

ABORDAGEM ANALÍTICA PARA AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO DE OCRATOXINA A EM CAFÉ

VARGAS, E.A.¹; SANTOS, E.A.¹; CASTRO, L.¹ e AQUINO, V.C.¹

¹Ministério da Agricultura e do Abastecimento, Laboratório de Controle de Qualidade e Segurança Alimentar. Av. Raja Gabaglia, 245, Cidade Jardim, Belo Horizonte, MG – CEP 30380-090, Brasil. E-mail: gena@cldnet.com.Br. Subprojetos 19.1998.354.01, 19.2000.501.01 e 19.2000.501.02

RESUMO: Estudos encontram-se em andamento no Brasil para desenvolver e validar métodos analíticos para determinação e quantificação de Ocratoxina A (OTA) em café beneficiado, torrado e solúvel, e para estabelecer plano de amostragem para avaliar a contaminação de lotes de café beneficiado por OTA. Um método por cromatografia em camada delgada (CCD) unidimensional com quantificação visual e densitométrica foi estabelecido com limite de detecção (LD) de 0,5 µg/kg. Estudo colaborativo aprovado pela AOAC International para validar internacionalmente um método para determinar OTA em café beneficiado foi iniciado. Procedeu-se à automação das etapas de purificação e detecção de um método por imunoafinidade e CLAE usando um processador automático de amostra ASPEC XL em café beneficiado e torrado. Nenhum kit comercial avaliado, até o momento, mostrou-se eficiente para triagem e quantificação de OTA em café beneficiado. O estudo do plano de amostragem foi iniciado com a proposição de um delineamento estatístico. Diferentes granulometrias foram determinadas para três tipos de moinhos avaliados, no que diz respeito à moagem de café beneficiado. Diferenças significativas foram encontradas para o nível de contaminação determinado para OTA em submostras de café beneficiado obtidas de diferentes moinhos subamostradores.

Palavras-chave: Ocratoxina A, café beneficiado, CLAE, CCD, validação, granulometria.

ANALYTICAL APPROACH FOR EVALUATION OF THE OCHRATOXIN A CONTAMINATION IN COFFEE

ABSTRACT: Several studies are underway in Brazil to develop and validate analytical methods for determination and quantification of ochratoxin A (OTA) in green coffee, roasted and soluble coffee, and to establish a sampling plan to evaluate the OTA contamination in green coffee. A one-dimensional TLC method has been established with detection limit (LD) of 0.5 µg/kg. A Collaborative Study approved by AOAC International for validating a method to determine OTA in green coffee has started. Automation of the clean-up and detection steps of a LC method using a sample preparation system (ASPEC XL) for

determining OTA in green and roasted coffee has been fully accomplished. None of commercial kits for screening and quantification of OTA in green coffee evaluated so far have shown efficient for screening and quantification of OTA. A sampling plan study has been started with the design of a protocol. Different ratios of particle size have been found for three different mills evaluated for grinding green coffee. Significant differences have been found in the OTA contamination level in green coffee sub samples obtained from different sub sampler mills.

Key words: Ochratoxin A, green coffee, LC, TLC, validation, particle size.

INTRODUÇÃO

Ocratoxina A (OTA) é um metabólito secundário tóxico produzido principalmente por *Aspergillus ochraceus*, *A. carbonarius* e *A. niger* e por *Penicillium verrucosum* em climas tropical e temperado, respectivamente (1,2). A OTA foi classificada como uma substância do grupo 2B pela IARC (3), o que significa a existência de evidência suficiente de sua carcinogenicidade renal para animais e possivelmente para humanos.

Até o presente, a Comissão Européia tem discutido a possibilidade de estabelecer níveis para OTA (3µg/kg) tanto em grãos de café torrado quanto em produtos do café. O estabelecimento de limites regulatórios para OTA em café determina, para os países produtores, a necessidade de utilização de métodos analíticos validados que sejam exatos, precisos e sensíveis e planos de amostragem adequados. Os métodos validados existentes para café beneficiado (4) não atendem a regulamentação proposta, da mesma forma que a não-existência de um plano de amostragem adequado torna a avaliação da contaminação do café por OTA de difícil abordagem. Métodos de triagem específicos e sensíveis para OTA são bastante desejáveis para monitoramento rápido do café beneficiado. A adoção de requisitos para garantia da qualidade analítica, como a Norma NBR ISO/IGC 17025, por alguns países importadores de café determina que os laboratórios dos países exportadores utilizem métodos analíticos validados, possuam controle de qualidade intralaboratorial, rastreabilidade a materiais de referência e que participem de esquemas de proficiência analítica.

Diversos estudos estão em andamento no Brasil com o objetivo de aprimorar a qualidade sanitária do café produzido, no sentido de evitar a formação de mofo. O LACQSA tem sido patrocinado pelo Consórcio Brasileiro para Pesquisa e Desenvolvimento de Café (CBP&D/Café) e pelo Programa Nacional

de Monitoramento e Controle de Contaminantes e Resíduos em Produtos de Origem Vegetal (PNMCRV)/MA, a fim de desenvolver estudos na área de desenvolvimento e validação de métodos e validação, treinamento e qualificação de pessoal, garantia de qualidade analítica e amostragem visando disponibilizar ferramentas para a avaliação da contaminação do café por OTA.

MATERIAL E MÉTODOS

A validação de métodos tem sido feita de acordo com o protocolo IUPAC/AOAC/ISO (5), sendo as características dos métodos determinadas em termos de recuperação (R%), desvio-padrão relativo (DPR%), linearidade e limite de detecção/quantificação (LD/LQ). Na área de desenvolvimento de métodos e validação, para propósitos de regulamentação tem sido dada preferência aos métodos que utilizam purificação em coluna de imunoafinidade e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia em camada delgada (CCD) com quantificação visual e densitométrica.

Um método analítico utilizando procedimento de purificação de amostras em colunas de imunoafinidade (6) associado a CCD unidimensional foi estabelecido e as características de desempenho do método foram determinadas. Foram feitos vários testes preliminares para determinar os solventes mais apropriados de retomada do extrato, assim como para eluição das placas cromatográficas (7). Um protocolo de estudo colaborativo baseado no método publicado por Pittet et al. (6) – Determinação de OTA por purificação em colunas de imunoafinidade e CLAE (8) – foi apresentado ao AOAC International. A automação da etapa de purificação e de detecção usando um sistema para preparação de amostra ASPEC XL acoplada a um sistema CLAE foi realizada para análise de café beneficiado e torrado, e a correlação linear com o procedimento normal foi determinada (6,8). A etapa de purificação do método CLAE foi alterada, como a diluição do extrato e tempo de eluição, para adequação ao ASPEC XL. Para propósitos de triagem, foram avaliados kits de imunoensaios disponíveis no mercado de acordo com protocolo intralaboratorial e Instrução Normativa para autorização de uso de kits (AUK) (17). Os kits foram avaliados considerando efeito matriz, aplicabilidade, exatidão, precisão, linearidade, limite de detecção, taxa de falsos positivos/negativos e correlação com um método convencional (6,8). A validação e o desenvolvimento dos métodos se deram em conformidade com um sistema de garantia de qualidade baseado na Norma NBR ISO/IGC 17025.

Um estudo de plano de amostragem encontra-se em andamento. Inicialmente, têm sido elaborados testes para avaliar o uso de diferentes tipos de moinhos disponíveis no mercado no Brasil, levando em conta granulometria, subamostragem, tempo de moagem e aquecimento da amostra durante o processo de

Um protocolo de estudo colaborativo (8) do método validado intralaboratorialmente (6) usando coluna de imunoafinidade e CLAE para determinação de OTA em café beneficiado foi aprovado pela AOAC International.

As características de desempenho do método são mostradas na Tabela 1.

A automação do procedimento de purificação e da etapa de detecção foi completamente realizada. As análises de amostras de café beneficiado e torrado artificialmente contaminado pelo ASPEC apresentaram recuperações \geq que 70% e desvio-padrão relativo (DPR) \leq 20%, sendo a correlação linear (r^2) entre os dois procedimentos maior que 0,9, o que está em conformidade com as recuperações publicadas por Pittet et al. (1996) e com o desempenho determinado pelo LACQSA (8).

Tabela 1 - Características de desempenho do método: CCD – densitometria (fase normal e fase reversa) e CLAE

Método	Linearidade da curva de calibração	Recuperação (%)	Desvio-padrão relativo DPR (%)	DPR (%) Etapa de detecção em CCD	LD ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Fase normal sílica gel CCD ^e	$>0,999$ (0,04 - 84 ng)	83,7 - 104 ^c 98,4	1,1 - 8,2 ^c 11,1 - 18,1 ^d	0,1 - 15 ^c 2,6 - 17,1 ^d	0,5
Fase reversa (C ₁₈) CCD ^e	$>0,99$ (0,42 - 84 ng)	80 - 110 ^c	9,5 ^f 12, 1 ^g	0,4 - 18,8 ^d	-
CLAE	$>0,999$ 0,2 - 60 $\mu\text{g}/\text{kg}$	80 - 108% ^a	11 - 21 ^{a,c} 10,5 ^b	-	0,12

a) Determinado usando amostras artificialmente contaminadas, na faixa de 0,2 a 109 $\mu\text{g}/\text{kg}$, n=5; b) determinado usando uma amostra-teste de café beneficiado naturalmente contaminada (5,23 $\mu\text{g}/\text{kg} \pm 0,55$, n=42); c) determinado usando amostra artificialmente contaminada; d) determinado usando amostra de teste naturalmente contaminada; e) placa cromatográfica; f) média-artificialmente contaminada; g) média - naturalmente contaminada.



Figura 2 - Padrão de OTA e extratos de amostras aplicados em placa cromatográfica, fase normal CCD, 10 x 20, 0,25 mm de espessura. Solvente de retomada do extrato: tolueno-ácido acético (99:1, v/v); solvente de eluição; tolueno-acetato de etila - ácido fórmico 88% (6:3:1, v/v/v).

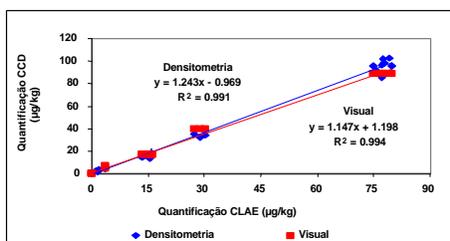


Figura 3 - Coeficiente de correlação (R^2) entre CLAE e CCD fase normal – quantificação visual e densitométrica para amostras de café beneficiado artificialmente contaminadas.

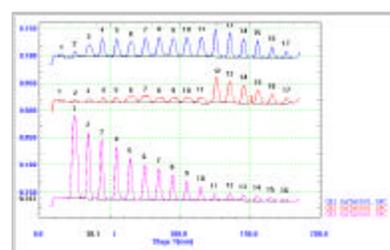


Figura 4 - Densitogramas de padrão de OTA (rosa) e extratos de amostras aplicados (azul – fase normal e vermelho – fase reversa) em placas de vidro CCD – fase normal.

Diferentes percentagens de granulometria de café beneficiado foram obtidas com os três tipos de moinhos (Figura 1). A maior percentagem de partículas maiores (14 mesh) e menores (<28 mesh) foi obtida quando os moinhos 1 e 2 foram usados, respectivamente. Diferentes níveis de contaminação por OTA foram encontrados na análise das frações de café beneficiado (14-28 mesh) obtidos com o moinho tipo 1 (Figura 5). A mais alta contaminação por OTA foi encontrada na fração com a amostra de granulometria mais fina (menor que 28 mesh), indicando a possível influência da granulometria na contaminação determinada. Foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) para os níveis de contaminação por OTA em sub amostras de café beneficiado independente dos moinhos subamostradores tipos 2 e 3 (Tabela 2). Os níveis de contaminação determinados para as sub amostras obtidas do subamostrador A (moinho tipo 2) foram estatisticamente mais baixos do que aqueles determinados para a subamostra obtida do subamostrador B; e os níveis de contaminação para as subamostras obtidas do subamostrador A (moinho tipo 3) foram estatisticamente mais baixos do que aqueles determinados dos sub amostradores B e C, sendo os resultados obtidos para as subamostras dos subamostrador B = subamostrador C (Tabela 2). A diferença encontrada entre as subamostras pode ser devido à falta de uma distribuição homogênea de granulometria dentro do moinho, causando conseqüentemente distribuição não-homogênea de contaminação de OTA nas subamostras. Muitas dificuldades têm sido enfrentadas durante o processo de moagem, como o aquecimento das amostras (40-60°C) e o tempo consumido na moagem (30 minutos/kg), quando foram usados os tipos 2 e 3.

Tabela 2 - Análise descritiva e comparativa de níveis de contaminação por OTA em subamostras de café beneficiado obtidas dos moinhos subamostradores dos tipos 2 e 3

Moinho	Sub amostrador	n	Níveis de contaminação por OTA - Medidas descritivas			
			Mediana	Média	DP	p
Tipo 2	A	30	0,24	0,44	0,74	0,009 A < B
	B	30	0,43	0,60	0,74	
Tipo 3	A	21	2,44	3,78	4,99	0,001 A < B = C
	B	21	3,06	4,63	5,99	
	C	21	2,42	4,16	5,31	

Nota: p para o moinho tipo 1, teste de Wilcoxon; p para o moinho tipo 2, teste de Freidman; $p < 0,05$; DP: desvio-padrão.

Nenhum dos kits de imunoenaios disponíveis no comércio avaliados até o momento (15, 16, 17) se mostrou eficiente para avaliar a contaminação por OTA em café beneficiado, com respeito a exatidão, precisão e taxa de falso positivo/falso negativo. Resultados inconsistentes têm sido encontrados até mesmo para amostras não-contaminadas ($nd < 0,12 \mu\text{g}/\text{kg}$), indicando que os efeitos de matrizes têm sido

uma restrição ao uso dos kits de imunoenaios para triagem de OTA em café (Figura 6), especialmente quando os limites regulatórios propostos são muito baixos e próximos dos limites de detecção dos kits. Além das dificuldades analíticas, o alto custo desses kits torna seu uso pouco atrativo para os países em desenvolvimento.

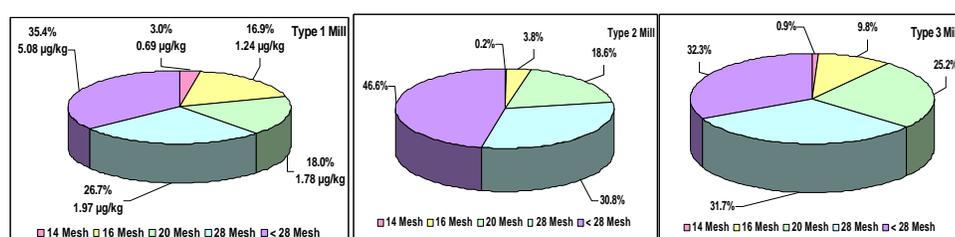


Figura 5 - Percentagem de granulometria obtida para os três tipos de moinhos.

Nível de contaminação por OTA determinado para as frações do moinho tipo 1.

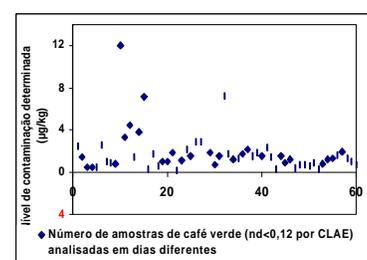


Figura 6 - Níveis de contaminação por OTA (falso positivos) determinados para amostras não-contaminadas de café beneficiado ($nd < 0.12 \mu\text{g/kg}$) por fluorimetria (17).

CONCLUSÃO

Os estudos sobre desenvolvimento de métodos e validação, em conformidade com a norma NBR ISO 17025, têm contribuído para o estabelecimento de um método oficial para café beneficiado por CLAE. As características de desempenho do método CCD unidimensional, em termos de recuperação (R%), desvio-padrão relativo (DPR%) e limite de detecção (LD) alcançados no presente estudo, tornam o método aplicável em programas de monitoramento e pesquisa especialmente nos países produtores de café e podem atender uma futura regulamentação para OTA em café beneficiado. O método CCD unidimensional pode estar imediatamente disponível para todos os laboratórios, sem a necessidade de adquirir equipamentos de alto custo; ele foi encaminhado para publicação como método oficial no Diário Oficial da União. Há grande necessidade de um estudo de validação interlaboratorial para o método de CCD para torná-lo mais amplamente disponível. O Estudo Colaborativo da AOAC já foi iniciado, com previsão de finalização em seis meses. A automação do método por CLAE permite que grande número de

amostras seja analisado de uma só vez. O estudo do plano de amostragem foi iniciado com a discussão do delineamento estatístico. Foi verificada a influência da granulometria do café beneficiado nos níveis de contaminação por OTA. Os estudos para definir as condições ideais de moagem do café beneficiado deverão continuar, com vistas a definir os moinhos mais apropriados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- MANTLE, P. G., CHOW, A. M., 2000, Ochratoxin A formation in *Aspergillus ochraceus* with particular reference to spoilage of coffee. **International Journal of Food Microbiology**, 56, p.105-109.
- MANTLE, P. Uptake of radio labelled ochratoxin A from soil by coffee plants, 2000, **Phytochemistry**, 53, 377-378.
- IARC - International Agency for Research on Cancer, 1993, **Ochratoxin A, IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Some Naturally Occurring Substances, Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatics Amines and Mycotoxins** (Lyon: International Agency for Research on Cancer), pp.489-521.
- AOAC – Association of Official Analytical Chemist, 1998, Natural Toxins. **Official Methods of AOAC International**. Chapter 49, pp. 39-40. 16th edition, 4th revision. (Software Adobe and E-DOC/CJS).
- IUPAC – International of Pure and Applied Chemistry, 1988, Protocol for the Design, Conduct, and Interpretation of Collaborative Studies. Prepared by William Horwitz. *Pure and applied Chemistry*, 60, p.855-864.
- PITTET, A., TORNARE, D., HUGGETT, A., VIANI, R., 1996, Liquid chromatographic determination of ochratoxin A in pure and adulterated soluble coffee using an immunoaffinity column clean-up procedure. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 44, 3564-3569.
- SANTOS, E. A., VARGAS, E. A., 2001, Immunoaffinity column clean-up and thin layer chromatography for determination of ochratoxin A in green coffee. Submitted to **Food Additives and Contaminants**. May 2001.
- VARGAS, E. A., SANTOS, E.A., PITTET, A., 1999, Collaborative Study D-2 protocol submitted for consideration by AOAC International: Determination of ochratoxin A in green coffee by immunoaffinity column clean-up and LC. 28p.
- JOHNSON, R. & BHATTACHARYYA, G., 1986, *Statistics Principles and Methods*, New York: John Wiley & Sons, 578p.
- CONOVER, W. J., 1980, *Practical Nonparametric Statistics*, New York: John Wiley & Sons, 493 p.
- SAS INSTITUTE INC., 1985, *SAS User's Guide: Statistics Version 5*, Cary NC: SAS Institute Inc.

van der STEGEN, G. V. D., JORISSEN, U., PITTET, A., SACCON, M., STEINER, W., VINCENZI, M., WINKLER, M., ZAPP, J. and SCHALATTER, C., 1997, Screening of European coffee final products for occurrence of ochratoxin A (OTA). **Food Additives and Contaminants**, 14, 211-216.

STUDER-ROHR, I., DIETRICH, D.R., SCHLATTER, J., SCHLATTER, C., 1994, Ochratoxin A and coffee. **Mitt. Gebiete Lebensmittelunters. Hyg.**, 85, 719 – 727.

LEVI, C.P., 1975, Collaborative study of a method for the determination of ochratoxin A in green coffee. **Journal of Association of Official Analytical Chemist**, 58, 258-262.

RIDASCREEN®FAST Ochratoxin A. R-Biopharm GmbH, Darmstadt, Germany.

VERATOX® Ochratoxin Instruction Manual, Neogen Corporation, USA.

VICAM Ochratest Instruction Manual, 1999. (17) Instrução Normativa SDA No. 50 de 05 de dezembro de 2000.