE et al., 2007). Existem muitos desses compostos, mas apenas alguns deles são regularmente encontrados em alimentos e rações animais como grãos e sementes. Porém, aqueles que realmente são encontrados em alimentos têm grande influência para a saúde do ser humano.

São diversos os efeitos de algumas micotoxinas relacionadas com alimentos, estes podem surgir muito rapidamente e caracterizar sintomas de doenças graves. Algumas micotoxinas que ocorrem em alimentos têm efeito crônico ou acumulativo sobre a saúde, influenciando em princípio de cânceres ou deficiência de imunidade (WHITAKER et al., 2005).

Existem cinco tipos de micotoxinas que ocorrem com bastante frequência em alimentos: deoxinivalenol ou nivalenol, zearalenona, ocratoxina, fumosinas e aflatoxinas. A produção de micotoxinas depende do crescimento fúngico, sendo assim pode ocorrer em qualquer época do crescimento, colheita, ou estocagem do alimento. Entretanto, o crescimento do fungo e a presença de toxinas não são sinônimos, porque nem todos os fungos produzem toxinas (IAMANAKA, B. T; OLIVEIRA, I. S; TANIWAKI, M. H, 2010).

Os principais fatores que desenvolvem o crescimento de fungos e conseqüentemente a produção de micotoxinas são:

- Umidade relativa do ar: Dependendo da umidade presente no alimento e no ambiente, haverá perda ou ganho de umidade no produto, favorecendo ou impedindo a proliferação dos fungos. A umidade relativa mínima onde os fungos crescem é de 80 %.
- Temperatura: O crescimento fúngico é sensível à temperatura. A temperatura mínima para o fungo crescer não é necessariamente a mínima para ele produzir toxina, o mesmo com a máxima. Em geral, a temperatura ótima para produzir toxinas está entre a temperatura mínima e a máxima para ele crescer.
- Atividade de água (aa): A produção de micotoxinas pode ocorrer na faixa de aa entre 0,60 a 0,90. Alguns podem sobreviver em produtos com aa tão baixa quanto 0,60, embora 0,70 seja o mínimo que sustém o crescimento de fungos de armazenamento (IAMANAKA et al., 2010).

Por conta disso, sua identificação e avaliação quantitativa geralmente requerem amostragem sofisticada, preparação de amostras, extração e técnicas de análise.

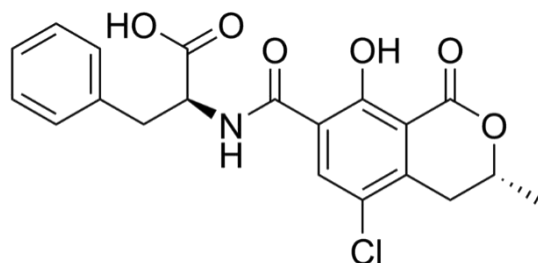
2.2.1 Ocratoxina A (OTA)

A ocratoxina A é uma micotoxina e pertence ao grupo de metabólito secundário, produzido por fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium*. Os mais importantes são: *Aspergillus ochraceus*, *A. carbonarius* e *A. niger* e pelo *Penicillium verrucosum* (FIB, 2009; FUJI et al.,2002).

Entre as ocratoxinas e análogos que compõem o grupo, a literatura relata a ocorrência de ocratoxina A, ocratoxina B, ocratoxina C, ocratoxina α , 4-hidroxi-ocratoxina A e outros. A OTA se destaca pela maior toxicidade em produtos de origem vegetal e animal (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2018).

Como mostra a Figura 4, quimicamente, a OTA (7-[L-bfenilalanilcarbonil] carboxil-5-cloro-8 hidroxi-3,4 diidro-3R metilisocumarina) consiste de uma diidroisocumarina ligada através de seu grupo 7-carboxil, por uma ligação amida, à L-fenilalamina. Sendo uma molécula de polaridade média e alta estabilidade térmica, é caracterizada pela presença do grupo cromóforos que lhe conferem propriedade fluorescente sob luz UV a 335 nm. O grupo da isocumarina lhe confere o caráter tóxico (FUJI et al.,2002).

Figura 4: Estrutura química da Ocratoxina A



Fonte: WIKIMEDIA, 2018

Essa micotoxina produzida por fungos é detectada em alguns alimentos, tais como: cereais e produtos de cereais (trigo, aveia, cevada, milho), soja,

frutas secas, cacau, cerveja, vinho, chá, frango e em cafés verdes, torrados e instantâneos (ANVISA, 2011).

A maioria dos fungos produtores de ocratoxinas são hidrofílicos e preferem ótimas condições de temperatura (20 a 25 °C), pH, atividade de água e necessidades nutricionais para a sua proliferação. Essa contaminação pode ocorrer durante a colheita, preparo, transporte e armazenamento. No café os fungos podem afetar sua coloração e composição nutricional (CORDEIRO,1990).

2.2.1.1 Toxicologia da Ocratoxina A

Os fatores que determinam a toxicidade de OTA são: os toxicocinéticos, que estão relacionados às alterações das concentrações do composto no organismo ao longo do tempo; e os toxicodinâmicos, relacionados às interações dinâmicas do composto e seus efeitos biológicos (RINGOT et al., 2006).

Após a sua absorção pelo trato gastrointestinal a OTA se liga às proteínas do soro, com um alto grau de afinidade de ligação. Depois da sua reabsorção pelo intestino ela volta para a circulação, como uma consequência da reciclagem biliar, favorecendo a redistribuição sistemática em direção aos diferentes tecidos. Além disso, a reabsorção da OTA ocorre nos túbulos renais, proximais e distais. Sua acumulação ocorre principalmente no sangue, fígado e rins. Sendo o fígado e os rins os principais órgãos responsáveis pela biotransformação da OTA. O seu metabolismo ainda não foi elucidado com detalhes (RINGOT et al., 2006).

A OTA é um composto tóxico, acumulativo, com rápida absorção e lenta eliminação. A via de eliminação da OTA ocorre pelas fezes e principalmente pela urina, onde as excreções desempenham papéis importantes na depuração plasmática da toxina. Além da excreção renal e fecal, a excreção através do leite nos mamíferos parece ser também relativamente eficaz. A contribuição relativa de cada rota de excreção é influenciada pela via de administração, a dose, o seu grau de ligação com as proteínas plasmáticas e a sua circulação entero-hepática (WHO & FAO, 2001).

Os mecanismos envolvidos decorrem da redução na síntese protéica por inibição competitiva na atividade de fenilalanina-RNA-sintase, devido à semelhança estrutural entre OTA e fenilalanina; inibição de respiração mitocondrial com depleção de síntese de ATP e aumento na peroxidação lipídica (FUJII et al.,2002; CORDEIRO, 1990).

A nefrotoxicidade em humanos foi sustentada pela provável associação de OTA com a Nefropatia endêmica dos Balcãs (BEM), uma difusão renal crônica degenerativa capaz de induzir falência renal (FUJII et al.,2002).

A Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer (IARC) afirma que os dados obtidos a partir de animais de laboratório não são suficientes para calcular o grau de carcinogenicidade da OTA em humanos e por esta razão a toxina foi classificada como um possível carcinógeno para humanos (grupo 2B). Baseando-se em estudos promovidos pelo *Nordic Council of Ministers*, o *Joint Expert Committee on Food Additives* (JECFA), calculou-se o nível tolerável provisório de ingestão diária para OTA como 14 µg por kg de peso corpóreo por dia. Este composto é nefrotóxico, teratogênico, imunotóxico e carcinogênico de acordo com classificação da IARC (IARC, 1993).

2.3 Legislação Brasileira

Segundo a Resolução – RDC nº 277, de 22 de setembro de 2005 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o café torrado é o grão beneficiado do fruto maduro de espécies do gênero *Coffea*, submetido a tratamento térmico até atingir o ponto de torra escolhido.

Os limites máximos para ocratoxina A no café torrado são regulamentados em vários países, incluindo o Brasil. A União Europeia (UE) recomenda níveis máximos de tolerância de 5,0 µg/kg para OTA no café torrado e moído e 10,0 µg/kg no café solúvel destinado a comercialização. No Brasil, a ANVISA através da Resolução – RDC Nº 7, de 18 de fevereiro de 2011, recomenda um nível de 10,0 µg/kg como limite máximo tolerado para o café torrado (moído ou em grão) e café solúvel.

Existem relatos de alguns casos de contaminação de café por OTA. O primeiro deles foi em níveis de 0,2 e 360 µg/kg em amostras naturalmente contaminadas (LEVI et al.,1974; MANTLE, 2002). Pesquisas em todo o mundo

confirmaram a presença da OTA em café verde, torrado e solúvel em níveis variando de 20 a 360 µg/kg em café verde e 3,2 a 17 µg/kg em café torrado.

Esta diferença de teores entre o café verde e torrado pode ser explicada pela redução de OTA durante o processo de torrefação descrito em alguns estudos que pode se chegar a 90 % (MASOUD & KALTOFT, 2006). A maior frequência da contaminação por OTA tem sido observada em algumas áreas com climas semi tropicais e temperados, entretanto nenhum país produtor está totalmente livre de contaminação, incluindo o Brasil (ALMEIDA et al., 2007; CODEX, 2007; FURLANI, 1998).

2.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A cromatografia é conhecida por ser uma técnica de separação utilizando uma fase estacionária e uma fase móvel, que dependendo da natureza de cada uma dessas podem ser classificadas diferentemente (LANÇAS, F. M, 2009).

Dentre as mais diversas modalidades de cromatografia, é necessário escolher a que melhor atende às necessidades do método analítico pretendido. Para este trabalho, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é a que melhor se adequa aos requisitos para a análise de ocratoxina A, apresentando os resultados mais satisfatórios, devido às características físico-químicas dessa substância (INDEX MERCK, 1996).

A cromatografia pode ser combinada a diferentes sistemas de detecção, sendo assim umas das técnicas analíticas de melhor desempenho (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2014).

Existem diversos tipos de detectores disponíveis, dentre eles temos, detector por absorvância na região do visível, por fluorescência, por índice de refração, eletroquímico e por espectrometria de massas (EM). A utilização deste último caracteriza o sistema CLAE-EM, no qual sua complexidade e peculiaridade serão mencionadas adiante (CUNHA, C. P., 2010).

2.4.1 Espectrometria de massas em série (EM/EM)

A espectrometria de massas é uma das técnicas mais importante de análise molecular devido ao seu potencial em fornecer informações de massa molar e a estrutura do analito. É muito utilizada para análise de traços (baixas concentrações) de compostos orgânicos e em misturas complexas. (LANÇAS, 2010).

No acoplamento da CLAE à EM, foram encontrados alguns problemas relacionados à vazão do eluente e a forma de ionização da molécula, pois os compostos que são separados por CLAE são pouco voláteis e/ou sensíveis à temperatura, de maneira que não seria possível ionizá-los utilizando as técnicas de ionização mais comumente aplicadas na EM. Desta forma, para o acoplamento da CLAE à EM foi necessário o desenvolvimento de interfaces e de formas de ionização alternativas. Sendo uma delas a ionização por eletronebulização (*electrospray ionization*) – IEN, na qual um “spray” é produzido com auxílio de uma corrente elétrica (CUNHA, C. P, 2010).

Na IEN, o líquido no qual o analito de interesse encontra-se dissolvido, conhecido como fase móvel, passa através de um capilar, à pressão atmosférica, mantido sob alta voltagem. Na saída do capilar são formadas pequenas gotas altamente carregadas (“spray”) que são dessolvatadas ao se deslocarem em sentido contrário ao posicionamento de um eletrodo em uma região de pressão atmosférica. A dessolvatação é assistida por um fluxo contínuo de gás seco (geralmente N₂) na região do “spray”. À medida que ocorre a dessolvatação, o tamanho das gotas é reduzido até o ponto em que a força de repulsão entre as cargas similares fica maior que as forças de coesão da fase líquida (tensão superficial). Neste momento uma série de explosões passa então a acontecer até que são produzidos íons do analito a partir destas gotas, os quais são transferidos para o interior do espectrômetro de massas por uma série de dispositivos de focalização (LANÇAS, 2010; CHIARADIA et al., 2008).

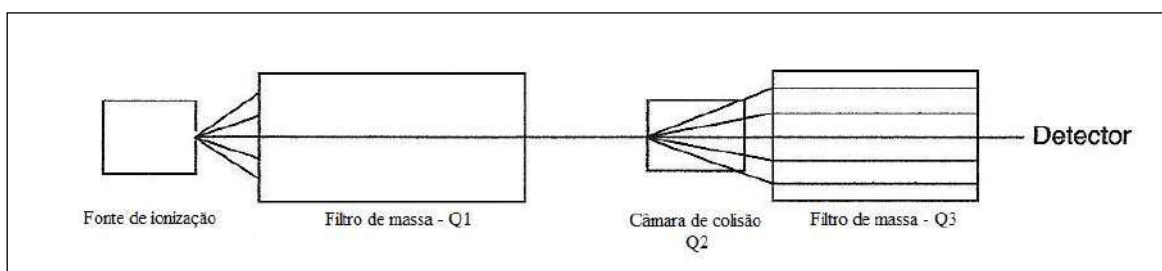
A técnica de espectrometria de massas dispõe de cinco etapas: introdução de amostra, fonte de íons, analisador de massas, detector e processamento de dados. A amostra é introduzida diretamente no sistema através de bomba infusora ou indiretamente após ter passado por um processo

de separação, como o que ocorre no cromatógrafo líquido. A ionização acontece na fonte de íons onde se tem o processo de produção dos íons, que são encaminhados para o analisador. No analisador, esses íons são separados, com auxílio de diferentes campos elétricos ou magnéticos, de acordo com a relação entre a massa da espécie e a sua carga elétrica (relação massa/carga ou m/z). Os íons separados no analisador são encaminhados para um detector, gerando uma corrente elétrica, que é analisada, no processador de dados, por um software adequado produzindo os espectros de massas. (BECKER et al., 1998; LANÇAS, 2010).

Existem vários tipos de analisadores de massas, o mais usado é provavelmente o triplo quadrupolo, que consiste em três quadrupolos acoplados em série (Q1, Q2 e Q3). O quadrupolo é constituído de quatro hastes, os pares opostos das hastes estão conectados eletricamente e uma voltagem com radiofrequência fora de fase é aplicada entre eles. Em um valor específico de voltagem, íons de uma determinada m/z atravessam o quadrupolo descrevendo uma trajetória estável (ARDREY, 2003).

O instrumento EM/EM consiste no acoplamento em série de uma fonte de ionização, um filtro de massa quadrupolar (Q1), um quadrupolar fixo ou câmara de colisão (Q2), um segundo filtro de massas quadrupolar (Q3) e o detector (DE GRANDE & NETO, 1990). A Figura 5 apresenta um esquema geral da espectrometria de massas em série.

Figura 5: Esquema geral da espectrometria de massas em série



Fonte: CUNHA et al., 2010

2.5 Experimental

O processo de certificação de um material de referência é totalmente dependente do preparo, da determinação analítica e das características físico químicas do material. A caracterização de um material e a determinação de um

ou mais valores das propriedades químicas, físicas, biológicas ou tecnológicas devem ser relevantes ao uso proposto (ABNT, 2011).

O estudo de homogeneidade é requerido a fim de mostrar se as unidades de um lote são homogêneas entre elas. Um material é considerado homogêneo em relação a uma determinada propriedade se a diferença entre os valores desta propriedade é desprezível se comparada com uma das componentes de incerteza do material (ABNT, 2012).

Desta forma, objetivando a produção de Material de Referência de Ocratoxina A no café torrado, bem como o processo de certificação do mesmo, foi realizado um estudo da temperatura de referência na qual se avaliou o preparo, a homogeneidade e a temperatura ideal para estocagem do lote envasado.

2.5.1 Preparo do Café Torrado e Moído

As amostras de café verde em grãos foram colhidas através da técnica de derriça e classificadas como sendo da espécie Arábica, bebida dura, variedade Mundo Novo e Catuaí obtidas do Leste de Minas Gerais.

A) Processo de torrefação

O processo de torra do café foi realizado em torrador elétrico (Leogap, na empresa Armazém do Café/RJ). As condições estabelecidas foram à temperatura de 145-150 °C por 12-15 minutos para obtenção do ponto de torra convencional (média), torrefação mais comercializada no país.

B) Processo de moagem

A moagem do café torrado foi realizada no moinho modelo M-50 da marca Leogap, obtendo um café moído com granulometria fina número 1.

C) Processo de peneiração

O café torrado foi peneirado em Agitador eletromagnético de peneiras da marca Bertel, por 5 minutos na intensidade 10, a fim de separar partículas sólidas em frações de granulometria diferente.

D) Processo de secagem

O processo de secagem do café é de grande importância. Esse processo foi feito através de liofilização, que é um processo de desidratação de produtos sob baixa pressão (vácuo) e baixas temperaturas. O processo de secagem ocorre através de sublimação da amostra congelada, sem ocorrer à perda das propriedades da amostra seca.

A amostra foi liofilizada em liofilizador modelo L10 da marca Liobras, na temperatura -40 °C por 48 horas.

2.5.2 Preparo de Soluções

A) Fase Móvel

A fase móvel otimizada para este método consistiu-se em uma mistura contendo acetonitrila com 0,1 % de ácido fórmico e água com 0,1 % de ácido fórmico (80:20, v/v).

Fase Móvel A

Em um balão volumétrico de 500 mL adicionou-se 200 mL de água tipo I com o auxílio de uma proveta de 500 mL, e com o auxílio de um pipetador automático adicionou-se 500 µL de ácido fórmico grau HPLC. Após isso, avolumou-se com água tipo I até o menisco, homogeneizou-se a solução vertendo o balão tampado de cima para baixo, e transferiu-se para uma garrafa

limpa e identificada. A fase móvel foi filtrada em membrana GV (Durapore) em PVDF 0,22 µm de poro.

Fase Móvel B

Em um balão volumétrico de 500 mL adicionou-se 200 mL de acetonitrila grau HPLC com o auxílio de uma proveta de 500 mL, e com o auxílio de um pipetador automático adicionou-se 500 µL de ácido fórmico grau HPLC. Após isso, avolumou-se com acetonitrila grau HPLC até o menisco, homogeneizou-se a solução vertendo o balão tampado de cima para baixo, e transferiu-se para uma garrafa limpa e identificada. A fase móvel foi filtrada em membrana GV (Durapore) em PVDF 0,22 µm de poro.

Mistura Fase Móvel A/B

Com auxílio de uma proveta graduada de 100 mL, mediu-se 20 mL da fase móvel A, transferindo-se para um balão volumétrico de 100 mL, e completou-se com a fase móvel B até o menisco, sendo a solução vertida de cima para baixo para ser homogeneizada, e depois transferida para uma garrafa limpa e identificada.

B) Solução padrão estoque de Ocratoxina A (OTA)

- **Solução 1**

Através do septo do frasco que contém o padrão de OTA (1,0 mg) na forma de cristais, com o auxílio de uma seringa de 5,0 mL de polipropileno descartável, introduziu-se um volume de 5,0 mL da solução de tolueno:ácido acético (99:1, v/v). A solução foi agitada vigorosamente em vórtex por 30 segundos.

- **Solução 2**

Sem romper o septo do frasco, com o auxílio de uma seringa de 5,0 mL de polipropileno descartável, retirou-se 1,0 mL da Solução 1 de OTA e transferiu-se para um balão volumétrico de 5,0 mL contendo solução de diluição tolueno:ácido acético (99:1, v/v). Agitou-se vigorosamente vertendo o balão e completou-se o volume até o menisco. Homogeneizou-se em vórtex por 30 segundos.

- **Solução 3**

Em um frasco de vidro de 5 mL, previamente descontado a tara, pesou-se uma massa de 0,29423 g da Solução 2 de OTA de 40 µg/g, preparada anteriormente de acordo com a recomendação da AOAC. Em uma garrafa de vidro âmbar de 250 mL, previamente descontado a tara, pesou-se 100,081 g de fase móvel A/B (mistura contendo acetonitrila com 0,1 % de ácido fórmico e água com 0,1 % de ácido fórmico (80:20, v/v)). Em seguida, cuidadosamente foi inserido o frasco de 5 mL contendo a solução de OTA no interior da garrafa âmbar, a solução foi homogeneizada vertendo a garrafa tampada de cima para baixo, obtendo uma solução final na concentração de 105,69491 ng/g de OTA. Esta solução é usada para contaminação do café torrado.

C) Solução padrão interno de Ocratoxina A ([¹³C₂₀] Ocratoxina A)

Em um frasco de vidro de 5 mL, previamente descontado a tara, pesou-se uma massa de 0,76138 g do padrão de [¹³C₂₀] Ocratoxina A. Em uma garrafa de vidro âmbar de 250 mL, previamente descontado a tara, pesou-se 100,885 g de fase móvel A/B (mistura contendo acetonitrila com 0,1 % de ácido fórmico e água com 0,1 % de ácido fórmico (80:20, v/v)). Em seguida, cuidadosamente, foi inserido o frasco de 5 mL contendo a solução de OTA no interior da garrafa âmbar, homogeneizou-se a solução vertendo a garrafa tampada de cima para baixo, obtendo uma solução final na concentração de 93,39457 ng/g de [¹³C₂₀] Ocratoxina A.

2.5.3 A análise

A metodologia de análise foi desenvolvida e validada previamente para determinação e quantificação de Ocratoxina A no café torrado por Cromatografia Líquida de alta Pressão acoplada a Espectrometria de Massas (CLAE-EM/EM), modelo Xevo-TQ, Intellistart, z spray (Waters). Todo o estudo de Temperatura de Referência (homogeneidade e estabilidade) se baseou na metodologia descrita a seguir (CAMPOS, E. G., RIBEIRO, T. S., 2014).

A separação cromatográfica foi realizada através de uma coluna AcquityUPLC® Beh C₁₈ (50 mm x 2,1mm x1,7µm, Waters) com forno a temperatura de 40 °C. O modo de eluição estabelecido foi o isocrático e o volume de injeção de 10 µL. A composição da fase móvel utilizada no sistema CLAE-EM/EM consistiu em ácido fórmico em acetonitrila (0,1 %, Solvente A) e ácido fórmico em água (0,1 %, Solvente B) (80:20) com fluxo de 0,3 mL/min (CAMPOS, E. G., RIBEIRO, T. S., 2014).

As condições do espectrômetro de massas foram otimizadas e as transições selecionadas de acordo com suas energias de colisão foram: $m/z404,10>239,0$ (24V) $m/z404,10>358,00$ (15V); $m/z424,20>250,10$ (24V) e $m/z424,20>377,20$ (15V) para Ocratoxina A e Ocratoxina A marcada isotopicamente ([¹³C₂₀] Ocratoxina A), analito e padrão interno respectivamente. A transição de maior intensidade na energia de colisão foi utilizada para a quantificação, sendo m/z 239 e m/z 250 para OTA e OTA ([¹³C₂₀] Ocratoxina A), respectivamente. As demais transições (404,10>358,00 e 424,20>377,20) foram utilizadas para confirmação do analito e do padrão interno, respectivamente. O modo de ionização selecionado foi de eletronebulização positivo (IEN+) com Monitoramento de Múltiplas Reações (MMR). As transições selecionadas de acordo com a maior intensidade (CAMPOS, E. G., RIBEIRO, T. S., 2014).

2.5.4 Produção do MRC

As quatro etapas relacionadas a produção do mini lote do candidato a MRC de OTA no café torrado foram: Contaminação, Secagem, Homogeneização e Envase.

Etapa 1. Contaminação

Esta etapa consistiu na contaminação de 120,1 g de café torrado com uma massa de 0,12342 g de Solução de Ocratoxina A na concentração de 93,107 µg/mL para obtenção de um lote de 2,0 kg na concentração de 5,0 ng/g.

Em uma balança analítica de resolução 0,00001 g em um frasco de vidro de 4,0 mL, previamente tarado, pesou-se uma massa de 0,12342 g da Solução de Ocratoxina A na concentração de 93,107 µg/mL.

Em outro frasco de vidro Schott® de 500 mL, foi pesado 200 mL de Metanol grau HPLC que equivale a massa de 156,946 g. Em seguida inseriu-se o frasco de 4,0 mL contendo a massa de 0,12342 g da Solução de OTA no interior do frasco contendo a massa de Metanol. Esta garrafa tampada foi levada ao vórtex por 30 segundos, obtendo assim uma solução homogeneizada para contaminar a massa de café. Com auxílio de um funil de vidro foi transferida esta solução para um balão usado no rotaevaporador, contendo a massa pesada de café torrado. O café contaminado com Ocratoxina A em metanol foi levado ao rotaevaporador (Büchi, Modelo R-215) por 1 h e 15 minutos nas condições de pressão de 511 mbar e temperatura no banho de aquecimento de 69 °C.

Após isso, o café foi deixado em repouso até chegar à temperatura ambiente (20 °C). Com o auxílio de um bastão de vidro, o café foi retirado do balão e pesado em recipiente totalizando uma massa de 98,8 g. Este foi tampado com papel alumínio e transportado para a estufa à vácuo (Marconi, Modelo M-30).

Etapa 2. Secagem

Esta etapa tem como objetivo a eliminação do metanol residual através da utilização da estufa à vácuo (Marconi, Modelo M-30). A massa de café que saiu do rotaevaporador na etapa de contaminação foi então seca sob temperatura de 30°C e pressão de -720 mmHg, utilizando um tempo total de 21 horas. Após este tempo, a massa total de café contaminado foi dividida gravimetricamente em duas partes iguais de massa de café contaminado, 49,0 g cada.

Etapa 3. Homogeneização

Esta etapa tem como objetivo a utilização de um homogeneizador (GUM-12, Geiger) no preparo do mini lote do café torrado e moído contaminado com Ocratoxina A.

Cada parte de massa de café pesada (49,0 g) foi misturada cada uma com uma parte de café puro (não contaminado) com massa de 951,0 g para que o mini lote tivesse 2 Kg no final. Desta forma, a primeira parte, massa de 49,0 g, foi homogeneizada com uma parte do café puro (não contaminado), massa de 951,0 g, por 20 minutos no homogeneizador de pós na velocidade 1 (pote A). O mesmo ocorreu com a segunda parte, que também foi homogeneizada por 20 minutos na velocidade 1 (pote B).

Cada pote após a homogeneização foi subdividido em partes iguais. O pote A foi subdividido em A1 e A2. O pote B, após a homogeneização foi subdividido em B1 e B2. Esta divisão foi realizada em balança, obtendo a divisão com massas exatas.

O pote contendo a massa A2 se uniu ao pote B1 (pote C), o pote contendo a massa A1 se uniu a massa B2 (pote D), ambos os potes foram homogeneizados em separado por 20 minutos. Nova divisão foi realizada, o pote C foi dividido em duas partes C1 e C2, e o pote D em D1 e D2. O pote C1 se uniu ao pote D2, sendo nomeado pote E; o pote C2 se uniu ao pote D1, sendo nomeado pote F, ambos foram homogeneizados em separado por 20

minutos na velocidade baixa. Por fim, os potes E e F foram envasados. O tempo total de homogeneização sem interrupções foi de duas horas (2 h).

Etapa 4. Envase

Para o preparo do mini lote foram utilizados 30 frascos, todos devidamente numerados de acordo com sua ordem de envase. Todo o mini lote foi envasado manualmente em frasco âmbar de borosilicato na capacidade de 100 mL. Cada frasco contém a massa de 50,0 g de café torrado e moído.

Após o envase, 10 (dez) frascos foram selecionados de maneira aleatória para serem submetidos ao estudo de homogeneidade e 20 (vinte) frascos para o estudo da temperatura de referência.

2.5.4.1 Homogeneidade

Os 10 frascos selecionados para o estudo de homogeneidade foram CT_2, CT_8, CT_14, CT_28, CT_19, CT_17, CT_4, CT_21, CT_12, CT_26 e em dois frascos foram realizadas duplicatas verdadeiras na etapa de extração, CT_17_2 e CT_8_2. Todas as injeções foram realizadas em triplicatas falsas.

Os picos cromatográficos foram obtidos, integrados e as concentrações de Ocratoxina A determinadas. Os resultados obtidos de cada frasco destinado ao estudo de homogeneidade foram tratados estatisticamente através da ferramenta de análise de variância (ANOVA) do Microsoft Excel, que permite calcular o desvio padrão entre as unidades do material (S_{bb}). A estimativa da incerteza associada à homogeneidade do material foi calculada de acordo com o ISO GUIDE 35. A incerteza da homogeneidade (u_h , S_{bb} , u_{bb}) entre as unidades é calculada de acordo com as características dos dados obtidos. Se a variância entre amostras (MQ_{entre}) for maior que a variância dentro de uma mesma amostra (MQ_{dentro}), a fórmula utilizada será:

$$S_{bb} = \sqrt{\frac{MQ_{entre} - MQ_{dentro}}{n}} \quad (1)$$

MQ_{entre} = Média Quadrática entre unidades

MQ_{dentro} = Média Quadrática dentro das unidades

n = número de replicatas.

Caso a variância entre amostras (MQ_{entre}) seja menor que a variância dentro de uma mesma amostra (MQ_{dentro}), a medição apresenta repetitividade insuficiente, e a fórmula utilizada será:

$$u_{bb} = \sqrt{\frac{MQ_{dentro}}{n}} \times \sqrt[4]{\frac{2}{gl_{MQ_{dentro}}}} \quad (2)$$

MQ_{entre} = Média Quadrática entre unidades

MQ_{dentro} = Média Quadrática dentro das unidades

$gl_{MQ_{dentro}}$ = graus de liberdade do MQ dentro

n = número de replicatas

Para maior critério, a incerteza da homogeneidade considerada será a maior entre as duas calculadas de acordo com as fórmulas descritas acima.

Para calcular a contribuição da heterogeneidade do material, utilizou-se a equação a seguir:

$$C(\%) = \frac{u(h) \times 100}{\bar{X}} \quad (3)$$

u (h) = Incerteza da Homogeneidade do material

\bar{X} = Média de todas as Medições do estudo

2.5.4.2 Temperatura de Referência (4 °C e -20 °C)

O estudo de temperatura de referência foi conduzido utilizando 20 frascos do candidato a MRC escolhidos de forma aleatória. Quatro desses frascos foram armazenados selecionados na temperatura de -80 °C (CT_24, CT_9, CT_16 e CT_1), dois destes analisados como tempo zero. Oito frascos (CT_31, CT_5, CT_3, CT_13, CT_29, CT_15, CT_25 e CT_22) foram armazenados na temperatura de 4 °C (geladeira) e outros oito frascos (CT_27, CT_11, CT_20, CT_6, CT_23, CT_10, CT_18 e CT_7) foram estocados na temperatura de -20°C (freezer). O estudo de temperatura de referência foi avaliado em 5 pontos de ambientação, nos tempos de 0, 7, 14, 21 e 30 dias.

O deslocamento dos frascos ocorreu de acordo com o seguinte procedimento, a cada semana (7 dias) dois frascos foram retirados da geladeira (4 °C) e outros dois frascos do freezer (-20 °C), foram deslocados para o freezer -80 °C. No final de 4 (quatro) semanas, todos os frascos foram retirados do freezer a -80 °C e analisados simultaneamente por CLAE-EM/EM com alta pressão.

O estudo de temperatura de referência foi conduzido de modo isócrono, ou seja, amostras individuais foram preparadas ao mesmo tempo, sob condições idênticas, ou seja, sob condições de repetitividade.

A estabilidade do material para cada temperatura foi avaliada através da Análise de Tendência dos valores de propriedade obtidos ao longo do tempo, este teste consiste em observar se a regressão linear dos valores de propriedade apresenta alguma tendência. Os resultados dos frascos analisados que foram submetidos às duas temperaturas estudadas (4 °C e -20 °C) foram tratados estatisticamente através da ferramenta de Análise de Regressão do Microsoft Excel. Os critérios de aceitação para que o material seja considerado estável, são que o coeficiente angular seja próximo de zero (Variável X1) e valor p (p level) maior que 0,05.

A incerteza da estabilidade foi calculada multiplicando-se o valor do erro padrão correlacionado com a linha referente à variável X1, pelo tempo de

estudo em semanas. A incerteza associada à estabilidade foi calculada a partir da equação a seguir:

$$u_{estab} = s(b1) \times t \quad (4)$$

$s(b1)$ = erro padrão

t = tempo de estudo

2.5.5 Quantificação de Ocratoxina A

A quantificação do analito foi realizada por diluição isotópica, utilizando como padrão interno a Ocratoxina A marcada isotopicamente ($[^{13}\text{C}_{20}]$ Ocratoxina A).

A curva de calibração em matriz (café torrado) foi preparada na faixa linear de 2-15 ng/g compreendendo entre os pontos equidistantes de 2,0; 5,0; 8,0; 11,0 e 15,0 ng/g (nível 1, 2, 3, 4 e 5) para Ocratoxina A e na concentração de 8,0 ng/g para $[^{13}\text{C}_{20}]$ Ocratoxina A, partindo das soluções de Ocratoxina A e de $[^{13}\text{C}_{20}]$ Ocratoxina A na concentração de 105,69 ng/g e de 93,39 ng/g, respectivamente. Em uma balança analítica calibrada com resolução de 0,001 g, pesou-se 6,0 g de café torrado em uma garrafa de vidro Schott® de 500 mL, e a este foi adicionado uma massa de solução padrão de OTA e de padrão interno conhecida, a fim de obter a concentração alvo para a faixa de trabalho determinada, conforme a Tabela 1.

Tabela 1. Massas alvo para curva de calibração em matriz na faixa de trabalho de 2,0 - 15,0 µg/kg.

Ponto	Ocratoxina A		¹³ C ₂₀ Ocratoxina A	
	Concentração alvo (µg/kg)	Massa alvo de solução	Concentração alvo (µg/kg)	Massa alvo de solução
01	2,0	0,11350	8,0	0,51378
02	5,0	0,28455	8,0	0,51523
03	8,0	0,45429	8,0	0,51412
04	11,0	0,62465	8,0	0,51412
05	15,0	0,85392	8,0	0,51540

Para o procedimento de extração das amostras de café torrado, em uma balança analítica calibrada pesou-se 6,0 g de café torrado em uma garrafa de vidro Schott âmbar de 500 mL e fortificou-se com uma solução de padrão interno (concentração alvo de 8,0 ng/g) e em seguida foi realizado o procedimento de extração. A amostra fortificada foi transferida para um extrator tipo *blender* e extraída com 190,0 g da mistura Metanol: Bicarbonato de sódio 3,0 % (1:1) na velocidade baixa por 5 minutos. O extrato foi filtrado, sob vácuo, utilizando três filtros sequenciados (filtro qualitativo, membrana de fibra de vidro e de celulose). Uma alíquota de 5,0 mL foi então recolhida e pesada em balão volumétrico de 100 mL e avolumou-se com solução tampão fosfato salina até o menisco e homogeneizou-se vertendo o balão tampado de baixo para cima.

Para a etapa de limpeza (clean up), foi conectado a coluna de imunoafinidade (IA), em temperatura ambiente (20 °C), no manifold de vidro, sob vácuo. Retirou-se a tampa preta da IA Ochratest WB e conectou-se a seringa de polipropileno de 60,0 mL na IA. Desta forma a disposição final ficou de cima para baixo, a seringa de polipropileno de 60,0 mL (primeira), logo abaixo a IA, o manifold por último. Transvazou-se através da coluna de polipropileno todo o extrato diluído em tampão fosfato salino (conteúdo do balão volumétrico de 100 mL), ajustando o fluxo de 2,0 - 3,0 mL/min, lentamente, sem deixar secar a coluna de IA. Em seguida, o balão volumétrico de 100,0 mL foi rinsado com duas porções de 5,0 mL de água Tipo 1 e eluiu

este conteúdo pela IA. Secou-se a coluna aplicando vácuo durante 30 segundos. Foi colocada dentro do manifold uma estante com tubos de ensaio para a realização da coleta do extrato. A OTA foi eluída com 4,0 mL de metanol em tubo de ensaio de 10,0 mL, procedendo da seguinte forma: inicialmente colocou-se 2,0 mL de metanol pela IA, deixou eluir uma gota e aguardou-se 3 minutos. Após esse tempo conectou-se uma seringa de 10 mL a IA e o êmbolo da seringa foi puxado permitindo desta forma que o solvente permeasse várias vezes o adsorvente liberando o analito de interesse, este processo denomina-se flush up. Passou-se os 2,0 mL restantes de metanol. O eluído foi evaporado à secura sob vapor de nitrogênio (N²) à 37 °C em banho-maria. Foi reconstituído com 1,0 g de fase móvel e homogeneizado em vórtex por 30 segundos. Após isso o extrato foi filtrado em unidade filtrante MILLEX em polietileno c/ membrana PTFE (Millipore, 0,22 µm, 13 mm) e transferido para vial. O volume de injeção no CLAE-EM/EM foi de 10 µL.

Capítulo 3: RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Resultados

3.1.2 Homogeneidade

Os resultados encontrados do teor de Ocratoxina A no café torrado para os frascos separados para a averiguação da homogeneidade do mini lote foram avaliados através da análise de variância (ANOVA), de acordo com a Tabela 2.

Tabela 2. Resultados da ANOVA para o Mini Lote de Ocratoxina A no Café Torrado.

ANOVA						
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	$F_{\text{calculado}}$	<i>valor-P</i>	F_{tabelado}
Entre grupos	0,65491634	11	0,059538	1,796984	0,111319	2,216309
Dentro dos grupos	0,79517012	24	0,033132			
Total	1,450086461	35				

Com a análise de variância o valor de $F_{\text{calculado}}$ (1,796) foi menor que o F_{tabelado} (2,216) o que caracteriza a homogeneidade do lote. Desta forma, as etapas relacionadas ao preparo do mini lote de Ocratoxina A no café torrado se mostraram adequadas para o fim pretendido. Além disso, o valor da Média Quadrática entre as unidades (0,059) apresentou-se maior do que a Média Quadrática dentro das unidades (0,033), a incerteza da homogeneidade foi calculada e encontrou-se $u(h)$ de 0,094.

O percentual de não homogeneidade encontrado foi no valor de 3,41 %, o que foi considerado satisfatório quando comparado ao nível de heterogeneidade do Material de Referência Certificado de Ocratoxina A no café torrado (ERM-BD475) produzido pelo laboratório designado pelo PTB na Alemanha (BAM), no valor de 3,01 %.

3.1.3 Temperatura de Referência (4 °C e -20 °C)

Os resultados dos frascos candidatos a MRC de OTA no café torrado que foram submetidos à temperatura estudada de 4 °C e -20 °C foram tratados estatisticamente através da ferramenta de Análise de Regressão do Microsoft Excel e os resultados encontram-se na Tabela 3 e Tabela 4, respectivamente.

Na Tabela 3, o valor-p (0,08145) encontrado indica que a instabilidade é insignificante para uma probabilidade de abrangência de 95,0 % quando este valor-p for maior que 0,05. Além disso, o coeficiente angular (variável x1) foi de -0,05, próximo de zero. Estes resultados demonstram que a regressão não é significativa e o material é considerado estável a esta temperatura de 4 °C uma vez que não há existência de relação linear entre os dados.

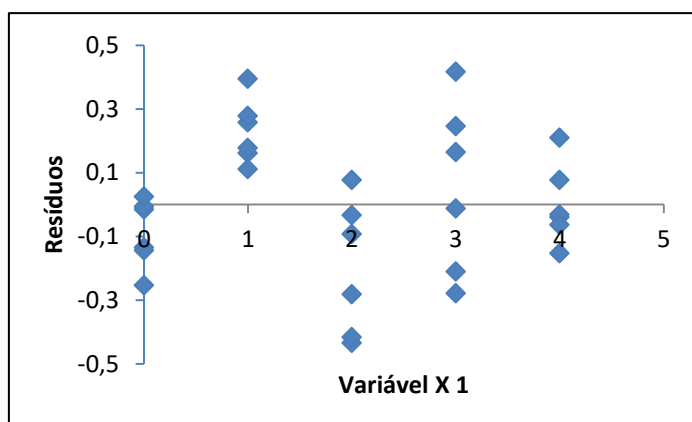
Tabela 3. Análise de Regressão de frascos de MRC de OTA no café torrado submetidos a 4 °C

<i>Estadística de regressão</i>								
R múltiplo	0,323240075							
R-Quadrado	0,104484146							
R-quadrado ajustado	0,072501437							
Erro padrão	0,223080171							
Observações	30							
ANOVA								
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>			
Regressão	1	0,162576245	0,162576245	3,2668948	0,081447374			
Resíduo	28	1,393413355	0,049764763					
Total	29	1,5559896						
	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
Interseção	2,771030513	0,070544144	39,28080138	4,92E-26	2,626527384	2,915533641	2,626527384	2,915533641
Variável X 1	-0,05205386	0,028799526	-1,80745534	0,0814474	-0,111047013	0,006939298	-0,111047013	0,006939298

A incerteza da estabilidade, considerando o erro padrão da variável X1 e o tempo total em semanas (4), foi de 0,12 ng/g.

A Figura 6 apresenta o gráfico de resíduos dos resultados obtidos na temperatura 4°C para o estudo da temperatura de referencia do mini lote do candidato a MRC de Ocratoxina A no café torrado.

Figura 6. Gráfico de resíduos dos resultados obtidos do estudo a temperatura de 4 °C.



Esta Figura sugere uma tendência, porém tal fato deve-se ao ponto correspondente a 1 (uma) semana. Esta variação provavelmente deve ser analítica e será contemplada na incerteza estimada. De qualquer forma para dirimir quaisquer dúvidas, os resultados serão avaliados estatisticamente a seguir.

Na Tabela 4, o valor-p (0,2478) encontrado indica que a instabilidade é insignificante para uma probabilidade de abrangência de 95,0 % quando este valor-p for maior que 0,05. Além disso, o coeficiente angular (variável X1) foi de -0,02, próximo de zero. Desta forma a regressão não é significativa e o material é considerado estável a esta temperatura de -20°C.

Tabela 4. Análise de Regressão de frascos de MRC de OTA no café torrado submetidos a -20°C.

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,21770176
R-Quadrado	0,04739405
R-quadrado ajustado	0,01337241
Erro padrão	0,14200603
Observações	30

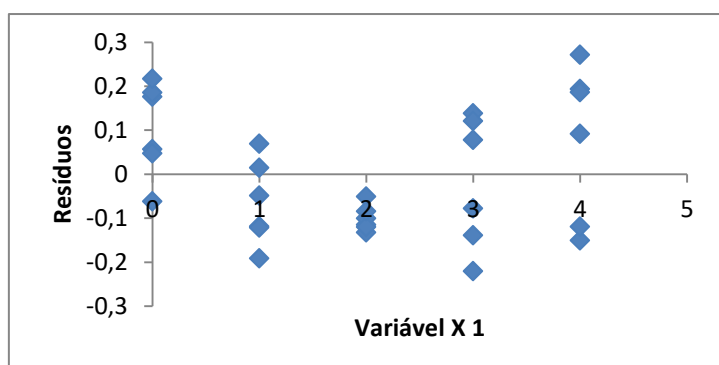
ANOVA					
	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	0,028091969	0,028091969	1,393056094	0,247819856
Resíduo	28	0,564639953	0,020165713		
Total	29	0,592731921			

	Coefficientes	Erro padrão	Stat t	valor-P	95% inferiores	95% superiores	Inferior 95,0%	Superior 95,0%
Interseção	2,57928596	0,04490625	57,43712691	1,34161E-30	2,487299679	2,671272244	2,487299679	2,671272244
Variável X 1	-0,0216379	0,0183329	-1,180277973	0,247819856	-0,05919116	0,015915325	-0,05919116	0,015915325

A incerteza da estabilidade, considerando o erro padrão da variável X1 e o tempo total em semanas (4), foi de 0,073 ng/g.

A Figura 7 apresenta o gráfico de resíduos dos resultados obtidos na temperatura -20 °C para o estudo da temperatura de referência do mini lote do candidato a MRC de Ocratoxina A no café torrado.

Figura 7. Gráfico de resíduos dos resultados obtidos do estudo a temperatura de -20°C.



Apesar dos resultados encontrados, a temperatura -20 °C, através do gráfico dos resíduos (Figura 7), nos sugere uma tendência com comportamento semelhante a uma parábola, tendência quadrática do teor de Ocratoxina A do candidato a MRC de Ocratoxina A no café torrado ao longo do tempo. Do ponto de vista químico tal comportamento não seria possível e o número pequeno de semanas de estudo (4) inviabiliza testes mais sofisticados para verificar se há ou não tendência dos dados encontrados.

No entanto, para dirimir possíveis dúvidas, utilizou-se um software livre R para realizar um teste de ajuste quadrático na seguinte forma: $OTA = a + (b \cdot Tempo)^2$. (R Core Team, 2013) Novamente, apesar de aparente, não se pôde concluir quanto à tendência quadrática do modelo, já que o p-valor do teste F correspondente fora de 0,2478, conforme Tabela 5 a seguir.

Tabela 5. Tabela ANOVA para os dados da temperatura a -20 °C no modelo quadrático.

<u>DoF</u>	<u>Sum of Erros</u>	<u>Mean Squared Errors</u>	<u>Valor F</u>	<u>P-Valor (teste F)</u>
1	0,0281	0,0281	1,3931	0,247819855
28	0,5646	0,0202		

Desta forma se a inclinação não é significativa, as duas temperaturas poderiam ser utilizadas sem mudança de comportamento do material envasado.

Pode-se observar que os resultados encontrados para o teor de OTA no café torrado na temperatura de 4 °C foram aparentemente superiores aos encontrados na temperatura de -20 °C, porém esta diferença pode não ser estatisticamente significativa. Foi realizado um teste t de diferença de médias para os teores de Ocratoxina A nas duas temperaturas ao nível de 5,0 % de significância e não foi possível rejeitar a hipótese de igualdade entre as médias (p-valor = 0,06322). Entretanto, este teste não considerou as diferentes medições de cada frasco, podendo esta ser uma fonte de variação importante para o modelo.

Para contornar este problema, avaliou-se a adequação do modelo de análise de variância (ANOVA) de um fator (temperatura), de maneira hierárquica (*hierarchical or nested* ANOVA), isto é, considerando replicatas dentro desse fator. A forma hierárquica verifica entre ampola e dentro da ampola, se tornando um tratamento de dados mais completo.

A Tabela 6 apresenta os resultados referentes aos dados obtidos nas duas temperaturas ao longo de quatro semanas serem tratados de modo hierárquico. Pode-se observar através do teste F, que o p-valor foi menor que 0,001. Desta forma, há indícios de que, em média, haja diferença entre os teores de Ocratoxina A no café torrado nas temperaturas de 4 °C e -20 °C, sendo nesta temperatura a apresentação das menores concentrações encontradas.

Tabela 6. Tabela ANOVA obtida no Modelo Hierárquico

DoF	Sum of Erros	Mean Squared Errors	Valor F	P-Valor (teste F)
1	0,2571	0,2571	26,3685	0,000007693
18	1,7588	0,0977	10,0222	0,000000001
40	0,3900	0,0097		

Pode-se concluir que existe variabilidade nas medições do teor de Ocratoxina A no café torrado de acordo com a mudança entre as temperaturas estudadas, o que cria subsídios para a escolha da temperatura ótima a ser utilizada na produção do MRC. No entanto, o teste nomeado ANOVA hierárquica não considera o fator temporal, isto é, se aceita que há diferença média do teor de Ocratoxina A entre as temperaturas, porém não quer dizer que isso ocorra ao longo do tempo. Para uma análise deste porte (diferença média ao longo do tempo) o necessário seria comparar as duas regressões lineares (testar se as retas são paralelas e, em caso afirmativo, se o intercepto varia ao longo do tempo). No entanto, os testes preliminares rejeitaram a tendência linear para ambos os dados e, além disso, a pequena quantidade de observações inviabiliza a estimação dos parâmetros de maneira eficiente.

Considerando o fato de haver diferença entre os valores médios para diferentes temperaturas e a julgar que não haja tendência linear do teor de Ocratoxina A no café torrado para ambos os casos, é coerente utilizar a menor das temperaturas (-20 °C) como temperatura de referência no estudo de estabilidade do mini lote de Ocratoxina A no café torrado, pois se espera que nesta haja maior conservação da propriedade que se esteja medindo, a Ocratoxina A.

Capítulo 4: CONCLUSÕES

O projeto de produção do candidato a MRC de OTA em café torrado, tem como resultado um lote de 195 frascos com 50 g de café torrado com fração mássica aproximada de 5 µg/kg.

Os resultados obtidos com os testes de ANOVA e valor-p demonstram que as etapas relacionadas ao preparo do mini lote de Ocratoxina A no café torrado se mostraram adequadas para o fim pretendido, uma vez que o mini lote foi considerado homogêneo e estável, portanto viabilizando à etapa final de caracterização.

Além disso, a temperatura que deve ser utilizada como temperatura de referência no preparo do candidato a MRC de Ocratoxina A no café torrado será de -20 °C para que se tenha maior conservação da propriedade do analito em questão.

O estudo de estabilidade de longa duração está em andamento, sendo avaliadas as temperaturas de -20°C e 4 °C. A caracterização por comparação interlaboratorial está prevista para o ano de 2019, e contará com a participação de laboratórios experientes na área, tanto nacionais como estrangeiros.

Concluída a certificação do referido material de referência, os laboratórios de análise em alimentos, tanto brasileiros quanto do exterior, poderão se beneficiar do seu uso para validação de métodos, bem como para assegurar a veracidade das medições dos laboratórios, contribuindo para evidenciar a competência em processos de acreditação e junto a clientes.

Capítulo 5: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIC. **Associação Brasileira da Indústria de Café**. Disponível em: <www.abic.com.br/>. Acesso em 27 mar. 2018

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, ISO GUIA 30:2011. Termos e definições relacionados com materiais de referencia. Rio de Janeiro: ABNT, 2011.

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, ISO GUIA 35:2012. Materiais de referência – Princípios gerais e estatísticos para certificação. Rio de Janeiro: ABNT, 2012.

AGUIAR, A. T. E. **Atributos químicos de espécies de café**. Tese de Doutorado, Escola Superior de Agricultura Luiz Queiroz, Piracicaba, 2005. 87p.

ALMEIDA, A.P. J. ALABURDA, L. SHUNDO, V. RUVIERI, S.A. NAVAS, L.C.A. LAMARDO, M. SABINO. Ochratoxin A in Brazilian instant coffee. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 300-303, 2007.

ANVISA, Resolução RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011, Dispõe sobre os limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. **Diário Oficial da Republica Federativa do Brasil, Brasília DF (2011)**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em 13 mar. 2014.

ARDREY, R. E. **Liquid Chromatography – Mass Spectrometry: An Introduction**. Editora John Wiley & Sons, Ltd: England, 2003.

BECKER, M. P. DEGELMANN, M. HERDERICH, P. SCHREIER, H.U., HUMPT, H. U. Column liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry for the analysis of ochratoxin. **Journal of Chromatography A**, v. 818, p. 260-264, 1998.

CHAGAS, S.J de R. **Caracterização química e qualitativa de cafés de alguns municípios de três regiões produtoras de Minas Gerais.** Dissertação de Mestrado em Fitotecnia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1994. 83p

CHARRIER, A. La structure génétique des caféiers spontanés de la région Malgache (*Mascaracoffea*): Leurs relations avec les caféiers d'origine africaine (*Eucoffea*). Paris: ORSTOM, 1978. 223 p.

CHIARADIA, M.C., COLLINS, C.H., JARDIM, I. C.S.F. O estado da arte da cromatografia associada a espectrometria de massa acoplada a espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, v. 31, n.3, p. 623-636, 2008.

CHIARADIA, M.C., COLLINS, C.H., JARDIM, I. C.S.F. O estado da arte da cromatografia associada a espectrometria de massa acoplada a espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, v. 31, n.3, p. 623-636, 2014.

CODEX, 2007, Joint FAO/WHO Food Standards Programme Codex Committee on Contaminants in Food. **Discussion paper on Ochratoxin A in coffee.** 2006. First Session, April 16-20, 2007 (China:WHO).

COFFEERESEARCH. Agriculture. **CoffeProcessing.** Disponível em: <<http://www.coffeeresearch.org/agriculture/processing.htm>>. Acesso em: 24 abr. 2018

CORDEIRO, M.S.C. **Produção de ocratoxina A em feijão (*Phaseolusvulgaris L.*).** Tese de Doutorado em Química Orgânica, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 1990.

CUNHA, C. P. **Desenvolvimento e implantação da técnica CLAE – EM/EM para análise de ocratoxina A no café.** Relatório de estágio, UFRRJ, Rio de Janeiro, 2010. 48f.

DE GRANDE, S.M. B., AQUINO NETO, F. R. A espectrometria de massas acoplada a espectrometria de massas EM-EM. **Química Nova**, v.13, n.3, p.191-199, 1990.

FARAH, A. **Distribuição nos grãos, importância na qualidade da bebida e biodisponibilidade dos ácidos clorogênicos do café,** Rio de Janeiro, Brasil. 2004. Tese (Doutorado em Ciência de alimentos) - Instituto de Química, CT, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, 2004.

FAZUOLI, L. C. Genética e melhoramento do cafeeiro. In: RENA, A. B.; MALAVOLTA, E.; ROCHA, M. IAMADA, T. (Ed.). *Cultura do cafeeiro (fatores que afetam a produtividade)*. Piracicaba: POTAFOS, 1986. p. 88-113.

FERREIRA, G.F.P. **Avaliação da qualidade física, química, sensorial e da composição fúngica de grãos de cafés beneficiados.** Vitória da Conquista: UESB, 2010

FOOD INGREDIENTS BRASIL, **Micotoxinas**, Nº 7, 2009. Disponível em: <www.revista-fi.com/materiais/90.pdf>. Acesso em 13 mar. 2014.

FREIRE, F.C.O.; VIEIRA, I.G.P.; GUEDES, M.I.F.; MENDES, F.N.P. **Micotoxinas: Importância na alimentação e saúde humana e animal.** **EMBRAPA**, p.24-25, 2007.

FUJI, S.; ONO, E.Y.S.; HIROOKA, O E. **Ocratoxina A em café: controle e metodologia analítica com ênfase a inovação no contexto de segurança alimentar.** **Semina: Ciências Agrárias**, v. 23, n. 2, p. 273-292, 2002.

FURLANI, R.P.Z., SOARES, L.M.V., OLIVEIRA, P.L.C. Avaliação de métodos para determinação de Ocratoxina A em cafés verdes e torrados. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 58, p. 87-98, 1998.

GONZALEZ, E.A.S. **Estudo da viabilidade de implantação de pequenas unidades de torrefação de café**. Trabalho final (Graduação em Bacharelado em Engenharia de Alimentos). Universidade Estácio de Sá, Rio de Janeiro, 2004.

HALAL, E.M.L.S. **Composição, Processamento e Qualidade do Café**. Bacharelado em Química de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2008. 45f

HOFFMANN, C.E. **Resfriamento no processo de torra nas características de qualidade tecnológica e sensorial do café**. 2001.86f. Dissertação (Mestrado em ciências) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS.

IARC - **International Agency for Research on Cancer**. Ochratoxin A. Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and micotoxins. Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. v. 56, Lyon: IARC, p. 489-452, 1993.

IAMANAKA, B. T; OLIVEIRA, I. S; TANIWAKI, M. H.; **Micotoxinas em Alimentos**. Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica, vol. 7, n. 2, p. 138 - 161, 2010.

INDEX MERCK. 20 th Edition. New Jersey; Merck & CO. Inc; p. 1521-1529, 1996.

LANÇAS, F. M. **Cromatografia líquida moderna: HPLC/CLAE**. São Paulo, Editora Átomo, 2009.

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

MANTLE, P.G. Risk assessment and the importance of ochratoxins. **Int Biodet & Biodeg**, v.50, p.143-146, 2002.

MASOUD, W.; KALTOFT, C. H. The effects of yeasts involved in the fermentation of *Coffea arabica* in East Africa on growth and ochratoxin A (OTA) production by *Aspergillus ochraceus*. **International Journal of Food Microbiology**, v.106, p.229 -234, 2006.

MELITTA. **Do grão de café a xícara**. Disponível em: <http://www.melitta.com.br/quality_processing_pt,71300.html>. Acesso em 20 abr. 2014.

MENDONÇA, L.M.V.L.; PEREIRA, R.G.F.A.; MENDES, A.N.G. Parâmetros bromatológicos e grãos crus e torrados de cultivos de café (*Coffea arabica* L.). **Ciênc.Tecnol. Aliment., Campinas**, 25(2): 239-243, abr-jun. 2005.

R CORE TEAM, 2013. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>. Acesso em 20 abr. 2018

RINGOT, Diana, et al. Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update. **Chemico-Biological Interactions**, v. 159, p. 18–46, 2006.

SAKIYAMA, N. S.; PEREIRA, A. A.; ZAMBOLIM, L. Melhoria de café arábica. In: BORÉM, A. (Ed.). Melhoria de espécies cultivadas. Viçosa: UFV, 1999. p. 189-204.

TRUCKNESS, M.W. **Natural Toxins**. AOAC (Association of Official Analytical Chemists): Official Methods of Analysis of AOAC International, Gaithersburg, 18th Edition. Maryland, v. 1, c. 49, 2005, 58-65 p.

TOCI, A.; FARAH, A.; TRUGO, L.C. Efeito do processo dedescafeinação com diclorometano sobre a composição química dos cafés arábica e Robusta antes e após a torração. **Química Nova**, v.29, n 5, p.965-971, 2006.

WHO/FAO, Ochratoxin A. Safety Evaluation of Certain Mycotoxins in Food, v. 47, p. 281- 415, 2001.

WIKIMEDIA. **Ochratoxin A structure.** Disponível em: <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Ochratoxin_A_structure.png>. Acesso em 15 abr. 2018