



**PROGRAMME MIXTE FAO/OMS SUR LES NORMES ALIMENTAIRES  
COMITÉ DU CODEX SUR LES CONTAMINANTS DANS LES ALIMENTS  
5<sup>ème</sup> session**

**La Haye, Pays-Bas, 21-25 mars 2011**

**DOCUMENT DE TRAVAIL SUR L'OGHRATOXINE A DANS LE CACAO  
Préparé par le groupe électronique de travail conduit par le Ghana et co-présidé par le Brésil**

## GÉNÉRALITÉS

1. À sa 38<sup>ème</sup> session, le Comité du Codex sur les additifs alimentaires et les contaminants (CCFAC) est convenu de préparer un document de travail sur la contamination du cacao par l'ochratoxine A (OTA). Le document de travail devait servir de base à la décision à prendre concernant le besoin possible d'élaborer un code d'usages pour la réduction et la gestion de l'incidence de l'OTA dans le cacao. Le groupe électronique de travail était conduit par le Ghana et assisté par le Brésil, la Communauté européenne, l'Indonésie, la Suisse, le Royaume-Uni et les Etats-Unis et son rapport a été présenté lors de la première session du Comité du Codex sur les contaminants dans les aliments (CCCCF) qui s'est tenu à Beijing, en Chine.
2. À sa 1<sup>ère</sup> session, le Comité est convenu qu'il était prématuré d'entreprendre l'élaboration d'un code d'usages et qu'il conviendrait d'attendre que davantage de données soient disponibles avant de prendre une décision à cet égard. Après plusieurs échanges de vues, le Comité a décidé de créer un groupe de travail électronique, sous la présidence du Ghana, chargé de mettre à jour le document de travail à l'aide de données nouvelles et de tout autre information pertinente, et en tenant compte des observations formulées à la 1<sup>ère</sup> session, pour examen à la 2<sup>ème</sup> session du Comité.
3. À sa 2<sup>ème</sup> session, le Comité a suspendu l'examen de l'OTA dans le cacao à cause du besoin de génération de nouvelles données étant donné que la question sera réexaminée une fois que les nouvelles données seront disponibles.
4. Lors de sa 4<sup>ème</sup> session, la Délégation du Brésil a informé le Comité qu'une nouvelle étude sur l'incidence des fongiques ochratoxigéniques et l'OTA dans le cacao a été effectuée au Brésil et que l'étude pourrait fournir les éléments pour le développement d'un code d'usages afin de réduire ou prévenir l'OTA dans le cacao. Le comité est convenu qu'un groupe de travail électronique conduit par le Ghana et coprésidé par le Brésil, préparerait un document de travail sur l'occurrence des fongiques ochratoxigéniques et l'OTA dans le cacao pour évaluer si un code d'usages devrait être développé.
5. Les membres du groupe de travail électronique comprennent: l'Argentine, l'Australie, le Brésil, le Canada, l'Ecuador, l'Egypte, la Commission européenne, le Ghana, la Grèce, l'Italie, le Japon, la Malaisie, la Suisse, le royaume Uni, Les Etats-Unis d'Amerique, L'association européenne des lois sur la nourriture (EFLA), l'Association internationale de la confiserie et l'Organisation de l'alimentation et de l'Agriculture. Les commentaires ont été reçus des membres suivants: le Brésil, le Ghana, la Grèce, l'Italie, le Japon, le Royaume-Uni, Les Etats-unis d'Amérique et l'Association internationale de confiserie.

## INTRODUCTION

6. L'ochratoxine A est une mycotoxine naturellement présente dans le monde entier dans les denrées alimentaires telles que les céréales et les produits céréaliers, les légumineuses, le café, la bière, le jus de raisin, les fruits de la vigne séchés et le vin ainsi que dans les produits cacaotés, les fruits à coque et les épices (EFSA, 2006). Dans le cacao, l'OTA est principalement associée à la coque des fèves de cacao et au cacao sec et dégraissé (cacao en poudre) (Amezqueta et al., 2004; Bastide et al., 2006). Les champignons et l'OTA sont présents à tous les stades de la chaîne de production : la récolte (manuelle et le broyage des cosses), la fermentation (fermentation en boîte ou dans l'exploitation agricole sur des peaux de bananes), le séchage (solaire ou mécanique), l'entreposage, (dans des sacs en toile de jute) la fabrication des aliments et le transport (COCOQUAL, 2007; FAO/WHO/UNEP, 1999).

7. Le terme "cacao" est dérivé de la plante *Theobroma cacao* L. appartenant à la famille des *Malvaceae*. L'arbre est originaire de l'Amazonie et des autres zones tropicales de l'Amérique du Sud et centrale et poussé dans une région à 20° du Nord et du Sud de l'Équateur. La moyenne des températures minimales et maximales dans les régions où poussent le cacao est de 18°C et 32°C. Une chute de pluie de 1000-4000 mm/an est requise.

8. Le terme « cocoa » concerne les fèves disponibles dans le commerce et les produits dérivés alors que l'anglais « cacao » concerne le cacaoyer et ses différentes parties, bien que ces deux termes soient dans certains cas interchangeables.

9. Le cacao est un produit à base de fruits secs fermentés. Les fèves de cacao ne sont pas consommées telles quelles. Elles subissent une transformation industrielle avant la consommation. Le cacao est un ingrédient très important dans les produits pharmaceutiques ainsi que dans différentes sortes d'aliments, tels que les tourteaux, les biscuits, les confiseries à base de chocolat, le chocolat à tartiner, les boissons au cacao, les aliments pour enfants, les glaces ainsi que les sucreries. (Tafari et al, 2004).

10. Dans le procédé industriel du cacao, les premières étapes consistent à nettoyer, torréfier et à éliminer de façon mécanique la coque. Pour des raisons techniques, il n'est pas possible d'éliminer totalement la coque ; environ 2 pour cent du poids du grué de cacao total est dû à la présence de cosse et de germe durant le processus de transformation (CODEX STAN141-1983). Le grué est broyé dans la masse de cacao/liqueur pour une transformation ultérieure.

11. Environ 68 pour cent de l'approvisionnement mondial de fèves de cacao provient de l'Afrique occidentale, notamment de la Côte d'Ivoire, du Ghana et du Nigeria. Le cacao est également produit en Asie et en Amérique latine (Tableau 1). En tant que récolte produite par de petits exploitants, le cacao constitue une culture marchande non-périssable précieuse pour des milliers de paysans dans les pays producteurs de cacao, et son importance est capitale pour les économies de ces pays. Les fèves de cacao sont, en grande partie, exportées vers l'Europe et l'Amérique du Nord pour être transformées en liqueur de cacao, en beurre de cacao et en gâteau au cacao qui sera transformé en poudre au cacao et chocolat (tableau 2) (ICCO 2007).

**Tableau 1.** Production mondiale de fèves de cacao (2008 – 2010) (milliers de tonnes)

Pays	2007/08		2008/09		2009/10 (prévisions)	
<b>Afrique</b>	<b>2693</b>	<b>72,1%</b>	<b>2520</b>	<b>69,9%</b>	<b>2459</b>	<b>68,4%</b>
Cameroun	185		227		200	
Côte d'Ivoire	1382		1223		1190	
Ghana	729		662		650	
Nigeria	230		250		260	
Autres	166		158		159	
<b>Amérique</b>	<b>450</b>	<b>12,1%</b>	<b>487</b>	<b>13,5%</b>	<b>505</b>	<b>14,0%</b>
Brésil	171		157		155	
Équateur	113		134		150	
Autres	167		196		200	
<b>Asie &amp; Océanie</b>	<b>591</b>	<b>15,8%</b>	<b>598</b>	<b>16,6%</b>	<b>632</b>	<b>17,6%</b>
Indonésie	485		490		535	
Papouasie- Nouvelle- Guinée	52		59		50	
Autres	54		49		47	
<b>Total mondial</b>	<b>3734</b>	<b>100%</b>	<b>3604</b>	<b>100%</b>	<b>3596</b>	<b>100%</b>

Source:  
trimestriel des  
cacao, Vol.  
Année du cacao

ICCO Bulletin  
statistiques de  
XXXVI, No.3,

2009/2010. Publié: 26-08-2010

Note : Les totaux peuvent différer de la somme des constituants à cause de l'arrondissement.

**Tableau 2.** Consommation mondiale/mouture des fèves de cacao (milliers de tonnes)

	2003/04		2004/05		2005/06	
<b>Europe</b>	<b>1346</b>	<b>41,6%</b>	<b>1375</b>	<b>41,1%</b>	<b>1462</b>	<b>42,1%</b>
Allemagne	225		235		302	
Pays-Bas	445		460		470	
Autres	676		680		690	
<b>Afrique</b>	<b>446</b>	<b>14,4%</b>	<b>493</b>	<b>14,8%</b>	<b>507</b>	<b>14,6%</b>
Côte d'Ivoire	335		364		360	
Autres	131		130		147	
<b>Amérique</b>	<b>852</b>	<b>26,3%</b>	<b>853</b>	<b>25,5%</b>	<b>856</b>	<b>24,6%</b>
Brésil	207		209		223	
États-Unis	410		419		426	
Autres	235		225		207	
<b>Asie &amp; Océanie</b>	<b>575</b>	<b>17,7%</b>	<b>622</b>	<b>18,6%</b>	<b>651</b>	<b>18,7%</b>
Indonésie	120		115		120	
Malaisie	203		250		250	
Autres	252		257		281	
<b>Total mondial</b>	<b>3238</b>		<b>3343</b>		<b>3476</b>	
<b>Origine</b>	<b>1188</b>	<b>36,7%</b>	<b>1254</b>	<b>37,5%</b>	<b>1279</b>	<b>36,8%</b>

## STRUCTURE CHIMIQUE

12. L'OTA (7-(L-b-phénylalanyle-carbonyle)-carboxyle-5-chloro-8-hydroxy-3,4-dihydro-3R-méthyl isocumarin) (Figure 1) est un métabolite secondaire produit par plusieurs espèces d'*Aspergillus* et de *Penicillium*, (Pittet and Royer, 2002) qui peut être présent dans une denrée alimentaire même lorsque la moisissure visible n'est pas apparente. L'OTA est un composé cristallin sans couleur qui est soluble dans les solvants organiques polaires et une solution de bicarbonate de sodium dilué et modérément soluble dans l'eau (Scoot 1996).

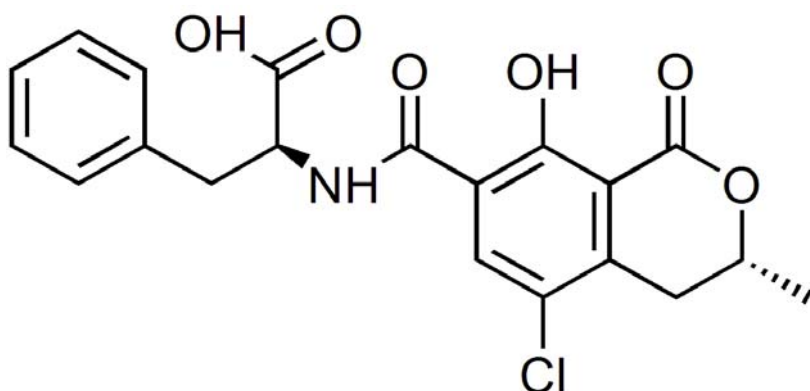


Figure.1. Structure de l'ochratoxine A

13. L'enzyme de mammifère carboxypeptidase A a la capacité de cliver l'OTA en produits non toxiques (l'ochratoxine alpha et la phénylalanine). (Stander et al, 2001).

14. L'OTA conserve sa stabilité durant la plupart des étapes de la transformation des aliments telles que la cuisson, le lavage et la fermentation et peut être détecté dans les produits alimentaires manufacturés (Bakker et Pieters, 2002). Boudra et al (1995) a montré qu'un maximum de 20 pour cent d'OTA dans le blé est décomposé par la chaleur sèche à 100°C pendant 160 minutes ou à 150°C pendant 32 minutes. Durant la torréfaction du cacao, la température finale de la fève atteint 100 à 120°C pour une durée de 15 à 70 minutes (Minifie, 1982). Par conséquent, on ne s'attend pas à ce que la torréfaction réduise de façon importante les niveaux d'OTA.

## ÉVALUATION TOXICOLOGIQUE

15. L'OTA est catégorisée comme cancérogène possible pour l'homme (groupe 2B) (CAC, 1998; IARC, 1993) et a été signalée comme étant néphrotoxique, immunosuppresseur, cancérogène et tératogène dans les études sur les animaux (JECFA, 1995; JECFA, 2001; O'Brien and Dietrich, 2005; Tsubouchi et al, 1995). L'OTA est considérée comme étant la cause de deux maladies chroniques, la néphropathie endémique balkanique et la néphropathie intestinale chronique (en Afrique du Nord), et des tumeurs urothéliales chez les humains. O'Brien and Dietrich, 2005) Un lien entre l'exposition à l'OTA à un stade précoce de la vie et le cancer des testicules a été posé (Schwartz, 2002). Des études préalables dans le cadre du programme de toxicologie nationale (NTP) aux États-Unis ont montré que l'OTA en doses élevées peut provoquer des tumeurs rénales chez les rongeurs. (Boorman, 1989).

16. L'OTA a été analysée dans les échantillons de sang humain en Côte d'Ivoire entre 1998 et 2004 (Sangare-Tigore et al, 2006). Les résultats ont révélé que 22 des 63 participants en bonne santé avaient des niveaux dans le sang d'OTA allant de 0,01 à 5,81 µg/L pour une teneur moyenne de 0,83 µg/L. Les niveaux trouvés dans 8 des 39 patients atteints de néphropathie traités par dialyse dont les niveaux étaient de 0,167 à 2,42 µg/L pour une moyenne de 1,05 µg/L.

17. Selon l'opinion du groupe scientifique sur les contaminants de la chaîne alimentaire de l'Autorité européenne de sécurité des aliments (AESAs) (EFSA, 2006) la toxicité localisée rénale de l'OTA ainsi que la détérioration de l'ADN et les effets génotoxiques de l'OTA, mesurés au cours de diverses études in vivo et in vitro, sont très probablement imputables à la détérioration oxydative cellulaire sans preuve de l'existence de produits d'addition d'OTA-ADN. Sur la base des plus petites doses induisant un effet néfaste (LOAEL) de 8 µg/kg poids corporel/jour pour les marqueurs précoces de toxicité rénale chez les porcs, et en appliquant un

facteur d'incertitude composite de 450 afin de tenir compte à la fois des incertitudes d'extrapolation des résultats expérimentaux de l'animal à l'homme et la variabilité inter-espèces, on obtient une dose journalière tolérable de 120 ng/kg de poids corporel pour l'OTA. En 2010, l'EFSA a abordé la co-exposition possible à l'ochratoxine A et l'acide aristolochique de la population humaine dans des zones identifiées antérieurement comme ayant une prévalence élevée de néphropathie endémique mais n'a pas trouvé de raisons pour modifier les conclusions de son opinion précédente (EFSA, 2010).

18. À sa 68<sup>ème</sup> réunion, le JECFA a examiné la dose hebdomadaire tolérable provisoire (DHTP) en vigueur de 100 ng/kg de poids corporel à la lumière des nouvelles données et a conclu qu'il n'y avait aucune raison de modifier le résultat précédent (JECFA, 2007).

### ÉCHANTILLONNAGE

19. Spanjer et al. (2006) a indiqué que le processus d'homogénéisation de l'échantillon est un facteur important dans les déterminations de l'OTA dans diverses matrices alimentaires. Selon le type de procédure de mouture qui détermine la distribution de la taille de la particule, la quantité d'OTA qui est mesurée pourrait varier. L'intérêt de cette trouvaille est que les plans d'échantillonnage qui ne sont pas convenablement conçus pourraient conduire au rejet ou à l'acceptation erronée des lots.

20. Les procédures d'échantillonnage et les critères de performance des méthodes d'analyse pour les mycotoxines dans les denrées alimentaires ont été fournis par la Commission EU 401/2006 (EC 401/2006, 2006) comprenant un échantillon pour l'OTA dans les grains de café torréfiés. Il n'existe pas de procédure d'échantillonnage spécifique pour l'analyse de l'OTA dans le cacao et les produits à base de cacao.

### MÉTHODES ANALYTIQUES

21. Un test rapide sur la base d'anticorps utilisant le nettoyage séquentiel et la détection visuelle de l'OTA dans la poudre de cacao a été présenté (Lobeau et al. 2007). Le dépistage correspond au niveau critique de 2.0 µg/kg et peut être pratiqué en plein champ.

22. La méthode validée de quantification de l'OTA emploie le protocole de chromatographie liquide à haute performance (CLHP/FLD) en phase inversée avec la détection de la fluorescence après nettoyage en colonne d'immunoaffinité (Brera et al. 2003). Une étude inter laboratoire visant à évaluer la performance de 18 laboratoires en matière de détermination de l'OTA dans les échantillons de poudre de cacao utilisant cette méthode a été présentée (Brera et al. 2005). Les résultats ont été respectivement satisfaisants dans 10, 11 et 12 des 18 laboratoires participants à un niveau faible (0,19µg/kg), du niveau moyen (0,45µg/kg), et du niveau élevé de contamination (1,45µg/kg) respectivement.

23. Copetti (2009) a validé une méthode analytique pour les fèves de cacao utilisant une colonne d'immunoaffinité pour le nettoyage et de HPLC/FLD à des niveaux de 0.49, 1.96 et 9.80 µg/kg. Les taux de récupération étaient de 97.5 à 80.0 pour cent et la limite de détection était de 0.01 µg/kg. Turcotte et Scott (2010) ont également validé une méthode similaire pour le cacao en poudre et le chocolat, avec un LOQ de 0.08 ng/g, découverte de 79-94 pour cent et un coefficient de variation de < 5%.

24. Afin de détecter la présence de l'OTA dans un grand nombre d'échantillons, des méthodes rapides, peu coûteuses et faciles à exécuter sont souhaitables, en particulier dans les pays à faible revenu dans lesquels la surveillance est moins accessible en raison des contraintes économiques et technologiques. (Murphy et al., 2006). Toutefois l'interprétation des données doit être faite avec soin et dans certains cas une analyse complémentaire devrait être exécutée.

### OCCURRENCE DE L'OTA ET DES MOISSURES PRODUCTRICES DE L'OTA DANS LES FÈVES DE CACAO

25. De nombreux efforts ont été faits pour isoler et identifier l'OTA produisant des moisissures à partir des fèves de cacao. Dans une étude conduite au Ghana pour évaluer la moisissure dans le cacao pour une période d'un an, 58 espèces fongiques ont été isolées et identifiées. Celles-ci incluaient 26 espèces d'*Aspergillus*, certaines d'entre elles potentiellement toxigéniques (*A. niger*, *A. ochraceus* et *A. flavus*), 5 espèces de *Penicillium* et 8 espèces de *Fusarium* (Appiah, 2001). Le pourcentage des fongiques ochratoxigéniques n'a pas été montré.

26. Dans une autre étude, aucune des 66 souches d'*Aspergillus* isolées pendant la fermentation et le séchage des fèves de cacao au Ghana, était capable de produire de l'OTA. On a procédé au dépistage de la

production de l'OTA dans un total de 13 souches d'*Aspergillus* provenant de Côte d'Ivoire, 16 du Nigéria et 86 du Ghana et on a seulement trouvé deux *Aspergilli* ochratoxigéniques. (COCOQUAL, 2007).

27. Dans une étude en cours au Ghana (Abrokwa et Sackey, 2010), trois types de fermentation du cacao ont été entrepris sur trois sites écologiques en utilisant les cosses classifiées comme saines, malades, malades et endommagées et endommagées/cassées. Le séchage des fèves fermentées a été effectué sous différents régimes y compris de façon standard en plein air, et le séchage au jour court étendu afin de simuler le séchage impropre ou affecté par la pluie. Différentes espèces de fongiques ont été isolées durant la fermentation et les étapes du séchage avec certaines espèces apparaissant uniquement durant l'étape du séchage. Ces espèces présentes durant les deux procès comprennent *A. niger*, *A. flavus*, *A. ochraceus*, *A. sulphureus*, et *R. stolonifer*. L'analyse de l'OTA a montré des niveaux bas dans les fèves (jusqu'à 0.5 µg/kg) obtenus principalement de cosses malades et de cosses malades /endommagées et de cosses endommagées/cassées.

28. Une étude sur l'incidence des fongiques ochratoxigéniques et l'OTA dans le cacao a été effectuée au Brésil durant la période de 2006 à 2008 (Copetti et al., 2010). Un total de 222 échantillons de cacao rassemblés à différentes étapes de la transformation comprenait: les échantillons avant la fermentation (25), la fermentation (51), le séchage (81) et l'entreposage (65). Dans cette étude, 271 fongiques appartenant aux espèces potentiellement ochratoxigéniques d'*Aspergillus* ont été isolées et identifiées en tant qu'un agrégat d'*A. carbonarius*, d'*A. niger*, d'*A. ochraceus*, d'*A. melleus* et d'*A. westerdijkiae*. Avant la fermentation, aucune espèce capable de produire de l'OTA n'a été trouvée dans les cosses de cacao, soit saines ou endommagées. Durant la fermentation, seuls quelques isolats appartenant à l'agrégat *Aspergillus niger* ont été trouvés et la plus grande diversité et nombre d'espèces capable de produire de l'OTA ont été trouvés durant le séchage au soleil. Durant l'entreposage, une augmentation dans l'occurrence de l'agrégat *Aspergillus niger* et *A. carbonarius* a été observé. L'agrégat *Aspergillus niger* constituait l'espèce la plus commune isolée avec le potentiel de produire de l'OTA. Toutefois, uniquement 10 (5.2%) des 191 isolats étaient capables de produire de l'OTA sur l'agar YES. D'autre part, les 92 isolats de l'*A. carbonarius* et les 10 isolats issus de l'*Aspergillus* section *Circumdati* (6 *A. melleus*, 2 *A. ochraceus* et 2 *A. westerdijkiae*) étaient capables de produire de l'OTA (Tableau 3). Cette étude a conclu que l'*A. carbonarius* est la source principale de l'OTA dans le cacao, bien que d'autres espèces ochratoxigéniques isolées puissent également y contribuer.

Tableau 3. Fréquence d'isolation des espèces ochratoxigéniques et incidence des fèves de cacao infectées à différentes étapes de la transformation (Copetti et al. 2010).

	Fermentation (51 échantillons)		Séchage (81 échantillons)		Entreposage (65 échantillons)	
	IF (%)	RI (%)	IF (%)	RI (%)	IF (%)	RI (%)
<i>Aspergillus carbonarius</i>	1,96	0-3	3,70	0-24	7,81	0-66
<i>A. niger</i> agrégat	3,92	0-9	14,8	0-48	26,15	0-51
<i>A. ochraceus</i>	0	0	2,47	0-3	0	0
<i>A. melleus</i>	0	0	2,47	0-6	3,13	0-3
<i>A. westerdijkiae</i>	0	0	2,47	0-6	0	0

<sup>a</sup> IF = fréquence d'isolation % (nombre d'échantillons qui contenaient une espèce fongique/total des échantillons évalués, %); RI = rang d'infection % (gamme des fèves infectées dans un échantillon %).

29. Aucun des 25 échantillons pris avant le commencement de la fermentation ne contenaient de l'OTA. Quatorze (27%) échantillons issus de la fermentation contenaient de l'OTA, bien que la plupart des échantillons étaient proches de la limite de détection de la méthode (0.01 µg/kg). Uniquement trois échantillons avaient des niveaux plus élevés que 0.10 µg/kg, avec un maximal de 1.70 µg/kg. Après

fermentation, à l'étape du séchage au soleil, l'OTA a été détecté dans 51 pour cent des échantillons et la plupart des (73%) échantillons avaient des niveaux plus bas que 0.10 µg/kg. Seul un échantillon contenait 5.54 µg/kg. Dans l'entreposage, à la fois le nombre d'échantillons positifs d'OTA et le niveau de la contamination étaient similaires aux résultats trouvés durant le séchage (Tableau 4). Des 221 échantillons analysés, seuls deux avaient des valeurs d'OTA au-dessus de 2 µg/kg (Copetti et al. 2010).

Tableau 4. Contamination à l'OTA des fèves de cacao à différentes étapes de la transformation (Copetti et al., 2010).

Étape/nombre d'échantillons évalués	OTA>LD n(%)	OTA>2 µg/kg n(%)	OTA (µg/kg)			
			Maximum	Médiane	Moyenne	
Avant la fermentation	25	0 (0%)	0 (0%)	<0,01	<0,01	<0,01
Fermentation	51	14 (27%)	0 (0%)	1,70	<0,01	0,05
Séchage au soleil	81	41 (51%)	1 (1%)	5,54	0,01	0,13
Entreposage	65	33 (52%)	1 (2%)	4,64	0,02	0,10

<sup>a</sup> Limite de détection (LD): 0,01 µg/kg; méthode de récupération moyenne: 90,8%.

30. Mounjouenpou et al. (2008) ont évalué à quel point les champignons filamenteux et la toxigénèse étaient affectés par le type de traitement du cacao postérieur à la récolte (boîtes ou tas). L'*Aspergillus carbonarius* était la principale souche isolée produisant de l'OTA, et de très bas niveaux d'OTA dans les fèves non fermentées et fermentées issues des cosses saines. Les champignons filamenteux étaient plus abondants à la fin de la saison de la récolte. Les facteurs affectant l'intégrité des fèves (traitement insuffisant, processus différé) ont résulté en une augmentation qualitative et quantitative dans la contamination, lorsque le nombre total de champignons filamenteux pouvait atteindre une valeur maximale de  $5.5 \pm 1.4 \times 10^7$  CFU/g et l'*Aspergilli* noir une valeur maximale de  $1.42 \pm 2.2 \times 10^7$  CFU/g. Le cacao sec fermenté issu de cosses de pauvre qualité était le plus contaminé par l'OTA: jusqu'à 48 ng/g.

31. Gilmour et Lindblom (2008) ont également trouvé des niveaux élevés d'OTA dans les fèves issues des cosses endommagées après cinq jours d'entreposage des cosses, la contamination qui a commencé le premier jour de la fermentation, avec des niveaux de contamination plus élevés au milieu du tas. Trois jours durant la fermentation, la tendance était inverse et la contamination était clairement plus grande aux bords. Ce renversement était accompagné d'une croissance considérable de moisissure sur la surface de l'empilement. Cinq jours après la fermentation, la teneur en OTA a augmenté plus avant. Seules des traces d'OTA ont été trouvées après la fermentation et le séchage des fèves issues des cosses saines entreposées pendant cinq jours. Après quatre semaines d'entreposage des cosses, les niveaux d'OTA étaient bas et il y avait seulement une petite différence entre les niveaux des fèves issues des cosses saines et endommagées. Les niveaux d'OTA dans les cosses moisies endommagées par des insectes (~ 7 ng/g), endommagées par des insectes (~ 4 ng/g) et momifiées (~ 3 ng/g) étaient substantiellement moindres que ceux trouvés dans les cosses physiquement endommagées (~20 ng/g), mais généralement plus élevés que ceux trouvés dans les cosses considérées comme intactes durant le contrôle (~ 2 ng/g).

32. Dans une étude conduite par Ratters et Matissek (2006), un total de 8 cosses visiblement saines issues des régions en croissance de la République Dominicaine (année de culture 1999) et Ghana (année de culture 2000) et 7 cosses de cacao endommagées ou moisies issues du Ghana cultivées en 2001 étaient séparées en pulpe et fèves. L'OTA n'a pas été détecté dans aucun échantillon de cosse de cacao, de fèves ou de pulpes analysés (LOD de 0.02 µg/kg). Les auteurs ont aussi montré que la phase de véraison des cosses de cacao issue de l'arbre jusqu'à la période de récolte ne constituait pas une étape critique pour la génération de l'OTA.

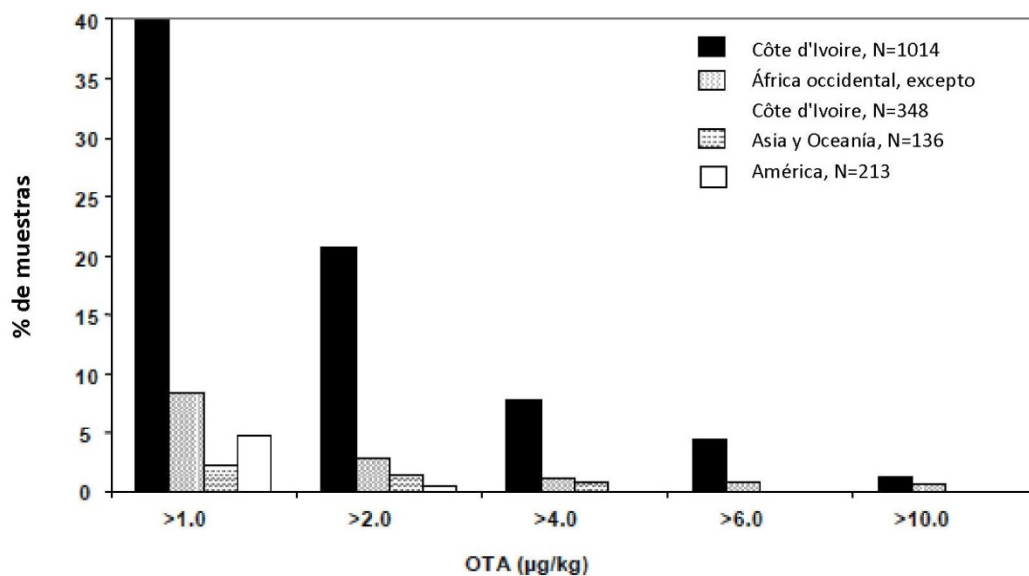
33. Amezcua et al. (2004) ont analysé l'OTA dans 46 échantillons de fèves de cacao de différentes origines et lots. Un total de 63 pour cent des échantillons étaient contaminés (LOD de 0.04 µg/kg), avec des niveaux de 0.04 à 14.8 µg/kg, moyenne et médiane de 1.71 et 1.12 µg/kg respectivement.

34. Dans une étude sur la Côte d'Ivoire, le cacao arrivant aux ports d'Abidjan et San Pedro était évalué afin de vérifier une éventuelle contamination à l'OTA. Les échantillons de fèves de cacao sèches ont été pris pour analyse conformément à la réglementation de la Commission (EC) No 401/2006. Parmi les 150 échantillons

testés à Abidjan, 23 avaient des niveaux d'OTA  $>2.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ , et 10 des 150 échantillons collectés à San Pedro avaient des niveaux  $>2.0 \mu\text{g}/\text{kg}$  (Demebele, 2009).

35. Un contrôle de fèves de cacao nigériennes prêtes à être vendues a indiqué que 91.5 pour cent des 59 échantillons testés étaient positifs à l'OTA, avec des concentrations se situant dans une fourchette entre 1.0 et 277.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (Dongo et al., 2008). Un indirect compétitif ELISA (dosage immunoenzymatique sur support solide), beaucoup moins sensible que la méthode HPLC a été utilisée pour la détermination.

36. L'industrie européenne analysée des échantillons des fèves de cacao importées de différentes origines depuis 1999 (Figure 2). Les résultats montrent que les fèves de cacao contaminées ont été trouvées dans toutes les régions produisant du cacao (Gilmour et Lindblom, 2008). Les données additionnelles sur l'incidence de l'OTA dans les fèves de cacao issues de différents pays producteurs sont indiquées dans le tableau 5.



% de muestras: % d'échantillons

África occidental, excepto ... = Afrique occidentale à l'exception de

Asia y Oceanía: Asie et Océanie

América: Amérique

**Figure 2** – Les niveaux d'OTA dans les fèves de cacao importées en Europe des différentes régions du monde 1999-2005 (Gilmour et Lindblom, 2008).



**Tableau 5.** Données additionnelles sur l'occurrence de l'OTA dans les fèves de cacao des divers pays producteurs

Origine	Année	Nombre d'échantillons			% >2 µg/kg	Références
		Totale	>LOQ	>2 µg/kg		
Abidjan	2005	147		23	16	Dembele et al., 2009
San Pedro	2005	151		10	7	Dembele et al., 2009
Côte d'Ivoire		33	24	5	15	Amazqueta et al., 2004
Cameroun		7	3	1	14	Amazqueta et al., 2004
Guinée équatoriale		6	2	0	0	Amazqueta et al., 2004
Afrique		21	16	1	5	Bonvehi, 2004
Brésil	2006-2008	222	88	2	1	Copetti et al., 2010

### EFFETS DE PROCESSUS SUR LES NIVEAUX D'OTA DANS LES PRODUITS

37. Les fèves de cacao doivent entreprendre une conversion industrielle avant la consommation. Durant cette transformation industrielle, l'aw est < 0,8, ce qui est trop bas pour la production d'OTA. Les premières étapes dans la transformation sont la torréfaction et le retrait de la coque (Gilmour et Lindblom, 2008).

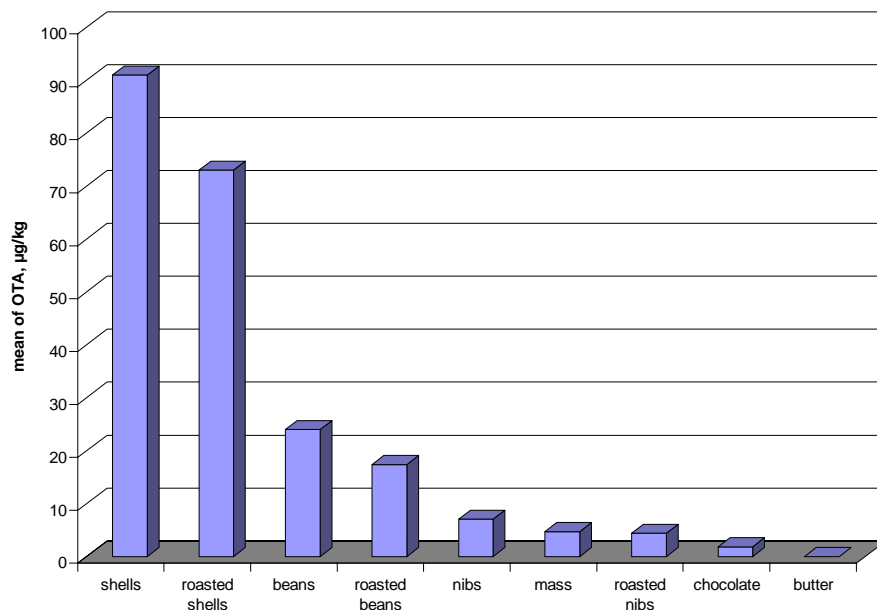
38. L'OTA a été analysée dans 15 paires de d'échantillons de coques de cacao et de graines prélevées au même moment provenant des vanneurs industriels (Gilmour et Lindblom, 2008). Basé sur les résultats pour la coque et la fraction de la graine, la teneur en OTA dans les fèves utilisée pour la transformation a été calculée. La teneur calculée en OTA dans les fèves entières était entre 0,3 et 3,0 ng/g. Une moyenne de 48 % (gamme 25-72%) de l'OTA dans les fèves a été retirée avec la fraction de la coque.

39. Dans une étude où les coques de cacao ont été retirées à la main, Amazqueta et al., (2005) ont observé une réduction de la teneur en OTA de >95 pour cent dans 14/22 échantillons, de 65-95 pour cent dans 6/22 échantillons et seulement un échantillon a montré une réduction de moins de 50 pour cent.

40. Une analyse de 170 échantillons des produits au cacao des différentes origines géographiques ont indiqué que les niveaux les plus élevés d'OTA ont été détectés dans la coque de cacao et le tourteau au cacao (0.1 à 23.1µg/kg) et seulement un niveau mineur dans les produits au cacao tels que le tourteau au cacao, la pâte de cacao, les graines grillées, le beurre de cacao, le cacao en poudre et le chocolat (Bonvehi, 2004).

41. Les graines sont broyées afin de former une masse/liqueur de cacao, un liquide visqueux contenant ~ 50 pour cent de matières grasses. La masse/liqueur de cacao peut être mélangée avec d'autres ingrédients pour produire du chocolat ou elle peut être « pressée » pour produire du beurre de cacao et du cacao en poudre. Après avoir pressé toute l'OTA originellement présente dans les graines elle est retrouvée dans le cacao en poudre. Ce résultat est prévisible puisque le cacao en poudre est une fraction concentrée de solides de cacao. L'OTA n'a pas été trouvée dans la fraction de beurre de cacao (Gilmour et Lindblom, 2008).

42. Seize échantillons larges de fèves de cacao sèches spécialement entreposées dans des conditions qui ont favorisé la croissance de la moisissure pendant quatre mois ont été transformés en beurre de cacao et en chocolat afin de déterminer l'effet de la transformation sur la teneur en OTA des fèves contaminées. Les coques ont été retirées à la main. Parmi les 16 échantillons transformés, les niveaux d'OTA variaient entre 3.37 et 46.15 µg/kg, avec une moyenne de 24.0 µg/kg. Les coques des fèves vertes ont été contaminées le plus fortement avec une valeur moyenne de 91.0 µg/kg. Les chocolats contenaient 1.86 µg/kg en moyenne et le beurre était exempt d'OTA (voir Figure 3). En moyenne, environ 70 pour cent de l'OTA a été retirée avec la fraction de coque (Dembele et al. 2009).



Mean of OTA: Moyenne d'OTA

Shells: coques

Roasted shells : coques torréfiées

Beans: fèves

Roasted beans fèves torréfiées

Nibs: graines

Mass: Pâte

Roasted nibs: graines torréfiées

Chocolate: chocolat

Butter: beurre

**Figure 3.** Niveau moyen de l'OTA dans différents produits de transformation de fèves de cacao contaminées. Données de la Côte d'Ivoire (Dembele et al., 2009).

### OCCURRENCE DE L'OTA DANS LES PRODUITS CACAOTÉS

43. Dix échantillons de cacao en poudre et 9 échantillons de chocolat pris sur le marché libre en Belgique ont été analysés en 2005 (Christine Vinx, 2007). Cinq échantillons de cacao en poudre étaient inférieurs à la limite de quantification (LOQ) (0,3 µg/kg) et les 5 autres échantillons restants contenaient des teneurs en OTA variant de 0,60 à 0,81 µg/kg. L'ensemble des 9 échantillons de chocolat contenaient des teneurs en OTA inférieures à la LOQ.

44. Dans une étude menée au Japon en 2005, 14 des 41 échantillons de chocolat au détail analysés contenaient des niveaux d'OTA situés dans une fourchette de <0.10 (14 échantillons) à 0.94 µg/kg (MHLW, 2006).

45. Le rapport sur les travaux de la coopération scientifique 3.2.7<sup>44</sup> a montré que 81,3 pour cent des produits cacaotés analysés étaient contaminés par l'OTA. Cela revient à dire que parmi les 547 échantillons de produits cacaotés analysés, 445 étaient positifs. La teneur de la contamination variait dans une fourchette allant de 0,01 à 3,8 µg/kg, pour une moyenne de 0,23 µg/kg (Tableau 6) (Miraglia et Brera, 2002).

46. Vecchio et Finoli (2007) ont détecté des niveaux d'OTA de 0.1 à 3 µg/kg dans 82 pour cent de la poudre de cacao commercialisée en Italie; deux échantillons avaient des niveaux de > 2 µg/kg.

47. Burdaspal et Legarda (2003) ont évalué l'occurrence de l'OTA dans 296 échantillons de différents types de chocolat et du cacao en poudre acheté en Espagne et autres 15 pays. L'OTA a été détectée dans tous les échantillons à l'exception d'un échantillon (99.7 pour cent d'échantillons positifs). Les détails sont indiqués dans le tableau 6.

48. Turcotte et Scott (2010) ont détecté de l'OTA dans le cacao et les produits au cacao disponibles sur le marché de la vente au détail canadien à une incidence de 100 pour cent. Les concentrations d'OTA dans le cacao solubilisé (n=16) se situaient dans une fourchette de 0.57-7.8 µg/kg, tandis que les concentrations dans le cacao naturel (n=16) se situaient dans une fourchette de 0.25-2.6 µg/kg. Six échantillons de cacao (5 solubilisés et 1 naturel) avaient une teneur de d'OTA de > 2 µg/kg. les concentrations dans le chocolat de cuisson au four (n=7), Chocolat noir (n=14) et chocolat au lait (n=7) se situaient dans une fourchette de 0.12-1.4, 0.17-0.88 et 0.05-0.19 µg/kg, respectivement.

49. En Italie, 60 pour cent des 300 échantillons de cacao en poudre et des produits au chocolat achetés avaient des niveaux d'OTA au-dessus de LOQ (0.08 µg/kg). Tous les échantillons de cacao en poudre étaient contaminés et le niveau le plus élevé d'OTA a été trouvé dans un échantillon de barre au chocolat noir (Tableau 6). Les concentrations moyennes étaient en dessous de la limite légale antérieure (0.5 µg/kg pour les produits au chocolat et 2.0 µg/kg pou le cacao en poudre) (Brera et al., 2010).

Tableau 6. La teneur en ochratoxine des différents produits au cacao

Produit	Origine	Total / échantillons positifs*	LOQ ou LOD, µg/kg	Max, µg/kg	Médiane, µg/kg	Moyenne, µg/kg	Références
Chocolat		41/27		0.94			MHLD, 2006
Chocolat		40 <sup>2</sup>					MAFF, 1999
Chocolat	Allemagne	352/297	0.01	3.6	0.06	0.1	Miraglia et Brera, 2002
Chocolat	RU	40/18	0.1	0.6	0.1	0.38	Miraglia et Brera, 2002
Chocolat	Espagne	35	0.01		0.12		Burdaspal & Legarda, 2003
Chocolat	Pas l'Espagne	52	0.01		0.268		Burdaspal & Legarda, 2003
Confiseries au chocolat	Italie	47/21		0.42		0.15	Brera, et al. 2010
Coque de cacao	Brésil	19/19	0.01	2.01		1.13	Copetti, 2009
Beurre de cacao	Brésil	25/5	0.01	0.06		0.03	Copetti, 2009
Beurre de cacao	divers	4/0	0.1				Bonvehi, 2004
Beurre de cacao	Pays-Bas	6/0	0.25				Miraglia et Brera, 2002
Cacao à tartiner	Pays-Bas	8/0	0.25				Miraglia et Brera, 2002
Tourteau au cacao	Brésil	26/19	0.01	3.18		0.97	Copetti, 2009
Tourteau au cacao	divers	80/74	0.1	9		2.79	Bonvehi, 2004
Poudre à boire au cacao		247/101	0.1-0.5 <sup>3</sup>			0.2	Gilmour & Lindblom, 2008
Pâte de cacao	divers	8/4	0.1	3.5		1.07	Bonvehi, 2004
Pâte de cacao	Pays-Bas	1/0	0.25				Miraglia et Brera, 2002
Cacao en poudre	Brésil	44/44	0.01	5.13		1.09	Copetti, 2009
Cacao en poudre	divers	31/29	0.1	4.4		2.41	Bonvehi, 2004
Cacao en poudre	Pas l'Espagne	21			0.24		Burdaspal & Legarda, 2003
Cacao en poudre	Pas l'Espagne	5			0.17		Burdaspal & Legarda, 2003
Cacao en poudre		1189/1094	0.1-0.5 <sup>3</sup>			1	Gilmour & Lindblom, 2008
Cacao en poudre	Italie	18/9	9	0.77		0.43	Tafuri et al., 2004 <sup>1</sup>
Cacao en poudre		20/19		2.4		0.68	MAFF, 1999
Cacao en poudre		20/20				1.67	MAFF, 1999
Cacao en poudre	Allemagne	96/91	0.01	1.8	0.3	0.38	Miraglia et Brera, 2002
Cacao en	RU	40/39	0.2	2.4		1.2	Miraglia et Brera, 2002

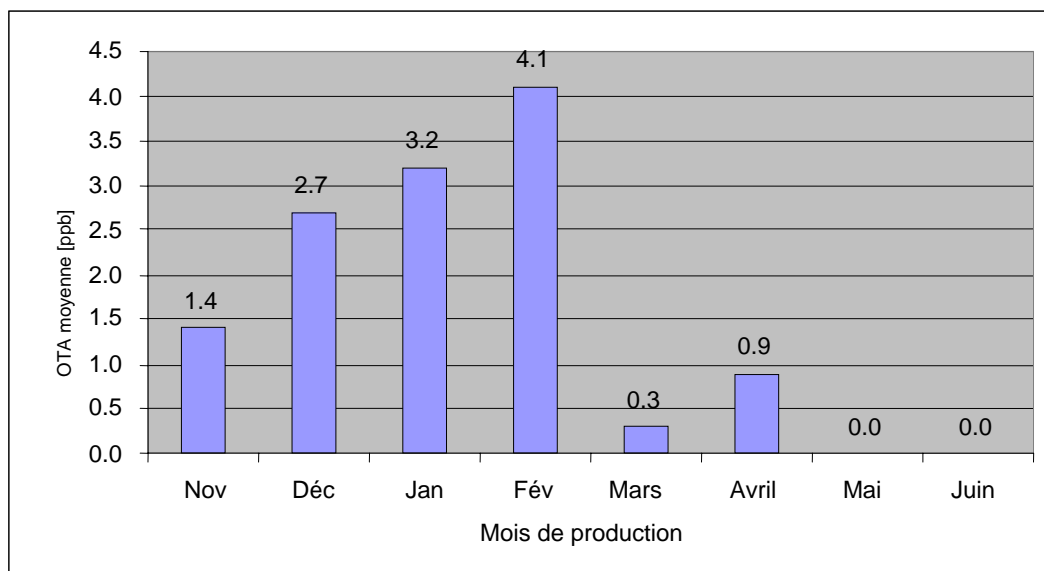
Produit	Origine	Total / échantillons positifs*	LOQ ou LOD, µg/kg	Max, µg/kg	Médiane, µg/kg	Moyenne, µg/kg	Références
poudre							
Cacao en poudre	Pays-Bas	6/0	0.25				Miraglia et Brera, 2002
Cacao en poudre	Italie	40/40		1.82		0.55	Brera, et al. 2010
Chocolat noir	Italie	120/92		0.74		0.20	Brera et al. 2010
Chocolat noir	Brésil	25/25	0.01	0.87		0.34	Copetti, 2009
Chocolat noir	Espagne	35			0.25		Burdaspal & Legarda, 2003
Chocolat noir	Pas l'Espagne	52			0.27		Burdaspal et Legarda, 2003
Chocolat noir		536/300	0.1-0.5 <sup>3</sup>			0.26	Gilmour et Lindblom, 2008
Chocolat/ Crème au chocolat	-	11/8	0.1	1.59		0.63	Bonvehi, 2004
Oeufs de Paques	Italie	15/5		0.50		0.20	Brera, et al. 2010
Liqueur	Brésil	25/5	0.01	1.09		0.34	Copetti, 2009
Chocolat au lait	Brésil	25	25	0.45		0.15	Copetti, 2009
Chocolat au lait	Espagne	47			0.12		Burdaspal & Legarda, 2003
Chocolat au lait	Pas l'Espagne	122			0.1		Burdaspal & Legarda, 2003
Chocolat au lait	Italie	78/21		0.26		0.15	Brera et al. 2010
Chocolat au lait		228/52	0.1-0.5 <sup>3</sup>			0.16	Gilmour & Lindblom, 2008
Chocolat en poudre	Brésil	25/25	0.01	0.92		0.39	Copetti, 2009
Chocolat blanc	Brésil	25/23	0.01	0.05		0.03	Copetti, 2009
Chocolat blanc	Espagne	5			0.03		Burdaspal & Legarda, 2003
Chocolat blanc	Pas l'Espagne	9			0.03		Burdaspal & Legarda, 2003

## FACTEURS AFFECTANT LA PRÉSENCE DE L'OTA DANS LE CACAO

50. Gilmour and Lindblom (2008) ont indiqué une étude conduite entre 1999 et 2004 en Afrique de l'Ouest (Figure 4). L'objectif de l'étude était d'identifier les points de contrôle critiques de la chaîne de production du cacao qui fourniront la base de la formulation des stratégies de prévention à instituer dans le cadre de l'analyse des dangers et contrôle des points critiques (HACCP) pour minimiser l'exposition des consommateurs.

Les conclusions étaient:

- a) la contamination commence entre les étapes sur l'arbre/la récolte jusqu'à la pré fermentation, et que les cosses endommagées constituent une partie majeure du problème;
- b) une indication que l'inoculation initiale est apparue avant ou durant la fermentation;
- c) la procédure de séchage pour les fèves de cacao peut jouer un rôle dans le développement de l'OTA mais ne semble pas être la source principale de contamination;
- d) le séchage maigre pour autoriser une augmentation plus avant dans les niveaux de toxine dans les fèves déjà contaminées;
- e) Les niveaux OTA peuvent varier durant la saison de la cueillette;
- f) d'autres augmentations dans les niveaux d'OTA n'ont pas été trouvées dans les échantillons de fèves de cacao à des étapes ultérieures dans la chaîne logistique; et
- g) ~50% de la toxine contaminée est retirée physiquement lorsque les coques sont retirées des fèves.



**Figure 4.** Variation des niveaux d’OTA comme une fonction du mois de production (Gilmour et Lindblom, 2008)

51. Des expériences menées dans les grandes exploitations agricoles de Côte d’Ivoire ont indiqué que des quantités très faibles d’OTA sont produites durant la fermentation. La fermentation a été conduite dans des sacs placés au milieu et sur le sommet des contenants de fermentation en bois. Les contenants ne présentaient pas de contamination à la moisissure visible lorsque la fermentation était complète, la teneur des contenants était sèche à deux différentes profondeurs (3 et 8 cm) dans des lits de séchage. Aucune OTA n’a été détectée dans aucun des échantillons (Gilmour et Lindblom, 2008).

52. A la différence des résultats issus des études sur la fermentation à l’échelle industrielle dans des larges contenants, les fèves produites dans les conditions propres à un petit exploitant (fermentation en tas, petites portions) contenaient de l’OTA dans beaucoup d’échantillons. Le niveau d’OTA était  $> 0.5$  ng/g dans 24 des échantillons (39%) et  $> 2$  ng/g dans 11 échantillons (18%). Les auteurs concluaient que les conditions de séchage seules ne sont pas responsables du niveau d’OTA qui dépend des interactions entre les conditions de la récolte, de la fermentation et du séchage et la saison sèche apparaît être la période la plus critique pour la contamination à l’OTA. Par conséquent, les conditions les plus difficiles de fermentation qui apparaissent à ce moment là à cause des conditions climatiques et la nature du mucilage, pourraient faciliter la croissance de moisissure et la production d’OTA (Gilmour et Lindblom, 2008)

53. Dans un programme d’OTA en cours (Dembele et al., 2009) en Côte d’Ivoire, des études ont été conduites pour déterminer les points critiques de contamination au niveau de la ferme. Les résultats ont montré que les fèves issues des cosse endommagées physiquement étaient les plus contaminées, avec des niveaux variant entre 2.49 à 2.8  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Toutefois, les cosse partiellement pourries ont montré un niveau de contamination de 0.3 à 0.74  $\mu\text{g}/\text{kg}$  bien que les fèves issues de cosse saines avaient une teneur en OTA de 0.22 à 0.37  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (Figure 5).

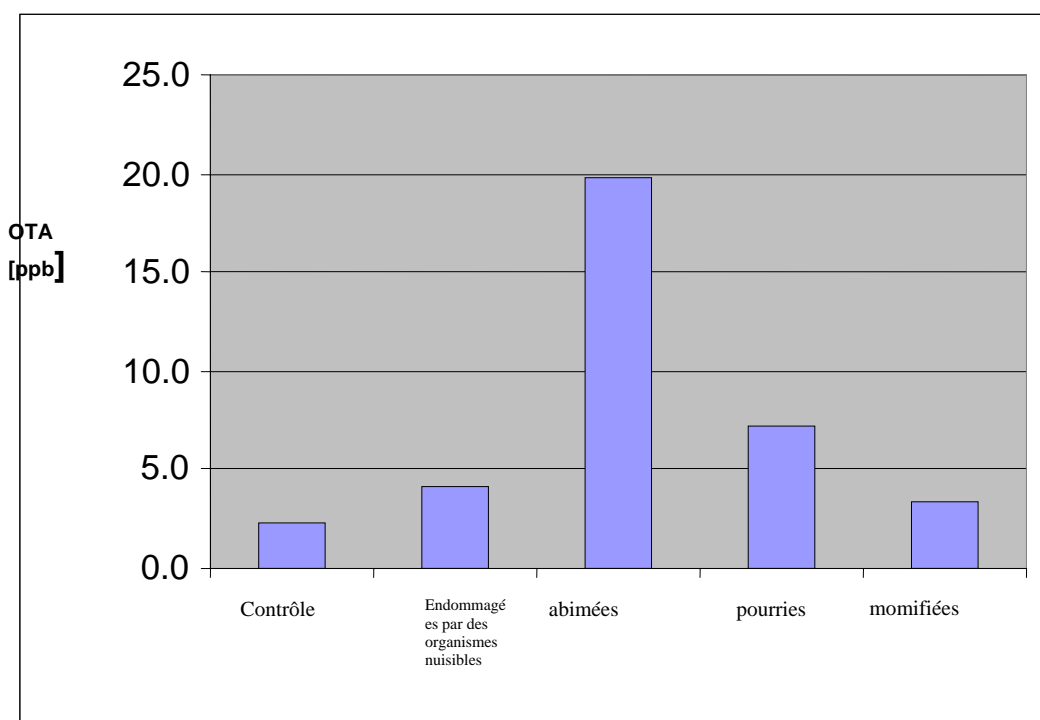


Figure 5. Effet de la condition phytosanitaire des cosses de cacao sur les niveaux d'OTA trouvés dans les fèves de cacao sèches (Bastide et al, 2006)

54. Sur les 37 échantillons prélevés dans les piles de fermentation, les fèves en cours de séchage, les tapis de séchage, les feuilles de plantain et l'air, une seule productrice d'OTA *A. Niger* a été détectée. Par ailleurs, dans les échantillons de fèves de cacao testées positives à l'OTA prélevés pendant le séchage et l'entreposage, une seule productrice d'OTA, *A. carbonarius* a été détectée. Ces travaux sommaires sur la mycoflore des fèves de cacao et le milieu de l'exploitation a montré que les champignons capables de produire l'OTA étaient présents dans les échantillons de fèves et dans le milieu et le matériel agricole (COCOQUAL, 2007).

55. Les études basées sur les publications concernant le cacao ont montré que *A. ochraceus* et les autres moisissures pouvant être extraites du cacao, par ex., *A. carbonarius*, *A. niger*, *A. tubingensis*, ont le potentiel de développer et de produire l'OTA. La production d'OTA dépend fortement des facteurs environnementaux comme la température, le pH et l'activité de l'eau du substrat. Par exemple, pour une activité de l'eau à 0,97, la biosynthèse de l'OTA est optimale. Par exemple, les producteurs modèles d'OTA, *A. niger* BFE 632 enregistrent la production la plus élevée à 30°C sur du malt-agar gélosé alors que *A. carbonarius* BFE 640 produit davantage d'OTA sur le cacao gélosé à 25°C (COCOQUAL, 2007).

## INGESTION ALIMENTAIRE

56. Le groupe scientifique sur les contaminants de la chaîne alimentaire de l'AESA a évalué les niveaux actuels de l'exposition à l'OTA dans les États membres de l'Union européenne se situant entre 15 à 60 ng/pc/semaine (5<sup>ème</sup> RTD Structure du projet du programme d'évaluation des risques d'OTA – QLK1-2001-01614). Ce taux d'exposition est inférieur à la dose hebdomadaire tolérable de 120ng/kg de poids corporel, calculée par le groupe scientifique. Cependant, comme les bases de données actuelles de l'AESA n'incluent pas les nourrissons ni les enfants, le groupe scientifique a conclu que davantage de données seraient nécessaires pour évaluer les taux d'exposition de ce segment de consommateurs, et de ceux qui consomment des quantités larges de certaines spécialités alimentaires régionales contenant de l'OTA (EFSA, 2006).

57. Le rapport de la coopération scientifique SCOOP Task 3.2.2 a présenté des données indiquant qu'une consommation quotidienne de cacao de 31g/jour/personne correspond à une ingestion d'OTA de 21 ng/kg/semaine/personne. La consommation des céréales a contribué pour 55 pour cent à l'ingestion totale. Ce rapport a aussi signalé que cette quantité de cacao contribue à 5 pour cent de l'ingestion totale d'OTA en comparaison avec les céréales qui contribuent à un total de 55 pour cent. Dans l'étude complémentaire

effectuée par SCOOP Task 3.2.7 (Miraglia et Brera, 2002) ont confirmé que les céréales sont toujours la source principale de la contribution de l'OTA à l'ingestion totale.

58. Pour estimer l'exposition alimentaire à l'OTA, le Département de l'alimentation et de l'hygiène environnementale (FEHD, 2006) de Hong Kong a effectué une étude en février 2006 qui couvrait 8 groupes alimentaires majeurs y compris le chocolat et les produits cacaotés. L'exposition alimentaire à l'OTA était respectivement de 4 et de 9ng/kg de poids corporel/semaine pour le lycéen moyen et la personne dont la consommation est supérieure à la moyenne. La source alimentaire principale de l'OTA était les céréales et les produits céréaliers (61 pour cent de l'exposition totale), les chocolats contribuant pour 6 pour cent à l'exposition alimentaire totale.

59. Aux Pays-Bas, la moyenne d'ingestion d'OTA a été estimée être de 1.0 ng/kg pc/jour, dont 5 pour cent issu de la consommation des produits au cacao et de plus de 50 pour cent issues de la consommation de céréales. D'autres contributeurs comprennent le café, le vin rouge et la viande (Baker et Pieters, 2002).

60. Au Canada, l'exposition estimée à l'OTA se situait dans une fourchette de 1.15-1.76 ng/kg pc/jour pour les adultes et de 2.6-4.38 ng/kg pc/jour pour les enfants, avec des céréales et des aliments à base de céréales qui constituaient les contributeurs principaux à l'exposition. Les expositions à l'OTA résultant du cacao et du chocolat n'étaient pas incluses dans l'évaluation (Kuiper-Goodman et al., 2010).

61. En Italie, l'ingestion hebdomadaire la plus élevée d'OTA se référait à la consommation d'œufs de Pâques par les enfants (groupe âgé de 0-10 ans) (Brera et al., 2010). En partant du principe que les produits à base de cacao et de chocolat représentent 4 pour cent de la diète (Miraglia et Brera, 2002), l'ingestion estimée était de 4.8 ng/kg pc/jour, plus basse que la dose hebdomadaire tolérable provisoire (PTWI) établie par l'EFSA (120 ng/kg pc/semaine).

62. En Espagne, l'ingestion quotidienne estimée d'OTA à travers la consommation de chocolat et de produits au cacao (consommation moyenne de 8.6 g, 60 kg pc) était de 0.036 ng/kg pc/jour, qui représente 0.26 pour cent de la dose quotidienne tolérable provisoire (PTDI) établie par JECFA (Burdaspal et Legarda, 2003).

## **SITUATION RÉGLEMENTAIRE**

63. Dans l'Union européenne, le règlement de la Commission CE No. 1881/2006 (Commission Régulation 401/2006, 2006), a établi des niveaux maximaux pour l'OTA dans les céréales brutes, tous les produits dérivés des céréales et des fruits de la vigne séchés (raisins secs et sultanas), le café torréfié, le café soluble, le vin, le jus de raisin, les aliments de l'enfance, les aliments transformés à base de céréales pour les nourrissons et les enfants en bas âge et les aliments diététiques ou à des fins médicales spéciales destinées spécifiquement aux nourrissons. Certains des niveaux maximaux sont déjà en vigueur depuis avril 2002 et d'autres depuis avril 2005.

64. La Communauté européenne (Règlement de la Commission 105/2010) a affirmé que "Sur la base des informations disponibles, il n'apparaît pas nécessaire pour la protection de la santé publique d'établir un niveau maximal d'OTA dans les fruits secs autres que les raisins secs, le cacao et les produits à base de cacao, les produits à base de viande y compris les abats comestibles et les produits sanguins et les vins de liqueur puisqu'ils ne constituent pas des contributeurs significatifs à l'exposition à l'OTA et des niveaux élevés d'OTA ont été rarement trouvés dans ces denrées alimentaires. Dans le cas du café vert et de la bière, la présence de l'OTA est déjà contrôlée à une autre étape plus appropriée de la chaîne de production (respectivement le café torréfié et malt)".

65. En 2003 Le Ministère italien de la Santé, réclamant un principe de précaution, établit une limite légale pour le cacao en poudre et les produits au chocolat estimant qu'il n'y avait pas suffisamment de données d'exposition valables pour ne pas considérer l'OTA comme constituant un risque pour la population. Des limites légales pour l'OTA dans le cacao (2.0 µg/kg) et les produits au chocolat (0.5 µg/kg) ont été établies. Sur la base de l'évaluation des risques effectuée dans Brera et al. (2010), qui n'a pas montré d'inquiétudes relatives à la santé et pour s'aligner sur la réglementation EU, le Conseil supérieur italien de la santé a décidé de retirer la limite légale italienne pour l'OTA dans les produits à base de cacao et de chocolat.

66. Le règlementation mentionnée ci-dessus prévoit que "la justesse de l'établissement d'un niveau maximal pour l'OTA dans les denrées alimentaires telles que les fruits secs autres que les raisins secs, le cacao et les produits au cacao, les épices, les produits à base de viande, le café vert, la bière et la réglisse,

ainsi qu'une révision des niveaux maximaux existants en particulier pour l'OTA dans les raisins secs et le jus de raisin, sera examinée à la lumière de l'opinion de l'EFSA".

67. Le Brésil a une proposition pour l'établissement d'un niveau maximal pour l'OTA dans les fèves de cacao et les produits à base de cacao à 10 µg/kg et 5µg/kg respectivement (ANVISA CP100/2009).

68. Health Canada est actuellement dans le processus de proposer des limites maximales pour l'OTA dans une variété de denrées alimentaires par suite de l'évaluation conduite sur les risques sanitaires (Turcotte et Scott, 2010). Actuellement, les limites maximales pour l'OTA dans le cacao ne sont pas examinées.

69. Le secrétariat américain aux produits alimentaires et pharmaceutiques (FDA) des États-Unis n'a pas fixé de limite consultative ni de seuil d'intervention concernant l'ochratoxine A dans aucune denrée.

## PRÉVENTION ET RÉDUCTION DE L'OTA DANS LE CACAO

70. L'industrie européenne du chocolat et du cacao ainsi que les pays producteurs ont entrepris des études visant à cerner les sources de contamination de l'OTA et à adapter des mesures correctives.

71. Les études récentes menées par l'industrie européenne du chocolat et du cacao dans certains pays producteurs ont montré que l'OTA est présente dans les fèves de la plupart des pays producteurs et que les pratiques utilisées pendant les premières étapes de la transformation dans l'exploitation cacaoyère sont critiques. Par conséquent, cela signifie que les interventions devront agir au niveau de l'exploitation pour que la réduction de la contamination par l'OTA soit significative. (Gilmour et Lindblom, 2008). Les actions préventives pourraient inclure la ségrégation des cosses abimées, le contrôle de la fermentation et des processus du séchage.

72. Une étude conduite dans les petites exploitations en Côte d'Ivoire et au Togo laisse entendre que l'OTA est liée aux pratiques de transformation après récolte comme les cabosses défectueuses et aux conditions climatiques liées au mois de récolte. (Bastide et al., 2006).

73. Coppetti et al. (2010) ont évalué les niveaux d'OTA Durant la transformation du cacao dans la ferme et a conclu que l'étape du séchage est le point critique

74. Certain système de gestion de la qualité existe concernant la transformation primaire du cacao. Dahl (2006), dans le cadre du projet Cocoqual financé par l'Union européenne, a développé un système de gestion de la qualité basé sur ISO 22000 pour la transformation primaire du cacao dans le but d'assurer une bonne qualité y compris la prévention de la formation de l'OTA.

75. La découverte d'une bactérie de l'acide lactique qui inhibe la croissance des moisissures ochratoxigéniques a des conséquences profondes sur la sécurité sanitaire des aliments en permettant de prévenir l'OTA dans le cacao. Cette découverte peut éventuellement être exploitée dans le développement futur des cultures nécessaires à la fermentation du cacao (COCOQUAL, 2007).

76. Des données indiquent que les composés phénoliques antioxydants, l'acide gallique, l'acide vanillique, l'acide 4-hydroxybenzoïque, la catéchine, l'acide cafféique (certains d'entre eux étant présents dans les fèves de cacao), inhibent généralement la production et la prolifération de l'OTA chez plusieurs espèces *Aspergillus* ochratoxigéniques. L'effet de chacun de ces composés sur la production et la prolifération de l'OTA diffère selon les souches et est généralement variable, ce qui donne à penser que la production et la réponse aux composés phénoliques de l'OTA spécifique d'espèce subissent l'influence de différents facteurs écologiques et environnementaux. L'information concernant les réponses génétiques et physiologiques aux composés antioxydants pourrait permettre d'élaborer des stratégies d'intervention ciblée sur la réduction des pertes économiques due à la contamination par l'OTA (Palumbo et al, 2007)..

77. Les huiles essentielles de *Aframomum danielli* ont montré qu'elles réduisaient les niveaux d'OTA dans la poudre au cacao enrichie avec une réduction de l'efficacité de 64 – 95% (Aroyeun et Adegoke, 2007). La pertinence de ce travail est d'examiner la probabilité de l'emploi de l'A. danielli comme une étape dans des procédures destinées à la réduction de l'OTA dans des échantillons contaminés grossièrement.

78. Soixante-cinq bactéries lactiques d'isolats d'origine de cacao étaient testées en utilisant une méthode d'observation à distance pour leur capacité à inhiber la croissance de *12 OTA produisant des moisissures*. Les souches les plus testées de *L. fermentum* et *L. plantarium* ont inhibé la croissance de moisissure (COCOQUAL, 2007).



79. Une partie majeure de l'OTA originellement présent dans les fèves de cacao est trouvée dans la fraction de la coque qui est retirée durant la transformation. D'autres étapes de la transformation issue des fèves de cacao aux produits finis ne conduit pas au retrait ou à la destruction/dégradation de l'OTA. Par conséquent, un processus de décorticage bien contrôlé pourrait réaliser une réduction très importante des niveaux d'OTA dans les produits dérivés du cacao (Amézqueta et al., 2005). La description de la norme Codex pour la pâte de cacao ou la liqueur de cacao/chocolat est le produit obtenu de la graine de cacao qui est obtenue des fèves de cacao de qualité marchande qui ont été nettoyées et libérées de coques aussi minutieusement que cela est techniquement possible (Codex Stan, 2001).

## CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS

80. Le présent document de travail sur l'OTA dans le cacao mène aux conclusions et recommandations générales suivantes pour examen à la cinquième session du Comité du Codex sur les contaminants dans les aliments :

- (a) La production de cacao représente une activité économique importante pour tous les pays producteurs de cacao en Afrique, en Asie et en Amérique latine.
- (b) Les données disponibles indiquent que si les fèves de cacao ne sont pas correctement traitées afin de minimiser la colonisation des champignons ochratoxigéniques, des hauts niveaux de l'OTA pourraient se développer dans les produits au cacao.
- (c) Il n'y a pas suffisamment de données mais il existe des points critiques bien connus qui pourraient être contrôlés afin de minimiser la formation d'OTA.
- (d) Le cacao constitue un composant mineur du régime alimentaire de l'homme et apporte une petite contribution à l'ingestion alimentaire totale d'OTA. Toutefois la plupart des études n'incluent pas les nourrissons et les enfants dans leur évaluation.
- (e) La majeure partie de l'OTA originellement présente dans les fèves de cacao se trouve dans la fraction de la coque qui n'est pas consommée. Le Codex Alimentarius fournit déjà une recommandation pour la coque et les germes de cacao contenus dans le cacao en pâte et le tourteau de cacao.

### Recommandations:

81. Les États-membres du Codex ainsi que l'industrie de transformation du cacao devraient être encouragés à:

- a) Contrôler les niveaux d'OTA dans le cacao et les produits à base de cacao sur une période de sept ans,
- b) Promouvoir les études afin de développer un plan d'échantillonnage spécifique à l'OTA dans le cacao et les produits au cacao;
- c) Développer des études destinées aux petits exploitants fermiers afin de générer des données sur les niveaux d'OTA sur plusieurs années.
- d) Conduire des études d'ingestion diététiques de l'OTA dans le cacao et les produits à base de cacao pour les nourrissons et les enfants.

82. En tenant compte de la connaissance actuellement disponible, un Code d'usages pourrait être examiné pour un futur développement. Le Code d'usage pourrait inclure des dispositions sur : les étapes de transformation primaires (Pré récolte, Récolte, Après récolte -transport, sélection et lavage, cassage des cosses, fermentation, séchage, entreposage) et étapes de transformation secondaires (transport, torréfaction et décorticage, emballage, entreposage). Par conséquent, les producteurs devraient être aidés avec du matériel de formation apparenté ou de l'expérience ou avec une formation adaptée afin de comprendre les procédures qu'ils devraient suivre pour être capables de réduire la contamination par l'OTA de leurs produits. Une formation détaillée doit être développée là où nécessaire.

**RÉFÉRENCES**

- Abrokwa F., and Sackey S. T., (2010). Studies on conditions that predispose cocoa to ochratoxin A contamination
- ADM Cocoa, 1999. The De Zaan Cocoa Products Manual: an ADM Publication on Cocoa Liquor, Cocoa Butter, Cocoa Powder, Koog an de Zaan, Netherlands: ADM Cocoa B.V.
- Amezqueta, S., Gonzalez-Penas, E., Murillo, M., & Lopez de Cerfin, A (2005) Occurrence of ochratoxin A in cocoa beans: effect of shelling. *Food Additives and Contam.* 22: 590 - 595
- Amezqueta, S., Gonzalez-Penas, E., Murillo, M., & Lopez de Cerfin, A (2004) Validation of a high performance liquid chromatography analytical method for ochratoxin A quantification in cocoa beans. *Food Additives and Contam.* 21: 1096 -1106
- ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consulta Pública nº 100, de 21 de dezembro de 2009 - Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) de micotoxinas em alimentos. D.O.U de 22/12/2009.
- Appiah V. 2001. The Use of ionizing radiation from <sup>60</sup>Co gamma source in controlling moldiness in dry cocoa. PhD Thesis, University of Ghana, Legon.
- Aroyeun, S. O. and Adegoke, G. O. (2007) Reduction of ochratoxin A in spiked cocoa powder and beverage using aqueous extracts and essential oils of *Aframomum danielli*. *African J. Biotechnol.* 6: 612 - 616
- Bakker, M., Pieters, M. N. (2002) Risk assessment of ochratoxin A in the Netherlands. RIVM report 388802025/2002
- Bastide, P., Fourny, G., Durand, N., Petithuguenin, P., Guyot, B., Gilmour, M and Lindblom, M (2006) Identification of Ochratoxin A sources during cocoa post-harvest processing: influence of harvest quality and climatic factors. 15<sup>th</sup> Intl Cocoa Res. Conf., San Jose, Costa Rica, 9-17 October 2006
- Bonvehí, S. J. (2004) Occurrence of ochratoxin A in cocoa products and chocolate. *J. Agric. Food Chem.* 52: 6347 - 6352
- Boorman, G. A. (1989) Toxicology and carcinogenesis studies of ochratoxin A in F344/N rats. NTP Technical Report NTP TR 358
- Boudra, H., Le Bars, P, and Le Bars, J. (1995) Thermostability of Ochratoxin A in wheat under two moisture conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:1156-1159
- Brera, C., Grossi, S., De Santis, B., Miraglia, M (2003) High performance liquid chromatographic method for the determination of ochratoxin A in cocoa powder. *J. Liq. Chromatog. Related Technologies* 26: 585 - 598
- Brera, C., Grossi, S., Miraglia, M (2005) Interlaboratory study for ochratoxin A determination in cocoa powder samples. *J. Liq. Chromatog. Related Technologies* 28: 35 – 61
- Brera, C., Grossi, S., Debegnach, F., De Santis, B., Minardi, V., Miraglia, M (2006) Proficiency testing as a tool for implementing internal quality control: the case of ochratoxin A in cocoa powder. *Accred. Qual. Assur.* 11: 349 - 355
- Brera, C., Iafra, I., Debegnach, F., De Santis, B., Pannunzi, E., Berdini, C., Prantera, E., Gregori, E., Miraglia, M. Ochratoxin A in cocoa and chocolate products from the Italian market: occurrence and exposure assessment. (Submitted for publication to *Food Control*, 2010).
- Burdaspal, P. A., and Legarda, T. M. (2003). Ochratoxin A in samples of different types of chocolate and cacao powder, marketed in Spain and fifteen foreign countries. *Alimentaria* 347: 143-153
- CAOBISCO/ECA/FCC (2003) Joint CAOBISCO/ECA/FCC updated position on ochratoxin A in cocoa and chocolate products. *CAOBISCO/ECA/FCC 725: 1 -752: 1 - 6*
- COCOQUAL (2007). Developing biochemical and molecular markers as indices for improving quality assurance in the primary processing of cocoa in West Africa. Final Report. Analysis of the mycological status of cocoa beans with emphasis on ochratoxigenic fungi. Project No.ICA4-CT-2002-10040 (EU 5<sup>th</sup> FP INCO-DEV Project) [http://cordis.europa.eu/data/PROJ\\_FP5](http://cordis.europa.eu/data/PROJ_FP5)
- Codex Alimentarius Commission (1998) Position paper on ochratoxin A. FAO/WHO, Rome, Italy. [http://www.who.int/fsf/chemicalcontaminants/ochratoxinpp99\\_14.pdf](http://www.who.int/fsf/chemicalcontaminants/ochratoxinpp99_14.pdf)
- CODEX STAN 141-1983, Rev. 1-2001 Standard for Cocoa (Cocoa) Mass (Cocoa/Chocolate Liquor) and Cocoa Cake. Commission Regulation (EC) No. 401/2006 (23 February 2006) Laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. Official Journal of the European Union L70/12
- Commission Regulation No. 1881/2006 (19 December 2006) Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Official Journal of the European Union, L 364/4-364/24.

- Commission Regulation (EC) No. 105/2010 (5 February 2010) Amending Regulation (EC) No 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards ochratoxin A. Official Journal of European Union, L 35/7.
- Copetti, M.V. 2009. Micobiota do cacau: Fungos e Micotoxinas do cacau ao chocolate. PhD. Thesis, Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.
- Copetti, M.V; Pereira, J.L.; Iamanaka, B.T.; Pitt, J.I; Taniwaki, M.H. 2010. Ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in cocoa during farm processing. Intl. J. Food Microbiol. 143: 67-70.
- Dahl, M. W. (2006) Development of a management system for the primary processing of cocoa – based on quality and food safety. MSc. Thesis, The Royal Veterinary and Agricultural University, Dept of Dairy and Food Science, Frederiksberg, Denmark.
- Dembele, A., Coulibaly, A.; Traoré, S.K. ; Mamadou, K. ; Silue, N. ; Abba Touré, A. (2009) Détermination du niveau de contamination de l'ochratoxine A (OTA) dans les fèves de cacao à l'exportation. Tropicultura, 27: 1, 26-30.
- DNFCS database, Risk Assessment of Ochratoxin A in the Netherlands, M. Bakker, M.N. Pieters.
- Dongo, L., Bandyopadhyay, R., Kumar, M. and Ojiambo, P. S. (2008) Occurrence of ochratoxin A in Nigerian ready for sale cocoa beans. Agricultural J. 3: 4 – 9.
- European Food Safety Authority - EFSA (2006) Opinion of the Scientific Panel on contaminants in the Food Chain of the EFSA on a request from the Commission related to ochratoxin A in food.(4 April 2006) [http://www.efsa.europa.eu/etc/medialib/efsa/science/contam/contam\\_opinions/1521.Par.0001.File.dat/contam\\_op\\_ej365\\_ochratoxin\\_a\\_food\\_en1.pdf](http://www.efsa.europa.eu/etc/medialib/efsa/science/contam/contam_opinions/1521.Par.0001.File.dat/contam_op_ej365_ochratoxin_a_food_en1.pdf)
- European Food Safety Authority - EFSA (2010) Statement on recent scientific information on the toxicity of Ochratoxin A. (4 June 2010) <http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/1626.pdf>
- FAO/WHO/UNEP (1999) Mycotoxin prevention and decontamination. Corn: a case study. Third Joint FAO/WHO/UNEP Intl. Conf. Mycotoxins 6b: 2 - 11
- FEHD Report (2006) LegCo Panel (9 May 2006) LegCo Panel on Food Safety and Environmental Hygiene (Hong Kong). <http://www.legco.gov.hk/yr05-06/english/panels/fseh/paper/fe0509cb2-1905-04-e.pdf>
- Gilmour, M and Lindblom, M (2008) Management of Ochratoxin A in the Cocoa Supply Chain: A Summary of Work by the CAOBISCO/ECA/FCC Working Group: Mycotoxins: Detection methods, Management, Public Health and Agricultural Trade, CAB International.
- ICCO (2007) Production of Cocoa Beans. Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics. <http://www.icco.org/statistics/production.aspx> (posted 22 October 2007)
- International Agency for Research on Cancer (IARC) (1993). IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans; IARC Working Group, WHO: Lyon, France, vol. 56
- JECFA (1995) Evaluation of certain food additives and contaminants. Forty-fourth Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO Technical Report Series No. 859, 1995
- JECFA (2001) Safety evaluation of certain mycotoxins in Food. Fifty-sixth Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO Food Additives Series 47 – FAO Food and Nutrition Paper –IPCS- International Programme on Chemical Safety, WHO, Geneva, 2001
- JECFA (2007). JECFA/68/SC. Summary and Conclusions. Geneva, 19-28 June 2007, 18p.
- Lobeau, M., De Saeger, S., Sibanda, L., Barna-Vetro, I. And Van Peterghem, C. (2007) Application and validation of a clean-up tandem assay column for screening ochratoxin A in cocoa powder. Food Additives and Contaminants 24: 398 – 405.
- MAFF (1999) Ministry of Agriculture and Fisheries and Food. Survey of Aflatoxins and ochratoxin A in cereals and retail product. Food Surveillance information Sheet No.130. <http://archive.food.gov.uk/maff/food/infsheet/1999/no185/185ochra.htm>
- MHLW (2006) Ministry of Health, Labour & Welfare, Japan. OTA contamination in retail chocolate in Japan in 2005
- Minifie, B. W. (1982) In B. W. Minifie (ed), Chocolate, cocoa an confectionery: Science and Technology, 2<sup>nd</sup> ed. AVI Publishing Company, Westport, Connecticut.
- Miraglia, M., Brera, C. (2002) Assessment of dietary intake of ochratoxin A by the population of EU member states, Reports on tasks for scientific cooperation, task 3.2.7., 69-86. Publisher: SCOOP Directorate-General Health and Consumer Protection. [http://ec.europa.eu/food/fs/scoop/3.2.7\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/fs/scoop/3.2.7_en.pdf)

- Mounjouenpou, P., Gueule, D., Fontana-Tachon, A., Guyot, B. Tondje, P. R. and Guiraud, J-P. Filamentous fungi producing ochratoxin a during cocoa processing in Cameroon (2008). *International Journal of Food Microbiology* 121: 234-241.
- Murphy P. A., Hendrich, S., Landgren, C., Bryant, C. M.(2006) Food Mycotoxins: An Update. *J. Food Sci.* 71: R51 – R65
- O'Brien, E., Dietrich, D. R. (2005) Ochratoxin A: The continuing enigma. *Crit. Rev. Toxicol.* 35: 33 - 60
- Palumbo, J. D., O'Keeffe and Mahoney, N. E. (2007) Inhibition of ochratoxin A production and growth of *Aspergillus* species by phenolic antioxidant compounds. *Mycopathologia* 164: 241 – 248
- Pittet, A., Royer, D. (2002) Rapid, low cost thin-layer chromatographic screening method for the detection of ochratoxin A in green coffee at a control level of 10 ug/kg. *J. Agric. Food Chem.* 50: 243 - 247
- Ratters M., and Matissek R., (2006).No OTA in fresh cocoa beans. *Mycotoxin Research* Vol. 23, No. 2
- Sangare-Tigori, B., Moukha, S., Kouadio, J. H., Dano, D. S., Betbeder, A. M., Achour, A. And Creppy, E. E. (2006) Ochratoxin A in human blood in Abidjan, Cote d'Ivoire. *Toxicol.* 47: 894 – 900.
- Schwartz, G. G. (2002) Hypothesis: Does ochratoxin A cause testicular cancer? *Cancer Causes Control* 13: 91 - 100
- Scott, P.M. (1996): Effects of processing and detoxification treatments on ochratoxin A. In: C.P.Kurtzman & J.W. Fell: *Food Additives and Contaminants*. Fourth edition. Elsevier, Amstersam. pp.214-220.
- Spanjer, M. C., Scholten, J. M., Kastrup, S., Jorissen, U., Schatzki, T. F. and Toyofuku, N. (2006) Sample comminution for mycotoxin analysis: Dry milling or slurry mixing? *Food Additives and Contaminants* 23: 73 – 83.
- Stander, M.A., Steyn, P.S., van der Westhuizen, F.H. and Payne, B.E. (2001). A kinetic study into the hydrolysis of the ochratoxins and analogues by carboxypeptidase A. *Chemical research in Toxicology*, 14: 302-304.
- Tafari, A., Ferracane, R., Ritieni, A (2004) Ochratoxin A in Italian marketed cocoa products. *Food Chem.* 88:487 - 494
- Tsubouchi, H., Terada, H., Yamamoto, K., Hisada, K., Sakabe, Y. (1995) Caffeine degradation and increased ochratoxin production by toxigenic strains of *Aspergillus ochraceus* isolated from green coffee beans. *Mycopathologia*, 90: 181 – 186
- Turcotte, A.M.; Scott, P.M. Ochratoxin A in cocoa and chocolate sampled in Canada. *Food Additives and Contaminants* (accepted, 2010)
- Vecchio, A.; Finoli, C. (2007) Ochratoxin A in cocoa products. *Industrie Alimentari*, 46:1015-1020.