


**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
**FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**  
**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS**

**OCRATOXINA A EM CAFÉ**  
**BRASILEIRO**

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Regina Prado Zanes Furlani aprovada pela Comissão Julgadora em 16 de dezembro de 1998.

Campinas, 16 de dezembro de 1998

  
Profa. Dra. Lucia Maria Valente Soares  
Presidente da Banca

Regina Prado Zanes Furlani  
Tecnóloga Química

Profa. Dra. Lucia Maria Valente Soares  
Orientadora

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Campinas -SP

1998

910.074.01

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	
V. Ex	
TOMADO	BC/36435
PROC.	229/99
C <input type="checkbox"/>	D <input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	03/02/99
N.º CPD	

CM-00120539-9

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

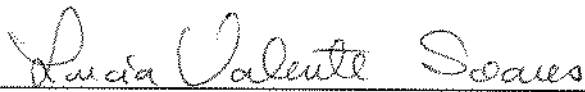
F978o Furlani, Regina Prado Zanes  
Ocratoxina A em café brasileiro / Regina Prado Zanes Furlani  
-- Campinas, SP: [s.n], 1998.

Orientador : Lucia Maria Valente Soares  
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Ocratoxina. 2. Café. 3. Micotoxinas. I. Soares, Lucia  
Maria Valente II. Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Tese defendida e aprovada, em 16 de Dezembro de 1998, pela banca examinadora constituída por




---

Profa. Dra. Lucia Maria Valente Soares (orientadora)



---

Dra. Myrna Sabino (membro)



---

Profa. Dra. Heloisa Mascia Cecchi (membro)

---

Dra. Marta Hiromi Taniwaki (membro)

*Ao José Eduardo,*

*dedico*

*Aos meus pais*

*Neusa e Francisco,*

*carinhosamente agradeço*

"Pode-se viver no mundo uma vida magnífica quando se sabe trabalhar e amar, trabalhar pelo que se ama e amar aquilo em que se trabalha."

*Tolstói*

“Só existe uma coisa melhor do  
que fazer novos amigos:  
conservar os velhos.”

*Elmer G. Letterman*

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Lucia Maria Valente Soares, pela orientação desta tese, pelo apoio, amizade e constante disponibilidade.

Às Professoras Helena Godoy, Heloisa Cecchi e Regina Franco pelo apoio e pela oportunidade da realização deste trabalho.

À Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP pela infra-estrutura oferecida.

À Cia Cacique de Café Solúvel, na pessoa do Sr. Paulo Lauro C. Oliveira, pela disponibilização das amostras e reagentes.

À Juliana Monteiro Zanes, pela correção ortográfica e gramatical.

À Luciane Kawashima e Natália Janzantti pela amizade e apoio incondicionais.

Ao amigos da secretaria do Departamento de Ciência de Alimentos, Marquinho, Marcão e Jardete pela ajuda em todos os momentos.

À todos os amigos do Laboratório de Análise de Alimentos, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao Sr. Cosme Perota, funcionário da secretaria de pós graduação de FEA, pela presteza e paciência.

Aos membros da banca, Dras. Myrna Sabino, Marta Taniwaki e Heloisa Cecchi pelas sugestões apresentadas para a redação final da tese.

Ao meu esposo José Eduardo pelo incentivo na realização desta tese.



# SUMÁRIO

INDÍCE DAS TABELAS.....	iii
INDÍCE DAS FIGURAS.....	iv
RESUMO.....	v
SUMMARY.....	vi
INTRODUÇÃO.....	1
<b>CAPÍTULO 1 — REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>2</b>
1- Natureza Química e Efeitos Tóxicos das Ocratoxinas.....	3
2 - Metodologia Analítica para Determinação de Ocratoxina A.....	6
3 - Metodologia Analítica para Determinação de Ocratoxina A em Café.....	7
4 - Incidência de Ocratoxina A em Café.....	9
5 - Efeitos do Processamento na Ocratoxina A em café.....	11
6 - Bibliografia.....	13
<b>CAPÍTULO 2 — AVALIAÇÃO DE MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE OCRATOXINA A EM CAFÉ VERDE E CAFÉ TORRADO.....</b>	<b>18</b>
Resumo.....	19
Abstract.....	20
1 - Introdução.....	21
2 - Materiais e Métodos.....	23
2.1 - Reagentes, Solventes e Materiais Diversos.....	23
2.2 - Equipamentos.....	23
2.3 - Preparo do Padrão de Ocratoxina A.....	23
2.4 - Cromatografia em Camada Delgada.....	24
2.5 - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	24
2.6 - Testes de Recuperação do Padrão de Ocratoxina A Adicionado em Colunas de Extração em Fase Sólida.....	25
2.7 - Limpeza dos Extratos.....	30
2.7.1- Clarificação.....	30
2.7.2 - Partição.....	32
2.7.3 - Extração em fase sólida.....	32
Sílica e Octadecilsilil.....	32
Imunoafinidade.....	33
2.8 - Testes de reutilização das colunas de imunoafinidade.....	34
3 - Resultados e Discussão.....	34
3.1 - Reprodutibilidade do detector.....	34
3.2 - Recuperação do padrão de ocratoxina A adicionado em colunas de extração em fase sólida.....	35
3.3 - Limpeza dos extratos de café verde e torrado.....	35
3.3.1- Clarificação.....	35
3.3.2 - Partição.....	36
3.3.3 - Limpeza em fase sólida.....	36
3.4 - Reutilização das colunas de imunoafinidade com extratos de café verde.....	37
4 - Conclusões.....	38
5 - Bibliografia.....	39

<b>CAPÍTULO 3 - INCIDÊNCIA DE OCRATOXINA A EM CAFÉ VERDE PROVENIENTE DE VÁRIAS REGIÕES PRODUTORAS BRASILEIRAS.....</b>	<b>42</b>
Resumo.....	43
Abstract.....	44
1- Introdução.....	45
2 - Material e Métodos.....	46
2.1- Amostras.....	46
2.2 - Reagentes.....	47
2.3 - Equipamentos.....	47
2.4 - Preparo da curva padrão de ocratoxina A.....	47
2.5 - Extração e limpeza das amostras.....	48
Extração.....	48
Limpeza com coluna de imunoafinidade.....	48
2.6 - Determinação da ocratoxina A por CLAE.....	48
2.7 - Controle de qualidade analítico.....	49
3 - Resultados e Discussão.....	49
3.1 - Curva padrão.....	49
3.2 - Controle de qualidade analítico.....	50
3.3 - Ocorrência de ocratoxina A nas amostras analisadas.....	50
4 -Conclusões.....	53
5 -Bibliografia.....	55
CONCLUSÕES GERAIS.....	58
ANEXOS.....	59

## ÍNDICE DAS TABELAS

### CAPÍTULO 2 - AVALIAÇÃO DE MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE OCRATOXINA A EM CAFÉ VERDE E CAFÉ TORRADO

<b>Tabela 1.</b>	Sistemas testados para eluição de padrão de ocratoxina A em colunas de extração em fase sólida tipo octadecilsilil utilizando-se quantificação em cromatografia de camada delgada.....	26
<b>Tabela 2.</b>	Sistemas testados para eluição de padrão de ocratoxina A em colunas de extração em fase sólida tipo octadecilsilil utilizando-se quantificação em cromatografia líquida de alta eficiência.....	27
<b>Tabela 3.</b>	Sistemas testados para eluição de padrão de ocratoxina A em colunas de extração em fase sólida tipo cianopropil utilizando-se quantificação em cromatografia líquida de alta eficiência.....	27
<b>Tabela 4.</b>	Sistemas testados para eluição de padrão de ocratoxina A em colunas de extração em fase sólida tipo sílica utilizando-se quantificação em cromatografia de camada delgada.....	28
<b>Tabela 5.</b>	Sistemas testados para eluição de padrão de ocratoxina A em colunas de extração em fase sólida tipo sílica utilizando-se quantificação em cromatografia líquida de alta eficiência.....	29
<b>Tabela 6.</b>	Sistemas testados para eluição de padrão de ocratoxina A em colunas de extração em fase sólida tipo imunoafinidade utilizando-se quantificação em cromatografia líquida de alta eficiência.....	30
<b>Tabela 7.</b>	Sistemas testados para eluição de padrão de ocratoxina A em extratos de café torrado em colunas de extração em fase sólida tipo sílica utilizando-se quantificação em cromatografia líquida de alta eficiência.....	32
<b>Tabela 8.</b>	Sistemas testados para eluição de padrão da ocratoxina A em extratos de café torrado em colunas de extração em fase sólida tipo octadecilsilil utilizando-se quantificação em cromatografia líquida de alta eficiência.....	33
<b>Tabela 9.</b>	Teste de reutilização de colunas de imunoafinidade específicas para ocratoxina A de marcas diferentes.....	38

### CAPÍTULO 3 - INCIDÊNCIA DE OCRATOXINA A EM CAFÉ VERDE PROVENIENTE DE VÁRIAS REGIÕES PRODUTORAS BRASILEIRAS

<b>Tabela 1.</b>	Níveis de contaminação por ocratoxina A em café verde proveniente de várias regiões brasileiras.....	52
------------------	--	----

## ÍNDICE DAS FIGURAS

### CAPÍTULO 1 - REVISÃO DA LITERATURA

**Figura 1.** Estruturas das Ocratoxinas.....4

### CAPÍTULO 2 - AVALIAÇÃO DE MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE OCRATOXINA A EM CAFÉ VERDE E CAFÉ TORRADO

**Figura 1.** Procedimento empregado para verificação da eficiência da limpeza de extratos de café verde e torrado com os clarificantes: sulfato de amônio (30%), acetato de chumbo (20%), sulfato de cobre (10%), mistura de ferrocianeto de potássio (0,25M) e acetato de zinco (1M) e mistura de acetato de chumbo (20%) e sulfato de amônio (30%).....31

**Figura 2.** Procedimento empregado para verificação da eficiência da limpeza de extratos de café verde e torrado com os clarificantes: sulfato de amônio (30%) e sulfato de cobre (10%).....31

**Figura 3.** Procedimento empregado para a verificação da eficiência da limpeza de extratos de café verde e torrado em colunas de imunoafinidade.....34

**Figura 4.** Perfil cromatográfico de uma amostra de café verde contaminado artificialmente com ocratoxina A nas condições descritas em 2.5.....37

### CAPÍTULO 3 - INCIDÊNCIA DE OCRATOXINA A EM CAFÉ VERDE PROVENIENTE DE VÁRIAS REGIÕES PRODUTORAS BRASILEIRAS

**Figura 1.** Curva padrão da ocratoxina A. CV médio=4,1% (0,3 - 9,0) e  $y=222756x$ ,  $r^2 = 0,995849$ .....50

**Figura 2.** Perfil cromatográfico de uma amostra de café verde contaminada naturalmente e uma amostra não contaminada.....51

## RESUMO

A ocratoxina A é um metabólito tóxico produzida por várias espécies de *Aspergillus* e *Penicillium*, principalmente *A. ochraceus*. Tem sido detectada em um grande número de produtos alimentícios tais como: milho, feijão, café verde e café torrado. A Itália propôs em 1996 um limite de 4 ng/g para café verde e na União Européia existe uma proposta de que o valor máximo permitido de ocratoxina A em café seja diminuído para 2,0 ng/g. No Brasil não existem limites para ocratoxina A em alimentos. O Brasil é um dos maiores produtores de café no mundo o que representa uma das maiores divisas do país. No entanto, desconhece-se a situação do café produzido no Brasil com relação a essa toxina.

O presente trabalho avaliou as metodologias analíticas disponíveis para determinar ocratoxina A aplicando-as em café verde e torrado. Foi testada a recuperação de padrão de ocratoxina A em colunas de extração em fase sólida de sílica, octadecilsilil, cianopropil e imunoafinidade. Também foram testadas técnicas clássicas de limpeza de extratos (clarificação e partição) em alimentos para determinação de micotoxinas. Os resultados obtidos com limpeza por clarificação e com colunas de extração em fase sólida de sílica e octadecilsilil não foram satisfatórios. A utilização de colunas de imunoafinidade mostrou-se eficaz tanto na limpeza quanto na recuperação (média de 97%), da ocratoxina A em amostras artificialmente contaminadas. Nos testes de recuperação apenas com padrão de ocratoxina A as colunas de imunoafinidade também mostraram-se superiores às outras técnicas testadas.

Um levantamento preliminar da produção brasileira com relação à incidência de ocratoxina A em café foi conduzido. Foram analisadas 84 amostras de café verde provenientes de 6 estados brasileiros (Paraná, São Paulo, Bahia, Minas Gerais, Espírito Santo e Roraima). A ocratoxina A foi encontrada em 18 das amostras em níveis que variaram de 1,7 a 147,5 ng/g. As análises foram feitas com colunas de imunoafinidade na etapa de limpeza e cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência na etapa de quantificação. A coluna analítica utilizada foi Spherisorb ODS-2 e a fase móvel metanol / ácido acético 9% (65+35).

## SUMMARY

Ochratoxin A is a toxic metabolite produced by several *Aspergillus* and *Penicillium* spp. Among those *A. ochraceus* is pointed out as a main producer. Ochratoxin A has been found in many types of foods such as maize, beans, and coffee. In 1996 Italy has set a limit of 4,0 ng/g for Ochratoxin A in green coffee and the European Union is considering a lower limit of 2,0 ng/g. In Brazil no limit has been set so far. Brazil is one of the largest coffee producers in the world and coffee represents a major source of revenue for the country. Nevertheless the situation of Brazilian coffee in regard to this toxin is unknown.

The present work evaluated analytical techniques available for Ochratoxin A determination in foods for possible use in green and roasted coffee analysis. The recovery of Ochratoxin A standard was tested in solid phase extraction (SPE) columns of silica, octadecylsilyl, cyanopropyl, and immunoaffinity. Classical cleanup techniques such as clarification and partition were also tested. The results for SPE silica, cyanopropyl, and octadecylsilyl columns were not satisfactory. Immunoaffinity columns, however, were effective for cleanup and in terms of recovery (average 97%) for Ochratoxin A spiked samples. In recovery tests using pure standards the immunoaffinity columns were also superior to all other techniques tested.

A preliminary survey of the Brazilian coffee for the incidence of Ochratoxin A was conducted. Eighty-four samples of green coffee from six coffee producing states (Paraná, São Paulo, Bahia, Minas Gerais, Espírito Santo and Roraima) were analyzed. Ochratoxin A was found in 18 of the samples in levels from 1,7 a 147,5 ng/g. The analysis were conducted using immunoaffinity columns in the cleanup steps and HPLC with fluorescence detection in the quantification step. The analytical column was Spherisorb ODS-2 and mobile phase was methanol / acetic acid 9% (65+35).

## INTRODUÇÃO

A cultura de café no Brasil tem uma grande importância tanto para o consumo interno quanto para o comércio externo. O Ministério da Indústria do Comércio e Turismo (MICT) do Brasil estima que a safra de café para o ano safra 98/99 será de 33,95 milhões de sacas. A Associação Brasileira dos Exportadores de Café (Abecafé) prevê que a exportação de café em grão será entre 17 e 18 milhões de sacas. A projeção de consumo interno é de 12,5 milhões de sacas e a exportação como café solúvel de 3 milhões de sacas. Barreiras comerciais baseadas na introdução de limites para ocratoxina A em café verde começaram a tornar-se uma realidade de acordo com a regulamentação recentemente sugerida para este fim na Itália. Desde 1996 a Itália sugere o limite de 4 ng/g de ocratoxina A em café verde. Atualmente tramita na União Européia a sugestão que esse limite abaixe para 2,0 ng/g. A situação do café brasileiro em relação à incidência de ocratoxina A é, no entanto, desconhecida. Apenas alguns trabalhos realizados no Japão e na Europa têm incluído algumas amostras de café brasileiro, constituindo-se assim, a única fonte de informação, se bem que escassa, sobre a incidência desta toxina em café nacional.

Diante deste quadro, surge a necessidade de um levantamento amplo da produção brasileira de café. Porém, a condição básica para iniciarmos um trabalho desta natureza está na disponibilidade de técnicas de análise adequadas. Assim sendo, o presente trabalho propôs-se a primeiramente avaliar técnicas analíticas existentes que possam ser utilizadas em laboratórios nacionais. Em segundo lugar, definida a metodologia, realizar um levantamento da incidência de ocratoxina A em café brasileiro proveniente de várias regiões produtoras.

# **CAPÍTULO 1**

## **REVISÃO DA LITERATURA**



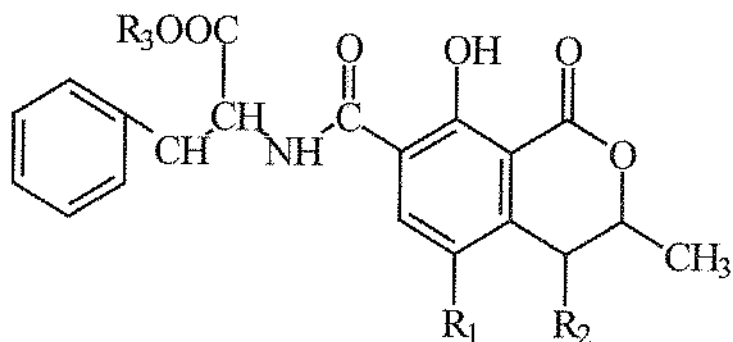
## 1 — NATUREZA QUÍMICA E EFEITOS TÓXICOS DAS OCRATOXINAS

As ocratoxinas são um grupo de sete derivados de isocumarina ligada a uma amida que por sua vez, está unida a um grupo  $\beta$ -fenilalanina (Figura 1). São metabólitos secundários de fungos produzidos por *Penicillium verrucosum* em climas temperados e por várias espécies de *Aspergillus* em climas quentes e tropicais. A principal espécie conhecida, produtora de ocratoxina, é *A. ochraceus*. Porém outras espécies, raramente associadas com alimentos, também podem produzir a toxina, tais como *A. sulphureus*, *A. sclerotiorum* e *A. melleus* (MOSS, 1996). A ocratoxina A aparece com mais frequência na natureza e também é a mais tóxica. Apresenta-se como um pó branco e cristalino quando seca, seu peso molecular é 403,84 e a temperatura de seu ponto de fusão é de 169°C. É pouco solúvel em água (< 1mg/mL) e tem solubilidade moderada em clorofórmio e metanol<sup>1</sup>. A ocratoxina A apresenta intensa fluorescência sob luz ultravioleta, fluorescendo nas cores verde e azul quando em soluções ácidas e alcalinas, respectivamente. Os máximos de absorção quando dissolvida em ácido acético/benzeno (1+99) ou em etanol 95% ocorrem em 332 e 333 nm e sua absortividade molar apresenta valores de 5550 e 6300 nestes dois comprimentos de onda, respectivamente.

Foi demonstrado que a ocratoxina A inibe a síntese de proteína por competição com a fenilalanina. Essa inibição pode ser revertida pelo aminoácido em questão, o que pode explicar por que a fenilalanina previne fortemente o efeito imunossupressor da ocratoxina A e pode parcialmente prevenir a sua ação teratogênica e nefrotóxica. A ocratoxina A também acentua a peroxidação dos lipídeos *in vitro* e *in vivo*. (DIRHEIMER, 1996).

---

<sup>1</sup> United States National Toxicology Program (NTP) Chemical repository (Radian Corporation, August 29, 1991) Ocratoxina A [http://ntp-db.niesh.nih.gov/NTP\\_Chem\\_H&S/NTP\\_Chem3/Radian303-47-9.txt](http://ntp-db.niesh.nih.gov/NTP_Chem_H&S/NTP_Chem3/Radian303-47-9.txt)



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
Ocratoxina A	Cl	H	H
Ocratoxina B	H	H	H
Éster etílico da ocratoxina A (ocratoxina C)	Cl	H	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
Éster metílico da ocratoxina A	Cl	H	CH <sub>3</sub>
Éster etílico da ocratoxina B	H	H	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
Éster metílico da ocratoxina B	H	H	CH <sub>3</sub>
4-hidroxi-ocratoxina A	Cl	OH	H

**Figura 1 - Estruturas das Ocratoxinas**

O principal alvo da atividade tóxica da ocratoxina A é o rim. O fígado, no entanto, também pode sofrer danos quando exposto a altos níveis da toxina (BUSBY & WOGAN (1981).

A Ocratoxina A é nefrotóxica, teratogênica e mutagênica em ratos. Quando foi administrada, por via parenteral, em pássaros, mamíferos e peixes, a ocratoxina A mostrou-se agudamente tóxica, com valores LD<sub>50</sub> variando entre 5 e 30 ng/Kg. Sua toxidez é afetada sinergisticamente pela administração simultânea de outras micotoxinas como citrinina e ácido penicílico. (BUSBY & WOGAN, 1981, HALD, 1988). A nefropatia suína, amplamente estudada na Dinamarca, é um problema para criadores e está associada a frequente exposição à ocratoxina A. Em porcos, a ingestão diária, durante 3 - 4 meses, de 200µg de ocratoxina A por

kilograma de ração, foi suficiente para produzir alterações renais (BUSBY & WOGAN, 1981, PLESTINA, 1996).

Um estudo conduzido pelo "United States National Toxicology Program"<sup>2</sup> (NTP) em 1989, encontrou evidências da atividade carcinogênica da ocratoxina A. Esta pesquisa mostrou um aumento na incidência de adenomas incomuns e nos carcinomas das células tubulares em rins de ratos aos quais a ocratoxina A havia sido administrada. Foram relatadas também alterações renais não neoplásicas que incluíam hiperplasia, proliferação celular, alterações citoplasmáticas, aumento das células e necrose no epitélio renal. Neste estudo ficou claro a evidência de atividade carcinogênica da ocratoxina A em ratos.

A contaminação com ocratoxina A nos cereais utilizados para alimentação, bem como no sangue dos moradores, foi correlacionada com a nefropatia endêmica do Balcãs, disfunção renal em humanos que pode levar à morte. A nefropatia endêmica do Balcãs atinge indivíduos adultos da população rural, e tem similaridade com a nefropatia suína descrita na Dinamarca. (PLESTINA, 1996 ).

A "International Agency for Reserch on Cancer" (IARC)<sup>3</sup> opinou que os dados obtidos a partir de animais de laboratório não são suficientes para calcular o grau de carcinogenicidade da ocratoxina A em humanos e por esta razão a toxina foi classificada como um "possível carcinógeno" para humanos (grupo 2B). (PLESTINA, 1996 ).

Os níveis máximos de ocratoxina A são regulamentados ou estão sendo sugeridos em diversos países e variam de 1 a 5 ng/g para alimentos infantis, 2 a 50 ng/g para cereais e 5 a 300 ng/g para rações (VAN EGMOND, 1996). Na União Européia estão sendo sugeridos, ainda como orientação, valores de 5 ng/g para cereais e 1 ng/g para alimentos infantis, dependendo da metodologia analítica

---

<sup>2</sup> United States National Toxicology Program - Technical Report - 358, "Toxicology análise Carcinogenesis Studies of Ocratoxina A (CAS nº 303-47-9) in F344/N Rats (Gavage Studies)" <http://ntp-server.niehs.nih.gov/htdocs/LT-studies/tr358.html>

<sup>3</sup> Reasonably anticipated to be a carcinogen: ocratoxina A (CAS nº303-47-9) [http://ntp-server.niehs.nih.gov/htdocs/ARC/ARC\\_RAC/Ochratoxin-a.html](http://ntp-server.niehs.nih.gov/htdocs/ARC/ARC_RAC/Ochratoxin-a.html)

disponível (VERARDI & ROSNER, 1995). A regulamentação para café foi sugerida pela Itália em 1996 com um limite de 4 ng/g<sup>4</sup>.

Baseando-se em estudos promovidos pelo "Nordic Council of Ministers", o "Joint Expert Committee on Food Additives" (JECFA), calculou o nível tolerável provisório de ingestão diária de ocratoxina A como 14µg por kg de peso corpóreo por dia (KUIPER-GOODMAN, 1996).

## 2 — METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DE OCRATOXINA A

A determinação de qualquer micotoxina envolve as seguintes etapas: a) amostragem, b) extração e limpeza, d) separação, e) detecção, e) quantificação e f) confirmação da identidade. A amostragem é a etapa de maior importância em uma análise, uma vez que a distribuição de contaminação por micotoxinas é sempre heterogênea. Deve-se também tomar cuidado na escolha do solvente extrator para que não haja perdas do analito. A limpeza do extrato deve ser adequada, eficiente e não remover a micotoxina em estudo (SCOTT, 1995, VAN EGMOND, 1996). Para a separação da ocratoxina A no extrato final e sua quantificação tem sido utilizado cromatografia em camada delgada com detecção sob luz ultravioleta ou cromatografia líquida de alta eficiência (SCOTT, 1995). A confirmação da identidade é essencial e pode ser conseguida com derivações químicas ou com o auxílio de espectrometria de massas (SCOTT, 1995). Também podemos utilizar de técnicas como espectrometria na região do infravermelho. O uso de dois detectores diferentes para procedimentos de confirmação também pode ser utilizado, por exemplo, ultravioleta e fluorescência (SCOTT, 1991). Alguns procedimentos de isolamento da toxina, como por exemplo, as colunas de imunoafinidade (SHARMAN et alii, 1992) e a quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência (O'FLAHERTY, 1993) são altamente específicas e a utilização simultânea de ambas as técnicas já são confirmatórias, dispensando assim, etapas adicionais.

---

<sup>4</sup> Dipartimento Dogane - Circolare n.76 - Ministero delle Finanze - 21/03/1996 - Roma, Itália

A escolha do solvente de extração depende das propriedades químicas da matriz e do sistema de limpeza a ser utilizado (VAN EGMOND, 1996). Solventes orgânicos puros ou combinados com soluções de bicarbonato de sódio ou outros sais têm sido utilizados (LEVI et alii, 1974, CANTÀFORA et alii, 1983, TERADA et alii, 1986, NAKAJIMA et alii, 1990, MILANEZ et alii, 1995, PITET et alii, 1996).

Para limpeza do extrato, são utilizadas partições líquido-líquido ou extração em fase sólida em colunas ou cartuchos recheados com fases estacionárias diversas, tais como: sílica, octadecilsilil e outras (HALD et alii, 1993, WOOD et alii, 1996). Recentemente, colunas de imunoafinidade começaram a ser empregadas (NAKAJIMA et alii, 1990, STUDER-ROHR et alii, 1995, ZIMMERLI & DICK, 1995, SCOOT & KANHERE, 1995, SCUDAMORE et alii, 1997, STEGEN et alii, 1997, PATEL et alii, 1997, BLANC et alii, 1998).

### **3 — METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DE OCRATOXINA A EM CAFÉ**

A partir dos anos 70, vários procedimentos tem sido propostos para determinação de ocratoxina A em café. Em 1974, LEVI et alii aplicaram o método oficial da AOAC, desenvolvido para determinação de ocratoxina A em cevada para determinar a toxina em café verde. O método consiste em extração com clorofórmio e limpeza em coluna de celite e bicarbonato de sódio. A separação da micotoxina é conseguida por cromatografia em camada delgada e a detecção por fluorescência, sob luz ultravioleta. O limite de detecção foi de 20 ng/g. Esse método foi adotado pela AOAC como “método oficial de primeira ação” para determinação de ocratoxina A em grãos de café verde após ter sido estudado colaborativamente (LEVI, 1975). As recuperações obtidas para 3 níveis de fortificação variaram de 60,5% a 85,6%.

Apenas na década seguinte, CANTÀFORA et alii (1983) introduziram a cromatografia líquida de alta eficiência para separar e quantificar a ocratoxina A em café verde. A extração proposta pelos autores foi com bicarbonato de sódio e metanol, seguida por uma etapa de limpeza constando de desengorduramento com isoctano, partição para clorofórmio e passagem por coluna de celite e bicarbonato de

sódio. A cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência foi empregada na etapa final. O limite de detecção obtido foi cerca de 0,2 ng/g. A confirmação dos resultados presuntivos positivos foi por metilação com trifluoreto de boro metanólico.

Em 1986, TERADA et alii descreveram um método para determinação de ocratoxina A em café verde e torrado em grãos, café instantâneo e café coado. A ocratoxina A foi extraída com uma mistura de bicarbonato de sódio e metanol (1+1), seguida de partição para clorofórmio e passagem por coluna de fase reversa de octadecilsilil. O extrato contendo ocratoxina A foi separado por cromatografia líquida de alta eficiência com coluna analítica de octadecilsilil e detecção por fluorescência, utilizando como par iônico o cetiltrimetilamonio, para aumentar a sensibilidade. A quantificação foi feita por padronização externa e a confirmação por esterificação com etanol. O limite de detecção do método correspondeu a 2 ng/g para café em grãos, 5 ng/g para café instantâneo e 0,2 ng/g para café coado. A recuperação média foi 80,7% com desvios padrões relativos que variaram de 3,43 a 5,93%.

NAKAJIMA et alii (1990) desenvolveram uma metodologia que utilizava colunas de afinidade para a limpeza do extrato de amostras de café em grãos, café instantâneo em pó e bebida de café enlatada. O extrato obtido após a passagem pela coluna foi submetido à cromatografia líquida de alta eficiência (fase estacionária de octadecilsilil) e revelou-se muito limpo quando comparado com os obtidos por técnicas convencionais. O limite de detecção do método foi de 0,5 ng/g café em grãos e café solúvel e 0,025 ng/g para bebida de café enlatada.

PITTET et alii (1996) relataram um procedimento para analisar ocratoxina A presente em amostras de café verde e café torrado, em grãos e café solúvel. A ocratoxina A foi extraída com uma mistura de metanol e solução de bicarbonato de sódio. O extrato diluído com tampão fosfato foi aplicado em coluna de imunoafinidade, a coluna foi lavada com água e finalmente a ocratoxina A foi eluída com metanol. O eluído foi então injetado em cromatógrafo líquido de alta eficiência com detecção por fluorescência e novamente foi utilizada coluna analítica de fase reversa C<sub>18</sub>. As recuperações obtidas foram de 80% a 108% e o limite de detecção foi de 0,2 ng/g.

#### 4 — INCIDÊNCIA DE OCRATOXINA A EM CAFÉ

Em 1974, LEVI et alii, utilizando cromatografia em camada delgada, encontraram ocratoxina A em grãos de café verde. Os autores estudaram também a microbiota fúngica e constataram a presença de *A. ochraceus* em um grande número de amostras. Neste mesmo estudo, LEVI et alii (1974) afirmaram que o café não é um bom substrato para a produção de ocratoxina A, pois os níveis observados (450ng/g) quando o café foi inoculado com *A. ochraceus* são bem menores quando comparados com os encontrados em arroz e trigo também inoculados (>1mg/g).

Em uma revisão sobre o assunto, LEVI (1980) concluiu que havia uma baixa incidência de ocratoxina A em café. Concluiu ainda que a probabilidade de se encontrar micotoxinas em café coado era muito baixa e recomendou que o estudo sobre micotoxinas em café deveria ser descontinuado.

Mesmo estando de acordo com LEVI (1980), CANTÀFORA et alii (1983) utilizando cromatografia líquida de alta eficiência analisaram 40 amostras de café verde e encontraram 9 contaminadas, em níveis que variaram de 0,5 a 23 ng/g.

Apenas em 1989, MICCO et alii levantaram o problema novamente, quando encontraram 58% de 29 grandes lotes, estocados em um porto na Itália, contaminados com ocratoxina A em níveis que variaram de 0,2 a 15 ng/g. Também demonstraram que a bebida preparada com grãos contaminados apresentavam resíduos de ocratoxina A. No mesmo período, no Japão, TSUBOUCHI et alii (1988) analisaram amostras de café torrado e moído importado de diversas regiões e comercializado na cidade de Nagoya. Cinco amostras de um total de 68 estavam contaminadas com ocratoxina A em níveis que variaram de 3,2 a 17,0 µg/kg. Esta foi a primeira vez em que se encontrou ocratoxina A em café torrado e moído vendido no varejo.

STUDER-ROHR et alii (1995) analisaram 25 amostras de café verde, das quais, 13 estavam contaminadas com ocratoxina A (0,9 - 50 ng/g). Os autores também examinaram o café coado elaborado a partir de 40 amostras de café torrado e moído comercializados na Suíça. A ocratoxina A foi encontrada em 18 desses cafezinhos em níveis que variaram de 0,7 até 7,8 ng/g do café moído.

PITTET et alii (1996) analisaram 101 amostras de café solúvel procedentes de vários países e 75% dessas amostras estavam contaminadas com níveis de 0,2 a 6,5 ng/g de ocratoxina A. Neste mesmo ano, o Ministério da Agricultura do Reino Unido (MAFF UK)<sup>5</sup> informou que foram analisadas 291 amostras de café verde das espécies *Coffea arabica* e *C. robusta* procedentes de 27 países diferentes e representativas do café em grão que entrava no Reino Unido. Um total de 110 amostras estavam contaminadas. O nível máximo de ocratoxina A encontrado foi de 27,3 ng/g em uma amostra de *C. robusta*. O máximo encontrado em amostras de *C. arabica* foi de 9 ng/g.

Também no Reino Unido, PATEL et alii (1997), analisaram 80 amostras de café solúvel e 20 de café torrado e moído comercializados naquele país. A ocratoxina A foi detectada em 64 amostras de café solúvel (0,2 - 8 ng/g) e 17 de café torrado e moído (0,2 - 2,1 ng/g).

STEGEN et alii (1997) analisaram 633 amostras de produtos de café que foram compradas em diversos países da Europa. Essas amostras foram analisadas em 9 laboratórios diferentes que escolheram livremente a metodologia analítica. Os limites de detecção variaram de 0,2 a 1 ng/g de ocratoxina A para café solúvel e café torrado. Duzentas e noventa e nove amostras estavam contaminadas e o maior nível de ocratoxina A encontrado foi de 27,2 ng/g em café solúvel.

No Japão, NAKAJIMA et alii (1997) determinaram ocratoxina A e aflatoxina B1 em 47 amostras de café verde provenientes da Ásia, África e América do Sul. A metodologia utilizada foi limpeza em coluna de imunoafinidade e quantificação em cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência. A incidência de contaminação foi de 30% e os níveis de ocratoxina A variaram de 0,1 a 17,4 ng/g. O limite de detecção foi de 0,1 ng/g. Nenhuma amostra, de um total de 4 procedentes da América do Sul, estava contaminada.

---

<sup>5</sup> Surveillance of Ochratoxin A in Green (unroasted) coffee MAFF UK Food Surveillance Information Sheet nº 80, March 1996. <http://www.maff.gov.uk/food/infsheet/1996/no80/80oacoff.htm>



O "Food and Drug Administration" (FDA) investigou a ocorrência de ocratoxina A em amostras de café importado e encontrou 6 dentre 12 amostras de café verde e 3 dentre 7 amostras de café torrado, contaminadas com a toxina. Em nenhuma das amostras analisadas foi detectado mais do que 5 ng/g de ocratoxina A. (TRUCKSESS et alii, 1997)

## 5 — EFEITOS DO PROCESSAMENTO NA OCRATOXINA A EM CAFÉ

A ocratoxina A tem-se mostrado muito estável em processamentos de alimentos que envolvam calor (SCOTT, 1996 e BOUDRA et alii, 1995). Especificamente para café, existe uma inconsistência de dados na literatura com relação à estabilidade de ocratoxina A durante a torrefação. LEVI et alii (1974) simularam condições de torrefação de café contaminado artificialmente em laboratório e relataram perdas que variaram entre 78,6-93,3%. GALLAZ & STALDER(1976) (citado por BLANC et alii, 1998) também avaliaram o efeito da torrefação experimental na destruição da ocratoxina A em café contaminado por inoculação com *A. ochraceus* e concluíram que a destruição da toxina foi de 80-90%. CANTÁFORA et alii (1983) torraram duas amostras naturalmente contaminadas com ocratoxina A (3,8 e 23 ng/g). Após a torrefação não foi detectada ocratoxina o que confirmava aparentemente o estudo de LEVI (1980). Em 1989, MICCO et alii também verificaram a destruição da toxina pela torrefação de grãos de café contaminados e observaram perdas de 49 a 87% e de 90 a 100% em amostras artificial e naturalmente contaminadas, respectivamente. Relataram também que a bebida preparada com grãos contaminados apresentava resíduos de ocratoxina A.

Por outro lado, estudos mais recentes vêm demonstrando que a ocratoxina A é resistente à torrefação. TSUBOUCHI et alii (1987) relataram perdas de 0 a 12% para amostras artificialmente contaminadas quando submetidas a tratamento térmico a 200°C por 10 a 20 minutos e que quase a totalidade de ocratoxina A passa para o extrato durante o preparo da bebida com água fervente. Esses dados confirmam os obtidos por STUDER-ROHR et alii (1995) e STEGEN et alii(1997) mas, contradizem MICCO et alii (1989). Segundo TSUBOUCHI et alii (1987), os diferentes modos de adição da toxina na matriz podem distorcer os

resultados obtidos assim como a utilização de metodologias pouco sensíveis pode mascará-los.

Recentemente, BLANC et alii, 1998, objetivando verificar o comportamento da ocratoxina A em um processo industrial de fabricação de café solúvel e empregando metodologia analítica atual e bastante sensível analisaram todas as etapas de processamento, desde a recepção do café verde até o produto final. Constataram que a contaminação em um lote de café verde por ocratoxina A é muito heterogênea, como acontece com outras micotoxinas em outros tipos de grãos. Observaram que há uma pequena redução da toxina durante a limpeza do café verde (retirada de materiais estranhos) e que a maior parte da ocratoxina A foi eliminada durante a torrefação (84%). Constataram também que 80% do residual de ocratoxina A no café torrado é transferido para a água fervente da extração e que na fase de evaporação do extrato para a manufatura do café solúvel há uma perda insignificante da toxina.



## 6 — BIBLIOGRAFIA

- AOAC. **Official Methods of Analysis**, Natural Toxins, 11<sup>a</sup> ed., Cap. 26, 1970.
- BLANC, M.; PITTET, A.; MUÑOZ-BOX, R.; VIANI, R., Behavior of Ochratoxin A During Green Coffee Roasting and Soluble Coffee Manufacture. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.46, n.2, p.673-675, 1998.
- BOUDRA, H., LE BARS, P. and LE BARS, J. Thermostability of ochratoxin A in wheat under two moisture conditions, **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, p. 1156-1158, 1995.
- BUSBY JR., W.F.; WOGAN, G.N. Ochratoxins. In: SHANK, R.C. **Mycotoxins and N-nitroso compounds: environmental risks** Boca Raton: CRC Press,. v. II, chap.9: p.129-136, 1981.
- CANTÀFORA, A.; GROSSI, M.; MIRAGLIA, M.; BENELLI, L. Determination of ochratoxin A in coffee beans using reversed-phase high performance liquid chromatography. **La rivista della Società Italiana di Scienza dell'Alimentazione**, anno 12, n 2, 1983.
- DIRHEIMER, G. Mechanistic approaches to ochratoxin toxicity. **Food Additives and Contaminants**, v.13, Supplement, p. 45-48, 1996.
- GALLAZ, L.; STALDER, R. Ochratoxin A in coffee. **Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.**, v.4, p.147-149, 1976. *Apud*: BLANC, M.; PITTET, A.; MUÑOZ-BOX, R.; VIANI, R., Behavior of Ochratoxin A During Green Coffee Roasting and Soluble Coffee Manufacture. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.46, n.2, p.673-675, 1998.
- HALD, B. Human exposure to ochratoxin A. . In: NATORI, S., HASHIMOTO, K. and UENO, Y. **Mycotoxins and phycotoxins '88** A collection of invited papers presented at the seventh international IUPAC symposium on Mycotoxins and phycotoxins, Tokyo, Japan, 16-19 August 1988. p.57-67, 1988
- HALD, B.; WOOD, G.M.; BOENKE, A.; SCHURER, B.; FINGLAS, P. Ochratoxin A in

- wheat: analyze intercomparison of procedures. **Food Additives and Contaminants**, v.10, n.2, p.185-207, 1993.
- KUIPER-GOODMAN, T. Risk assessment of ochratoxina A: an update. **Food Additives and Contaminants**, v.13, Supplement, p. 53-57, 1996.
- LEVI, C. Mycotoxins in coffee. **Journal of Association Official of Analytical Chemistry**, v.63, p.1282-1285, 1980.
- LEVI, C. P. Collaborative study of a method for the determination of ochratoxin A in green coffee. **Journal of Association Official of Analytical Chemistry**, v.58, p.258-262, 1975.
- LEVI, C. P.; TRENK, H. L.; MOHR, H. K. Study of the occurrence of ochratoxin A in green coffee beans. **Journal of Association Official of Analytical Chemistry**, v.57, p.866-870, 1974.
- MICCO, C.; GROSSI, M.; MIRAGLIA, M.; Brera, C. A study of the contamination by ochratoxin A of green and roasted coffee beans. **Food Additives and Contaminants**, v.6, p.333-339, 1989.
- MILANEZ, T. V.; SABINO, M.; LAMARDO, L. C. A. Comparison of two methods for the determination of ochratoxin a in green coffee beans. **Revista de Microbiologia**, n.26, v.2, p.79-82, 1995.
- MOSS, M. O. Mode of formation of ochratoxin A. **Food Additives and Contaminants**, v.13, Supplement, p. 5-9, 1996.
- NAKAJIMA, M.; TERADA, H.; HISADA, K.; TSUBOUCHI, H.; YAMAMOTO, K.; UDA, T.; ITOH, Y.; UENO, Y. Determination of ochratoxin a in coffee beans and coffee products by monoclonal antibody affinity chromatography. **Food and Agricultural Immunology**, v.2, p.189-195, 1990.
- NAKAJIMA, M.; TSUBOUCHI, H.; MIYABE, M.; UENO, Y. Survey of aflatoxin B1 and ochratoxin A in commercial green coffee beans by high-performance liquid chromatography linked with immunoaffinity chromatography. **Food and Agricultural Immunology**, v.9, p.77-83, 1997.

- O'FLAHERTY, B. Fluorescence detection. In: PARRIOT, D. **A practical guide to HPLC detection**, San Diego, California: Academic Press, Inc, chap. 5, p. 11-143, 1993.
- PATEL, S.; HAZEL, C. M.; WINTERTON, A. G. M.; GLEADLE, A. E. Survey of ochratoxin A in UK retail coffees. **Food Additives and Contaminants**, v.14, p.217-222, 1997.
- PITET, A.; TORNARE, D.; HUGGET, A.; VIANI, R. Liquid chromatographic determination of ochratoxin A in pure and adulterated soluble coffee using an immunoaffinity column cleanup procedure. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.44, p.3564-3569, 1996.
- PLESTINA, R. Nephrotoxicity of ochratoxin A. **Food Additives and Contaminants**, v.13, Supplement, p. 49-50, 1996.
- SCOTT, P. M. Effects of processing and detoxification treatments on ochratoxin A: introduction. **Food Additives and Contaminants**, v.13, Supplement, p. 19-21, 1996.
- SCOTT, P. M. Methods of analysis for mycotoxins – an overview. In: ROSSEL, J. B. and PRITCHARD, J. L. R. **Analysis of oilseeds, fats and fatty foods** London and New York, Ed. Elsevier applied science, Chap. 4, p.141-184, 1991.
- SCOTT, P. M., Mycotoxin methodology. **Food Additives and Contaminants** , v.12, n. 3, p. 395-403, 1995.
- SCOTT, P. M.; KANHERE, S. R. Determination of Ochratoxin A in Beer. **Food Additives and Contaminants**, v.12, n.4, p.591-598, 1995.
- SCUDAMORE, K. A.; HETMANSKI, M. T.; NAWAZ, S.; NAYLOR, J.; RAINBIRD, S. Determination of Mycotoxins in Pet Foods Sold for Domestic Pets and Wild Birds Using Linked-Column Immunoassay Clean-up and HPLC. **Food Additives and Contaminants**, v.14, n.2, p.175-186, 1997.
- SHARMAN, M.; MAC DONALD, S.; GILBERT, J. Automated liquid chromatographic determination of ochratoxin A in cereal and animal products using immunoaffinity

- column clean-up. **Journal of Chromatography**, v.603, p. 285-289, 1992.
- STEGEN, G. V. D.; JÖRRISSEN, U.; PITTET, A.; SACCON, M.; STEINER, W.; VICENZI, M.; WINKLER, M.; ZAPP, J.; SCHLATTER, Chr. Screening of European coffee final products for occurrence of ochratoxin A (OTA). **Food Additives and Contaminants**, v.14, p.211-216, 1997.
- STUDER-ROHR, I.; DIETRICH, D. R.; SCHLATTER, J.; SCHLATTER, C. The occurrence of ochratoxin A in coffee. **Food Chemistry Toxicology**, v.33, p.341-355, 1995.
- TERADA, H.; TSOUBUCHI, H.; YAMAMOTO, K.; HISADA, K.; SAKABE, Y. Liquid chromatographic determination of ochratoxin a in coffee beans and coffee products. **Journal of Association Official of Analytical Chemistry**, v.69, n 6, p.960-964, 1986.
- TRUCKSESS, M. W.; CHOU, J.P.; YOUNG, K.; PAGE, S.W. Determination and survey of ochratoxin a in barley, green coffee and roasted coffee. **FDA Science Forum Poster Abstract**, A30, 1997
- TSUBOUCHI, H.; TERADA, H.; YAMAMOTO, K.; HISADA, K.; SAKABE, Y. Ochratoxin A found in commercial roast coffee. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.36, p.540-542, 1988.
- TSUBOUCHI, H.; YAMAMOTO, K.; HISADA, K.; SAKABE, Y.; UDAGAWA, S. Effect of roasting on ochratoxin A level in green coffee beans inoculated with *Aspergillus ochraceus*. **Mycopathologia**, v.97, p.111-115, 1987.
- VAN EGMOND, H. P. Analytical Methodology and regulations for ochratoxin A. **Food Additives and Contaminants**, v.13, Supplement, p. 11-13, 1996.
- VERARDI, G.; ROSNER, H. Some reflections on establishing a community legislation on mycotoxins. **Natural Toxins**, v.3, p. 337-340, 1995.
- WOOD, G.M.; PATEL, S.; ENTWISLE, A. C.; BOENKE, A. Ochratoxin A in wheat: a second intercomparison of procedures. **Food Additives and Contaminants**, v.13, n.5, p.519-539, 1996.

ZIMMERLI, B.; DICK, R. Determination -. **Journal of Chromatography B**, v.666, p.85-99, 1995.

## **CAPÍTULO 2**

# **AVALIAÇÃO DE MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE OCRATOXINA A EM CAFÉ VERDE E CAFÉ TORRADO**



## RESUMO

Diferentes solventes de extração, assim como técnicas para limpeza de extratos para determinação de micotoxinas, tanto clássicas (clarificação, partição) como aquelas envolvendo colunas para extração em fase sólida (sílica, octadecilsilil e imunoafinidade) foram avaliadas para determinação de ocratoxina A em café verde e torrado. Clarificação, partição e limpeza por passagem em colunas de extração em fase sólida de sílica e octadecilsilil não foram capazes de limpar os extratos de café. As colunas de imunoafinidade, no entanto, mostraram-se eficazes tanto na limpeza dos extratos como na recuperação de ocratoxina A em amostras de café artificialmente contaminadas. Colunas de imunoafinidade de duas marcas diferentes foram testadas com relação à recuperação da toxina e à reutilização em outras análises. Colunas de uma marca apresentaram recuperação média de 97% no primeiro uso e acima de 70% até a quarta utilização. Colunas de uma segunda marca apresentaram recuperação média de 73% no primeiro uso e abaixo de 30% no segundo.

Palavras-chave: Café, Ocratoxina A

## ABSTRACT

Different extraction solvents and cleanup techniques for mycotoxins determination were evaluated for green (unroasted) and roasted coffee. Classical techniques such as partition and clarification as well as solid phase extraction (silica, octadecylsilyl, cyanopropyl and immunoaffinity columns) were tested. Only immunoaffinity columns were capable to effectively remove interferents from coffee extracts allowing ochratoxin A to be determined by HPLC and fluorescence detection at levels of 0,7 ng/g. Two commercial brands of immunoaffinity columns were evaluated for ochratoxin A recovery and multiple use. Average recovery for one brand was 97% and was above 70% on the fourth use. Average recovery for a second brand was 73% on the first use and below 30% on the second use.

Keywords: Coffee, Ochratoxin A

## 1 — INTRODUÇÃO

A ocratoxina A é um metabólito tóxico produzido por cepas de *Penicillium* e *Aspergillus*. A principal espécie conhecida como produtora de ocratoxina é *A. ochraceus* (MOSS, 1996). A ocratoxina A é nefrotóxica e tem ação teratogênica. O fígado é um alvo secundário da toxina (DIRHEIMER, 1996, BUSBY & WOGAN (1981)). A nefropatia endêmica dos Balcãs, doença degenerativa dos rins em humanos que muitas vezes leva à morte, tem sido correlacionada com a alta contaminação por ocratoxina A verificada nos alimentos daquela região (PLESTINA, 1996).

A ocratoxina A tem sido encontrada em vários cereais (SHARMA & SALUNKHE, 1991). Tem sido também relatada a presença de ocratoxina A em grãos de café verde e torrado (MICCO et alii, 1989, TRUCKSESS et alii, 1997, TSOUBOUCHI et alii, 1988, STEGEN et alii 1997) e em café solúvel (PATEL et alii, 1997).

Os limites máximos permitidos para ocratoxina A já existentes ou em fase de proposta em diversos países, variam de 1 a 5 ng/g para alimentos infantis, 2 a 50 ng/g para cereais e 5 a 300 ng/g para rações. (VAN EGMOND, 1996). Na União Européia existem sugestões de limites máximos de 5 ng/g para cereais e 1 ng/g para alimentos infantis (VERARDI & ROSNER, 1995). A Itália, em 1996, propôs um limite de 4 µg/kg para café verde em grãos (DIPARTIMENTO DOGANE, 1996). No Brasil não existem limites para ocratoxina A em alimentos e, por outro lado, desconhece-se a situação do café produzido no país com relação a essa toxina. O Brasil é um grande exportador de café verde, além do fato da bebida preparada com o café torrado ser largamente consumida no país. No entanto, para dar início a um trabalho desta natureza, é necessário primeiramente avaliar a metodologia analítica disponível para as condições existentes nos laboratórios nacionais.

Vários procedimentos têm sido propostos para determinação de ocratoxina A em café. A metodologia AOAC International (1997) utiliza cromatografia em camada delgada para determinar ocratoxina A em café verde. O limite de detecção desse método é de 20 ng/g de ocratoxina A. Com os limites que estão

sendo propostos para café, este tipo de metodologia torna-se ineficaz. Por outro lado, o café é uma matriz especialmente complexa e uma limpeza adequada do extrato para remoção de interferentes faz-se necessário para que limites mais baixos sejam alcançados.

CANTÀFORA et alii (1983) introduziram a cromatografia líquida de alta eficiência para separar e detectar a ocratoxina A em café verde e alcançaram um limite de detecção 100 vezes menor que o da AOAC. TERADA et alii (1986), também utilizando cromatografia líquida de alta eficiência, aplicaram colunas de extração em fase sólida de octadecilsilil para limpeza de extratos de grãos de café (verde e torrado), café instantâneo e café coado. O limite de detecção alcançado estava entre 0,2 e 5 ng/g.

NAKAJIMA et alii (1990) desenvolveram uma metodologia que utilizava colunas de imunoafinidade para a limpeza do extrato de amostras de café em grãos, café instantâneo em pó e bebida de café enlatada. PITTET et alii (1996) propuseram um procedimento para analisar a ocratoxina A em amostras de café verde em grãos, café torrado em grãos e café solúvel que também envolve limpeza em colunas de imunoafinidade. Os cromatogramas apresentados pelos autores mostraram-se sem interferentes na região da ocratoxina A.

Com base nestas considerações, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a aplicabilidade para café das técnicas analíticas existentes para determinação de ocratoxina A e através desta avaliação, escolher uma metodologia dotada dos necessários requisitos de precisão e exatidão para que possa ser usada em laboratórios nacionais.

## 2 — MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 — Reagentes, solventes e materiais diversos:

- padrão de ocratoxina A, marca Sigma®;
- filtros para amostra, marca Millipore®, poro de 0,45µm, 13mm de diâmetro;
- filtro de microfibra de vidro, tipo GF/B, marca Whatman®;
- tampão fosfato, pH7,4 - "Phosphate buffered saline"(PBS), marca Sigma®;
- placas para cromatografia em camada delgada de sílica gel, marca Merck®;
- reagentes de uso comum em laboratório, grau analítico;
- solventes para cromatografia, grau cromatográfico;
- colunas de extração em fase sólida com fase estacionária de sílica, octadecilsilil, cianopropil e de imunoafinidade específicas para ocratoxina A.

### 2.2 — Equipamentos:

- espectrofotômetro ultravioleta / visível, modelo Lambda 6, marca Perkin Elmer;
- pré coluna Varian, com fase estacionária de sílica;
- cromatógrafo líquido de alta eficiência: bomba marca Waters, modelo 510; injetor Rheodine com "loop" 20 µl ou 100µl; detector de fluorescência programável, marca HP, modelo 1046A e integrador marca HP, modelo 3393A;
- coluna de guarda Varian, com fase estacionária de Octadecilsilil;
- coluna analítica Spherisorb ODS-2, 5µm, Sigma Aldrich, 250mm X 4,6mm;
- liquidificador comum de uso doméstico, marca Arno;
- lâmpada ultravioleta de alta intensidade, modelo UVGL58, multibanda 254/366nm, marca Mineral Light;
- banho ultra-som, modelo SX-20, marca Microsonic;
- ultrapurificador de água, marca "MilliQ";
- dispositivo para filtração à vácuo para colunas de extração em fase sólida,

modelo "Visiprep DL™", marca Supelco.

### **2.3 — Preparo do padrão de ocratoxina A**

Foi preparada uma solução estoque do padrão de ocratoxina A com 100 µg/mL em benzeno. Foi verificada a pureza dessa solução em camada delgada, nas condições descritas em 2.4 e visualizando-se o padrão sob luz ultravioleta. Considerou-se a presença de uma única mancha como indicativo do padrão não estar contaminado ou decomposto. A partir da solução estoque, foi preparada uma solução intermediária de aproximadamente 20 µg/mL em ácido acético/ benzeno (1+99) e a sua concentração exata foi determinada espectrofotometricamente segundo o procedimento da AOAC (1997). A partir desta solução intermediária foi realizada uma nova diluição (1:20) em metanol / ácido acético 9% (65+35) sempre que necessário e esta solução de trabalho foi empregada para a quantificação da ocratoxina A por cromatografia líquida de alta eficiência. Antes de empregar o padrão, este foi agitado no ultra-som por 30 segundos.

### **2.4 — Cromatografia em camada delgada**

A fase estacionária utilizada foi sílica gel e a fase móvel foi tolueno/acetato de etila/ácido fórmico (5+4+1). Os extratos secos foram dissolvidos em 200µL de benzeno, agitados em ultra-som por 30' e aplicados na camada. Na mesma camada, também foram aplicados diversas quantidades do padrão de ocratoxina A. Após o desenvolvimento na fase móvel acima descrita, as placas foram visualizadas sob luz ultravioleta de comprimento de onda 366nm. A quantificação da ocratoxina A foi obtida por comparação visual da intensidade fluorescente da mancha do padrão com a intensidade fluorescente da mancha da amostra.

### **2.5 — Cromatografia líquida de alta eficiência**

As condições utilizadas no cromatógrafo líquido de alta eficiência foram as descritas por STUDER-ROHR et alii (1995). A fase móvel foi metanol/ácido acético 9% (65+35) e a vazão de 1,0 mL/min. Os comprimentos de onda utilizados foram: a) excitação = 330 nm e b) emissão = 470 nm. A quantificação da ocratoxina A foi realizada por padronização externa a partir de injeções realizadas com o

padrão. A faixa de concentração foi de 0,2 a 2,5 ng no "loop" de 100  $\mu$ L e 2 ng no "loop" de 20  $\mu$ L. Todos os extratos secos foram redissolvidos em 1 mL da fase móvel e filtrado através de filtro 0,45  $\mu$ m. Foi testada a reprodutibilidade do detector injetando-se 5 vezes o padrão de 1  $\mu$ g/mL no "loop" de 20  $\mu$ L do injetor, nas condições cromatográficas descritas acima.

## **2.6 — Testes de recuperação do padrão de ocratoxina A adicionado em colunas de extração em fase sólida**

Para avaliar a recuperação da toxina nas colunas de extração em fase sólida (sílica, octadecilsilil, cianopropil e imunoafinidade) foram testados vários procedimentos descritos na literatura para condicionamento, transferência, lavagem e eluição da toxina, utilizando-se o padrão de ocratoxina A. Foram transferidos 100ng de ocratoxina A para a coluna de extração em fase sólida com ajuda do eluente da primeira fração. Todas as frações foram recolhidas separadamente e evaporadas até a secura e redissolvidas em 200 $\mu$ L de benzeno quando utilizando cromatografia em camada delgada ou em 1 mL de MeOH/CH<sub>3</sub>COOH 9% (65+35) quando utilizando cromatografia líquida de alta eficiência. Os sistemas de solventes empregados estão descritos nas Tabelas 1 a 6.

**Tabela 1. Sistemas testados para eluição de padrão de ocratoxina A em colunas de extração em fase sólida tipo octadecilsilil utilizando-se quantificação em cromatografia de camada delgada.**

Condicionamento da coluna	(Fração 1) Transferência da Ocratoxina A	Fração 2	Fração 3	Fração 4
10 mL MeOH e 10 mL H <sub>2</sub> O	10 mL MeOH com 0,1% CH <sub>3</sub> COOH	10 mL MeOH com 0,1% CH <sub>3</sub> COOH	tolueno/acetato de etila / ácido fórmico (60+40+0,5)	
10 mL MeOH e 10 mL H <sub>2</sub> O	10 mL MeOH	10 mL MeOH	10 mL tolueno/acetato de etila / ácido fórmico (60+40+0,5)	
10 mL MeOH e 10 mL H <sub>2</sub> O	4 mL H <sub>2</sub> O	15 mL 40% acetona em H <sub>2</sub> O	5 mL H <sub>2</sub> O	15 mL 40% acetonitrila em H <sub>2</sub> O
20 mL MeOH e 20 mL H <sub>2</sub> O e 2 mL CTA 0,005M	10 mL H <sub>2</sub> O	15 mL 40% acetona em H <sub>2</sub> O	5 mL H <sub>2</sub> O	15 mL 40% acetonitrila em H <sub>2</sub> O
<b>a</b> 8,5 mL MeOH e 8,5 mL H <sub>2</sub> O e 2 mL CTA 0,005M	10 mL tampão fosfato pH=5,6 em 2,5mM CTA	15 mL 40% acetona em H <sub>2</sub> O	5 mL H <sub>2</sub> O	15 mL 40% acetonitrila em H <sub>2</sub> O

Testes realizados com padrão de ocratoxina A (100 ng). Quantificação em camada delgada, como descrito em 2.4.

<sup>a</sup> TERADA et alii(1986).

MeOH = Metanol.

CH<sub>3</sub>COOH = ácido acético.

H<sub>2</sub>O = água.

CTA=Brometo de cetiltrimetilamonia.



**Tabela 2 - Sistemas testados para eluição de padrão de ocratoxina A em colunas de extração em fase sólida tipo octadecilsilil utilizando-se quantificação em cromatografia líquida de alta eficiência.**

Condicionamento da coluna	(Fração 1) Transferência da Ocratoxina A	Fração 2	Fração 3	Fração 4
10 mL H <sub>2</sub> O	20 mL H <sub>2</sub> O	20 mL MeOH com 0,1% CH <sub>3</sub> COOH		
<sup>a</sup> 5 mL MeOH e 5 mL H <sub>2</sub> O	6 mL H <sub>2</sub> O	3 mL em gradiente 10% MeOH até 100% MeOH		3 mL acetona
5 mL hexano e 5 mL acetato etila e 5 mL MeOH	5 mL MeOH	5 mL CHCl <sub>3</sub>		

Testes realizados com padrão de ocratoxina A (100 ng). Quantificação em cromatografia líquida de alta eficiência, como descrito em 2.5.

<sup>a</sup> JW Scientific Products Catalog & Reference Guide (1992-93)

CHCl<sub>3</sub> = clorofórmio.

**Tabela 3 - Sistemas testados para eluição de padrão de ocratoxina A em colunas de extração em fase sólida tipo cianopropil utilizando-se quantificação em cromatografia líquida de alta eficiência.**

Condicionamento da coluna	(Fração 1) Transferência da Ocratoxina A	Fração 2	Fração 3
10 mL tolueno	30 mL Tolueno	20 mL tolueno / acetato de etila / ácido fórmico (5+4+1)	20 mL MeOH com 0,1% CH <sub>3</sub> COOH
CHCl <sub>3</sub>	10 mL CHCl <sub>3</sub>	10 mL MeOH / CHCl <sub>3</sub> (1+19)	20 mL tolueno/acetato de etila / ácido acético (50+49+1)

Testes realizados com padrão de ocratoxina A (100 ng). Quantificação em cromatografia líquida de alta eficiência, como descrito em 2.5.

**Tabela 4 - Sistemas testados para eluição de padrão de ocratoxina A em colunas de extração em fase sólida tipo sílica utilizando-se quantificação em cromatografia de camada delgada.**

Condicionamento da coluna	(Fração 1) Transferência da Ocratoxina A	Fração 2	Fração 3	Fração 4
<b>a</b> CHCl <sub>3</sub>	4 mL CHCl <sub>3</sub>	CHCl <sub>3</sub>	CHCl <sub>3</sub> / ácido fórmico (100+2)	
CHCl <sub>3</sub>	10 mL CHCl <sub>3</sub>	10 mL CHCl <sub>3</sub>	20 mL CHCl <sub>3</sub> / acetona (9+1)	20 mL CHCl <sub>3</sub> / ácido fórmico (100+2)
CHCl <sub>3</sub>	10 mL CHCl <sub>3</sub>	15 mL CHCl <sub>3</sub> / ácido fórmico (100+2)	10 mL CHCl <sub>3</sub> / acetona (9+1)	
<b>b</b> hexano	10 mL hexano	10 mL hexano / CHCl <sub>3</sub> (9+1)	10 mL MeOH / CHCl <sub>3</sub> (3+97)	10 mL tolueno / ácido acético (9+1)
CHCl <sub>3</sub>	10 mL CHCl <sub>3</sub>	10 mL CHCl <sub>3</sub> / acetona (9+1)	10 mL MeOH / CHCl <sub>3</sub> (3+97)	10 mL CHCl <sub>3</sub> / ácido fórmico (100+2).

Testes realizados com padrão de ocratoxina A (100 ng). Quantificação em camada delgada, como descrito em 2.4.

<sup>a</sup> VALENTA & GOLL(1996) e BREITHOLTZ et alii(1983).

<sup>b</sup> HÄGGBLÖM & GHOSH (1985).

**Tabela 5 - Sistemas testados para eluição de padrão de ocratoxina A em colunas de extração em fase sólida tipo sílica utilizando-se quantificação em cromatografia líquida de alta eficiência.**

Condicionamento da coluna	(Fração 1) Transferência da Ocratoxina A	Fração 2	Fração 3	Fração 4
10 mL tolueno / acetato de etila (6+4)	20 mL tolueno / acetato de etila (6+4)	20 mL tolueno/acetato de etila /ácido acético (50+49+1)	10 mL tolueno / acetato de etila /ácido acético (50+47+3)	
10 mL CHCl <sub>3</sub>	10 mL CHCl <sub>3</sub>	20 mL CHCl <sub>3</sub> / MeOH (19+1)	20 mL CHCl <sub>3</sub> / ácido fórmico (19+1)	20 mL MeOH com 0,1%CH <sub>3</sub> COOH
10 mL CHCl <sub>3</sub>	10 mL CHCl <sub>3</sub>	20 mL CHCl <sub>3</sub> /MeOH (19+1)	20 mL tolueno / acetato de etila / ácido fórmico (5+4+1)	
10 mL tolueno/acetato de etila (8+2)	10 mL tolueno / acetato de etila (8+2)	10 mL tolueno / acetato de etila / ácido acético (50+49+1) %	10 mL tolueno / acetato de etila / ácido acético (50+49+1)	10 mL tolueno / acetato de etila / ácido acético (50+49+1)
----	30 mL tolueno	20 mL tolueno / acetato de etila / ácido fórmico (5+4+1)		
7 mL MeOH e 7 mL CHCl <sub>3</sub>	7 mL CHCl <sub>3</sub>	5 mL MeOH		
7 mL MeOH e 7 mL CHCl <sub>3</sub>	2+5 mL CHCl <sub>3</sub>	5 mL MeOH	5 mL acetona	
<sup>a</sup> diclorometano	diclorometano	diclorometano / ácido fórmico 98+2		

Testes realizados com padrão de ocratoxina A (100 ng). Quantificação em cromatografia líquida de alta eficiência, como descrito em 2.5.

<sup>a</sup> SCOTT et alii (1995).

**Tabela 6 - Sistemas testados para eluição de padrão de ocratoxina A em colunas de extração em fase sólida tipo imunoafinidade utilizando-se quantificação em cromatografia líquida de alta eficiência.**

	Transferência da Ocratoxina A	Fração 1	Fração 2
a	10 mL NaHCO <sub>3</sub> / PBS (1+1)	20 mL H <sub>2</sub> O	1,5 mL metanol / ácido acético (98:2) e 1,5 mL H <sub>2</sub> O

Testes realizados com padrão de ocratoxina A (100 ng). Quantificação em cromatografia líquida de alta eficiência, como descrito em 2.5.

NaHCO<sub>3</sub> = Bicarbonato de sódio.

PBS = tampão fosfato, pH7,4.

<sup>a</sup> Rhône-Diagnostics Technologies LTD.

## 2.7 — Limpeza dos extratos

Três procedimentos foram testados, tanto em separado quanto combinados para o café verde e para o café torrado: clarificação, partição e extração em fase sólida com fases estacionárias diversas (de sílica, de octadecilsilil e de imunoafinidade).

### – 2.7.1 — Clarificação

Foram testados individualmente os seguintes clarificantes para amostras de café verde e torrado, todos já de uso tradicional em determinação de micotoxinas: sulfato de amônio (30%), acetato de chumbo (20%), sulfato de cobre (10%), mistura de ferrocianeto de potássio (0,25M) e acetato de zinco (1M) e mistura de acetato de chumbo (20%) e sulfato de amônio (30%). Após a clarificação procedeu-se a uma etapa de partição para clorofórmio. O procedimento está apresentado na Figura 1. Os extratos obtidos foram aplicados em cromatografia de camada delgada (café torrado) e em cromatografia líquida de alta eficiência (café verde e torrado) conforme descritos em 2.4 e 2.5 respectivamente.

Também foi testado o método descrito por SOARES & AMAYA (1985) em amostras de café verde e torrado, utilizando-se os clarificantes citados acima. O procedimento está apresentado na Figura 2. Os extratos obtidos a partir desse procedimento foram injetados em cromatógrafo líquido de alta eficiência nas condições descritas em 2.5.

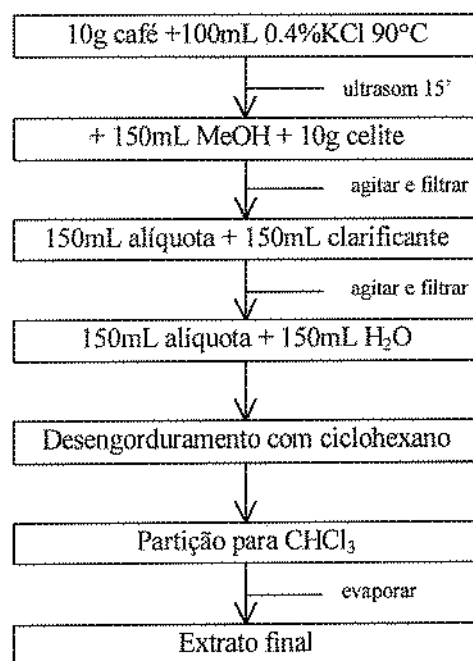


Figura 1. Procedimento empregado para verificação da eficiência da limpeza de extratos de café verde e torrado com os clarificantes: sulfato de amônio (30%), acetato de chumbo (20%), sulfato de cobre (10%), mistura de ferrocianeto de potássio (0,25M) e acetato de zinco (1M) e mistura de acetato de chumbo (20%) e sulfato de amônio (30%).

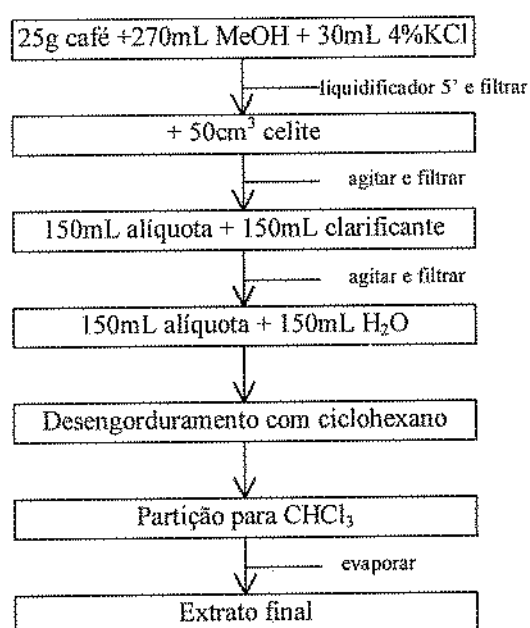


Figura 2. Procedimento empregado para verificação da eficiência da limpeza de extratos de café verde e torrado com os clarificantes: sulfato de amônio (30%) e sulfato de cobre (10%).

### – 2.7.2 — Partição

Foi testado um desengorduramento com ciclohexano antes da partição para clorofórmio.

### – 2.7.3 — Extração em fase sólida

#### **Sílica e Octadecilsilil**

Foi testada a limpeza de extratos em colunas para extração em fase sólida com fases estacionárias de sílica e de octadecilsilil. As colunas foram testadas com extratos de café verde e torrado fortificados artificialmente com ocratoxina A ao nível de 10 ng/g. (Tabelas 7 e 8). As amostras artificialmente contaminadas foram extraídas conforme o procedimento apresentado na Figura1, utilizando-se  $\text{CuSO}_4$  como clarificante.

**Tabela 7. Sistemas testados para eluição de padrão de ocratoxina A em extratos de café torrado em colunas de extração em fase sólida tipo sílica utilizando-se quantificação em cromatografia líquida de alta eficiência.**

Condicionamento da coluna	(Fração 1) Transferência da Ocratoxina A	Fração 2	Fração 3	Fração 4	Fração 5
<sup>a</sup> tolueno	tolueno	tolueno / acetona (95+5)	diétiléter / hexano (75+25)	$\text{CHCl}_3$ / MeOH (97+3)	tolueno / $\text{CH}_3\text{COOH}$ (9+1)

Testes realizados com extratos de café torrado contaminados artificialmente com padrão de ocratoxina A (10 ng/g). Quantificação em cromatografia líquida de alta eficiência, como descrito em 2.5.

<sup>a</sup> PATEL et alii(1996) e HOWELL & TAYLOR (1981).

**Tabela 8. Sistemas testados para eluição de padrão da ocratoxina A em extratos de café torrado em colunas de extração em fase sólida tipo octadecilsilil utilizando-se quantificação em cromatografia líquida de alta eficiência.**

Condicionamento da coluna	(Fração 1) Transferência da Ocratoxina A	Fração 2	Fração 3
10 mL H <sub>2</sub> O	10 mL H <sub>2</sub> O	20 mL H <sub>2</sub> O	transferir a ocratoxina A da fase aquosa para CHCl <sub>3</sub>
5 mL hexano e 5 mL acetato etila e 5 mL MeOH	7 mL MeOH	5 mL CHCl <sub>3</sub>	

Testes realizados com extratos de café torrado contaminados artificialmente com padrão de ocratoxina A (10 ng/g). Quantificação em cromatografia líquida de alta eficiência, com descrito em 2.5.

### ***Imunoafinidade***

Foram também avaliadas colunas de imunoafinidade de duas marcas comerciais. Os testes foram realizados com amostras de café verde e torrado contaminadas com padrão de ocratoxina A ao nível de 10 ng/g. A metodologia utilizada foi a recomendada pelo fabricante de uma das marcas das colunas e apresentada na Figura 3. O extrato obtido foi injetado em cromatógrafo líquido de alta eficiência, com volume de injeção de 100µL, conforme descrito em 2.5.

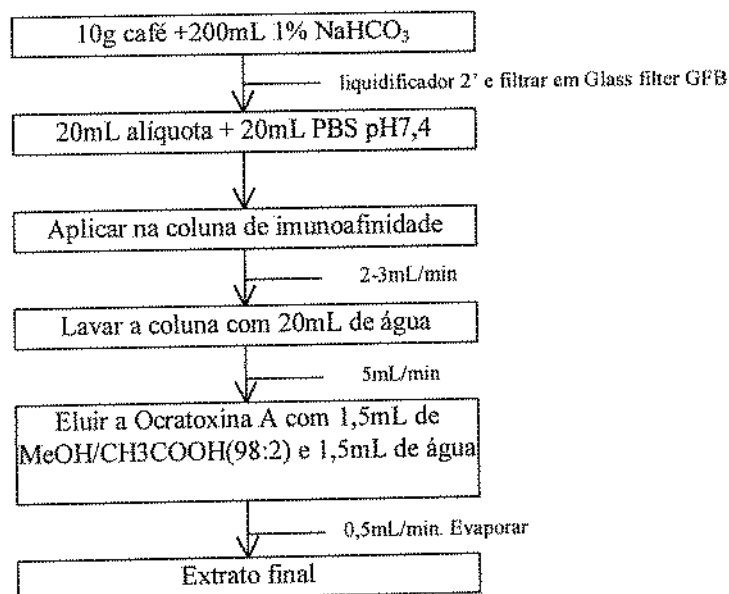


Figura 3. Procedimento empregado para a verificação da eficiência da limpeza de extratos de café verde e torrado em colunas de imunoafinidade.

### 2.8 — Testes de reutilização das colunas de imunoafinidade

A reutilização de duas marcas de colunas de imunoafinidade foi verificada. O teste foi realizado em triplicata para a marca B e quadruplicata para a marca A. A metodologia aplicada está apresentada na Figura 3. Após a eluição da ocratoxina A, a coluna foi lavada com 20 mL de tampão PBS, pH 7,4 e colocada sob refrigeração (3 - 8°C) em geladeira comum por no mínimo 48 horas (ZIMMERLI & DICK, 1996). Foi utilizada uma amostra não contaminada de café verde, a qual foi adicionado padrão de ocratoxina A dissolvido em MeOH/CH<sub>3</sub>COOH até obter 10 ng/g. Cem µL do extrato obtido foram injetados em cromatógrafo líquido de alta eficiência conforme descrito em 2.5.

## 3 — RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 — Reprodutibilidade do detector

A área média obtida de 5 injeções do padrão de ocratoxina A (1 µg/mL) foi de 214201±3794 e o coeficiente de variação de 1,8%.



### **3.2 — Recuperação do padrão de ocratoxina A adicionado em colunas de extração em fase sólida**

Para os sistemas de solventes testados em colunas de fase sólida de octadecilsilil e cromatografia em camada delgada (Tabela 1), a recuperação da ocratoxina A foi inferior a 30% e geralmente a eluição do padrão ocorreu em mais de uma fração. No sistema que utiliza água para condicionar a coluna, apresentado na Tabela 2, obtivemos uma recuperação de 95% da toxina na fração1 (água). Quando a coluna foi condicionada com hexano, acetato de etila e metanol a recuperação foi de 84% na fração1 (metanol).

Os resultados dos testes de recuperação em colunas de cianopropil com os sistemas de solventes apresentados na Tabela 3 foram ineficientes, não ocorrendo recuperação da toxina em nenhuma fração.

Os sistemas de solventes para eluição da ocratoxina A em colunas de sílica (Tabela 4) com detecção em cromatografia em camada delgada, também foram ineficientes. As recuperações obtidas ficaram entre 30 e 40% e a toxina eluiu em mais de uma fração.

A maior recuperação obtida na eluição da ocratoxina A em colunas de sílica com detecção em cromatografia líquida de alta eficiência, foi de 56% no sistema que utilizou clorofórmio para condicionar, clorofórmio e metanol para lavar e tolueno/acetato de etila/ácido fórmico (5+4+1) para eluir a toxina. O sistema que utilizou tolueno/acetato de etila (6+4) para condicionar e tolueno/acetato de etila/ácido fórmico (50+49+1) para lavar a coluna, obteve uma recuperação de 53% na fração 1. Nos demais sistemas a recuperação foi abaixo de 30% ou nenhuma.

Para colunas de imunoafinidade, o procedimento preconizado pelo fabricante das colunas A, mostrou-se adequado para a recuperação do padrão de ocratoxina A. O valor médio obtido de recuperação foi de  $87,5 \pm 14,8\%$  e o desvio relativo foi de 10%.

### **3.3 — Limpeza dos extratos de café verde e torrado**

#### **3.3.1 — Clarificação**

Os extratos de café torrado, após clarificação com as soluções descritas no item 2.7.1, apresentaram cor marrom escuro, com aspecto muito "sujo".

Após a partição para clorofórmio, uma emulsão foi formada e quebrada com banho em ultra-som e as fases clorofórmicas apresentaram-se turvas e de cor marrom. A camada delgada após revelação sob luz ultravioleta mostrou uma grande quantidade de co-extrativos sobre toda a região de desenvolvimento inclusive sobre a região da ocratoxina A. O clarificante sulfato de cobre apresentou-se ligeiramente mais eficaz que os demais, mas ainda sem propiciar uma visualização adequada. Os mesmos extratos quando injetados em cromatografia líquida de alta eficiência, apresentaram cromatogramas em que havia co-extrativos fluorescentes, o que ocasionou a elevação da linha de base até o final da escala. Quando utilizamos a mesma metodologia para café verde e submetemos os extratos em cromatografia líquida de alta eficiência, houve um grande número de interferentes com o mesmo tempo de retenção da ocratoxina A, não sendo possível quantificá-la.

### – 3.3.2 — Partição

O desengorduramento com ciclohexano, descrito em 2.7.2 antes da partição para clorofórmio, não apresentou mudanças significativas na limpeza dos extratos, tanto para café verde, quanto para café torrado.

### – 3.3.3 — Limpeza em fase sólida

Os extratos de café verde e torrado obtidos da extração descrita em 2.7.3 que foram aplicados em colunas de sílica e octadecilsilil (Tabelas 7 e 8) e submetidos a cromatografia líquida de alta eficiência apresentaram limpeza ineficiente, com muitos interferentes aparecendo no mesmo tempo de retenção da ocratoxina A.

Os extratos de café, tanto verde como o torrado, obtidos após limpeza em colunas de imunoafinidade, conforme metodologia descrita em 2.7.3, apresentaram cromatogramas limpos (Figura 4), sem interferentes no tempo de retenção da ocratoxina A, garantindo uma quantificação adequada. O valor médio de recuperação para 4 determinações de ocratoxina A em amostras de café verde artificialmente contaminados ao nível de 10 ng/g foi de  $97,3 \pm 2,5\%$  com coeficiente de variação de 2,6%.

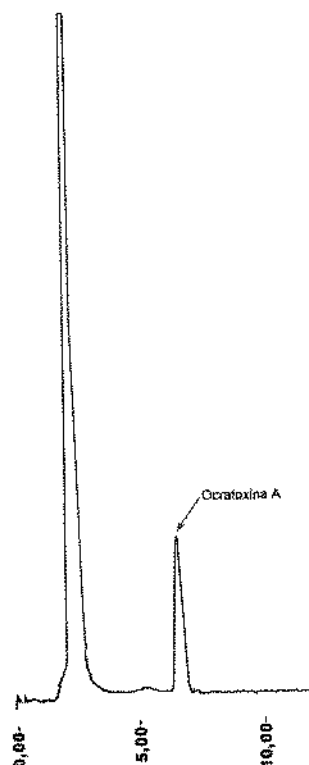


Figura 4. Perfil cromatográfico de uma amostra de café verde contaminado artificialmente com ocratoxina A nas condições descritas em 2.5.

### 3.4 — Reutilização das colunas de imunoafinidade com extratos de café verde.

A Tabela 9 mostra os resultados obtidos para a recuperação da ocratoxina A adicionada a café verde em colunas de imunoafinidade de duas marcas comerciais quando reutilizadas sucessivamente. Vemos que a marca A apresentou recuperações aceitáveis quando utilizada até por 4 vezes. A marca B apresentou recuperação mais baixa (73%) que a marca A (97%) já na primeira utilização, e recuperação muito baixa na segunda utilização, não podendo ser empregada mais de uma vez.

Embora o valor de compra das colunas de imunoafinidade seja alto, o estudo de reutilização das mesmas demonstrou que as colunas de uma das marcas testadas podem ser empregadas diversas vezes, o que reduziria o custo das análises. Uma outra vantagem, que não deve ser desprezada, está na pequena quantidade de solventes orgânicos utilizados no procedimento, não expondo assim o analista a vapores tóxicos.

**Tabela 9. Teste de reutilização de colunas de imunoafinidade específicas para ocratoxina A de marcas diferentes.**

Coluna	Recuperação (%) $\pm$ desvio padrão			
	1ª utilização	2ª utilização	3ª utilização	4ª utilização
Marca A	97,3 $\pm$ 2,5	86,3 $\pm$ 12,3	73,8 $\pm$ 19,9	74,3 $\pm$ 32,3
Marca B	73 $\pm$ 1,7	29,6 $\pm$ 4,7	—	—

Recuperação em amostras de café verde artificialmente contaminadas com ocratoxina A ao nível de 10 ng/g. Resultados indicam média e desvio padrão de 4 repetições por experimento no caso da marca A e 3 repetições por experimento no caso da marca B.

#### 4 — CONCLUSÕES

As técnicas de bancada que utilizam clarificantes e partição para a limpeza em amostras de alimentos não produziram resultados satisfatórios com relação a amostras de café verde ou torrado. Da mesma maneira, as colunas de extração em fase sólida de sílica, cianopropil e octadecilsilil não apresentaram limpeza ou recuperação adequadas para as amostras estudadas. Já as colunas de imunoafinidade mostraram-se eficientes quanto à limpeza e à recuperação, tanto quando só o padrão foi adicionado como nas amostras artificialmente contaminadas. A diferença exibida pelas colunas de marcas diferentes na recuperação da ocratoxina A (97% e 73%) já durante o primeiro uso, indicam a necessidade de testar as colunas durante sua utilização, assim como, indicam uma diferença na qualidade das diferentes marcas deste tipo de produto em relação a qual os analistas devem estar alertas.

## 5 — BIBLIOGRAFIA

- AOAC INTERNATIONAL. **Official Methods of Analysis**, 16<sup>a</sup> ed., 3<sup>a</sup> rev., Gaithersburg, MD, Method 975.38, 1997.
- BREITHOLTZ-EMANUELSSON, A.; OLSEN, M.; OSKARSSON, A.; PALMINGER, I. and HULT, K. Ochratoxin a in cow's milk and in human milk with corresponding human blood samples, **Journal of Association Official of Analytical Chemistry International**, v.76, n.4, p.842-846, 1993.
- BUSBY JR., W.F.; WOGAN, G.N. Ochratoxins. In: SHANK, R.C. **Mycotoxins and N-nitroso compounds: environmental risks**: Boca Raton: CRC Press., vol.II, chap.9: p.129-136, 1981
- CANTÀFORA, A.; GROSSI, M.; MIRAGLIA, M. and BENELLI, L., Determination of ochratoxin A in coffee beans using reversed-phase high performance liquid chromatography, **Riv. Soc. Ital. Alimen.**, 12, 103 - 108. 1983
- DIPARTIMENTO DOGANE - Circolare n.76 - **Ministerio delle Finanze** - 21/03/1996  
- Roma, Itália
- DIRHEIMER, G. Mechanistic approaches to ochratoxin toxicity. **Food Additives and Contaminants**, v.13, Supplement, p. 45-48, 1996.
- HÄGGBLUM, P.E. and GHOSH, J. Postharvest production of ochratoxin a by *aspergillus ochraceus* and *penicillium viridicatum* in barley with different protein levels, **Applied and Environmental Microbiology**, v.49, n.4, p.787-790, 1985.
- HOWELL, M.V. and TAYLOR, P.W. Determination of aflatoxins, ochratoxin a, and zearalenone in mixed feeds, with detection by thin layer chromatography or high performance liquid chromatography, **Journal of Association Official of Analytical Chemistry**, v.64, n.6, p. 1356-1363, 1981.
- JW Scientific Products Catalog & Reference Guide, 1992-93
- MICCO, C.; GROSSI, M.; MIRAGLIA, M.; Brera, C. A study of the contamination by

- ochratoxin A of green and roasted coffee beans. **Food Additives and Contaminants**, v.6, p.333-339, 1989.
- MOSS, M. O. Mode of formation of ochratoxin A. **Food Additives and Contaminants**, v.13, Supplement, p. 5-9, 1996.
- NAKAJIMA, M.; TERADA, H.; HISADA, K.; TSUBOUCHI, H.; YAMAMOTO, K.; UDA, T.; ITOH, Y.; UENO, Y. Determination of Ochratoxin A in Coffee Beans and Coffee Products by Monoclonal Antibody Affinity Chromatography. **Food and Agricultural Immunology**, v.2, p.189-195, 1990.
- PATEL, S.; HAZEL, C. M.; WINTERTON, A. G. M. and MORTBY, E., Survey of ethnic foods for mycotoxins. **Food Additives and Contaminants**, v.13, n.7, p.833-841, 1996
- PATEL, S.; HAZEL, C. M.; WINTERTON, A. G. M.; GLEADLE, A. E. Survey of ochratoxin A in UK retail coffees. **Food Additives and Contaminants**, v.14, p.217-222, 1997.
- PITET, A.; TORNARE, D.; HUGGET, A.; VIANI, R. Liquid chromatographic determination of ochratoxin A in pure and adulterated soluble coffee using analyze immunoaffinity column cleanup procedure. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.44, p.3564-3569, 1996.
- PLESTINA, R. Nephrotoxicity of ochratoxin A. **Food Additives and Contaminants**, v.13, Supplement, p. 49-50, 1996.
- RHÔNE-DIAGNOSTICS TECHNOLOGIES LTD. Ochaprep® quantitative detection of ochratoxin a. **Instruction for use**, Products codes: P14, P14B, Version P14/V2/ 11.08.97.
- SCOTT, P. M.; KANHERE, S. R. Determination of ochratoxin A in beer. **Food Additives and Contaminants**, v.12, n.4, p.591-598, 1995.
- SHARMA, R.P.; SALUNKHE, D.K. Occurrence of mycotoxins in foods and feeds. In: SHARMA, R.P.; SALUNKHE, D.K. **Mycotoxins and Phytoalexins**. Ed. CRC Press, Inc. 1991. Cap.2, p.13-31.

- SOARES, L.M.V. and RODRIGUES-AMAYA, D.B., Screening and quantitation of ochratoxin a in corn, peanuts, beans, rice, and cassava, **Journal of Association Official of Analytical Chemistry**, v.68,n.6, p.1128-1130, 1985.
- STEGEN, G. V. D.; JÖRRISSEN, U.; PITTET, A.; SACCON, M.; STEINER, W.; VICENZI, M.; WINKLER, M.; ZAPP, J.; SCHLATTER, Chr. Screening of European coffee final products for occurrence of ochratoxin A (OTA). **Food Additives and Contaminants** , v.14, p.211-216, 1997.
- STUDER-ROHR, I., DIETRICH, D. R., SCHLATTER,J. and SCHLATTER, C. The occurrence of ochratoxin A in coffee, **Food Chemistry Toxicology**, v.33, p.341-355, 1995.
- TERADA, H.; TSOUBUCHI, H.; YAMAMOTO, K. ;HISADA, K.; SAKABE, Y. Liquid chromatographic determination of ochratoxin a in coffee beans and coffee products. **Journal of Association Official of Analytical Chemistry**, v.69, n 6, p.960-964, 1986.
- TRUCKSESS, M. W.; CHOU, J.P.; YOUNG,K.; PAGE,S.W. Determination and survey of ochratoxin a in barley, green coffee and roasted coffee. **FDA Science Forum Poster Abstract**, <http://vm.cfsan.fda.gov/~frf/forum97/97A30.htm> 1997.
- TSUBOUCHI, H.; TERADA, H.; YAMAMOTO, K.; HISADA, K.; SAKABE, Y. Ochratoxin A found in commercial roast coffee. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.36, p.540-542, 1988.
- VALENTA, H. and GOLL, M., Determination of ocratoxin A in regional samples of cow's milk from Germany. **Food Additives and Contaminants**, v.13, n.6, p.669-676, 1996.
- VAN EGMOND, H. P. Analytical methodology and regulations for ochratoxin A. **Food Additives and Contaminants** , v.13, Supplement, p. 11-13, 1996.
- VERARDI, G.; ROSNER, H. Some reflections on establishing a community legislation on mycotoxins. **Natural Toxins**, v.3, p. 337-340, 1995.
- ZIMMERLI, B.; DICK, R. Study to repeated use of commercial immunoaffinity columns. **Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.**, v.87, p.732-742, 1996.

## **CAPÍTULO 3**

# **INCIDÊNCIA DE OCRATOXINA A EM CAFÉ VERDE PROVENIENTE DE VÁRIAS REGIÕES PRODUTORAS BRASILEIRAS**



## RESUMO

A ocratoxina A é um metabólito tóxico produzido por cepas de *Penicillium* e *Aspergillus*. Contaminação por essa toxina tem sido relatada em um grande número de produtos alimentícios, incluindo grãos de café verde. O presente trabalho relata a análise de 84 amostras de café verde proveniente de regiões produtoras em 6 estados (Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Espírito Santo, Roraima e Bahia). A Ocratoxina A foi isolada com colunas de imunoafinidade e quantificada por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência. O limite de detecção do método foi de 0,7 ng/g. Dezoito amostras continham ocratoxina A em níveis que variaram de 1,7 a 147,5 ng/g.

Palavras-chave: café brasileiro, ocratoxina A, micotoxinas

## ABSTRACT

Ochratoxin A is a toxic metabolite produced by *Penicillium* and *Aspergillus* ssp. A wide variety of foods, coffee among them, have been reported contaminated by the toxin. The present work reports the ochratoxin A levels in 84 samples of Brazilian coffee from 6 coffee producing states (Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Espírito Santo, Roraima and Bahia). Ochratoxin A was determined by separation on immunoaffinity columns followed by quantification by HPLC with fluorescence detection. The detection limit of the method was 0.7 ng/g. Eighteen samples contained ochratoxin A at levels ranging from 1.7 to 147.5 ng/g.

Keywords: Brazilian coffee, ochratoxin A, mycotoxins

## 1 — INTRODUÇÃO

As ocratoxinas são metabólitos tóxicos produzidos por espécies de *Penicillium* e *Aspergillus*. Dentre as sete isocumarinas que pertencem a esta família, a ocratoxina A é a que aparece com maior frequência e a mais tóxica (BUSBY & WOGAN, 1981). Essa toxina é nefrotóxica, com atividade comprovada em suínos. Em humanos está associada com a Nefropatia Endêmica dos Balcãs, uma doença que atinge os rins, degenerando-os e muitas vezes levando à morte. A presença de ocratoxina A no sangue e na alimentação dos moradores daquela região tem sido relatada (PLESTINA, 1996).

A ocorrência de ocratoxina A em café verde foi relatada pela primeira vez por LEVI et alii em 1974. Também concluíram que o café não era um bom substrato para o desenvolvimento da toxina e que esta poderia ser facilmente destruída pela torrefação. Esse assunto foi considerado, na época, sem importância para a saúde pública (LEVI, 1980).

CANTÀFORA et alii (1983) trouxeram de volta o problema e após analisarem 40 amostras de café verde constataram que 22,5% dessas amostras estavam contaminadas, em níveis que variaram de 0,5 a 23 ng/g. MICCO et alii (1989) encontraram 16 dentre 29 amostras de café verde contaminadas com a ocratoxina A, em níveis que variaram de 0,2 a 15 ng/g. STUDER-ROHR et alii (1995) analisaram 25 amostras de café verde, das quais, 13 estavam contaminadas com ocratoxina A (0,9 - 50 ng/g). O Ministério da Agricultura do Reino Unido<sup>6</sup> (MAFF UK), em 1996, analisou 291 amostras de café verde das variedades arábica e robusta provenientes de 27 países diferentes. Das amostras, 38% estavam contaminadas e o nível máximo de ocratoxina A encontrado foi de 27,3 ng/g em uma amostra de café robusta. Contaminação por ocratoxina A em café torrado e moído, em café solúvel e produtos de café tem sido relatada (PITTET et alii, 1996, PATEL et alii, 1997, TSUBOUCHI et alii, 1988 e STEGEN et alii, 1997).

<sup>6</sup> Surveillance of Ochratoxin A in Green (unroasted) coffee MAAF UK Food Surveillance Information Sheet n° 80, March 1996. <http://www.maff.gov.uk/food/infsheet/1996/no80/80oacoff.htm>

Os níveis máximos de ocratoxina A existentes ou em fase de proposta em diversos países variam de 1 a 5 ng/g para alimentos infantis, 2 a 50 ng/g para cereais e 5 a 300 ng/g para rações. (VAN EGMOND, 1996). Na comunidade Européia estão sendo sugeridos valores de 5 ng/g para cereais e 1 ng/g para alimentos infantis (VERARDI E ROSNER, 1995). A regulamentação para café foi sugerida pela Itália em 1996 em um limite de 4 ng/g<sup>7</sup>.

O Brasil é um grande exportador de café verde, além de a bebida preparada com o café torrado ser largamente consumida no país. No Brasil não existe regulamentação para o limite de ocratoxina A em alimentos e ainda se desconhece a situação do café aqui produzido em relação a essa micotoxina.

## 2 — MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 — Amostras

Oitenta e quatro amostras de café verde foram analisadas para ocratoxina A. Dentre as amostras, 70 foram da espécie *Coffea arabica* e 14 da espécie *Coffea canephora* cultivar Conilon. As amostras foram recebidas de 3 modos diferentes: a) latas de 300 g de café verde em grãos, ofertadas no comércio por corretores de café nas cidades de Londrina e Santos, b) latas de 300 g de café verde em grãos recebidas diretamente de cooperativas de café, c) lotes comerciais que foram amostrados durante o recebimento na unidade industrial da Cia Cacique de café Solúvel, em Londrina, para a produção de café solúvel. As amostras de café verde provenientes de lotes comerciais, foram obtidas da furação "saca a saca" durante o recebimento na unidade industrial. Com o intuito de facilitar a moagem, as amostras foram secas em estufa por 16 horas a 50°C e moídas em moinho de facas até granulometria entre 20 e 40 mesh e acondicionadas em frascos de polipropileno até o momento da análise.

<sup>7</sup> Dipartimento Dogane - Circolare n.76 - Ministero delle Finanze - 21/03/1996 - Roma, Itália

## 2.2 — Reagentes

Soluções padrão de ocratoxina A, (Sigma®) quantificadas espectrofotometricamente segundo a AOAC (1997). Colunas de extração em fase sólida de imunoafinidade específicas para ocratoxina A (Ochraprep®) adquiridas de Rhône- Diagnostics Technologies LTD (Glasgow, Reino Unido). A água utilizada em todas as etapas da metodologia foi purificada em sistema Milli-Q Plus. Filtros para amostra, marca Millipore®, poros de 0,45µm. Filtro de microfibras de vidro GF/B, marca Whatman®. Tampão fosfato (PBS), marca Sigma®. Reagentes de uso comum em laboratório, grau analítico. Solventes para cromatografia, grau cromatográfico.

## 2.3 — Equipamentos

Espectrofotômetro ultravioleta / visível, modelo Lambda 6, marca Perkin Elmer, cromatógrafo líquido de alta eficiência: bomba Waters, modelo 510; injetor Rheodine com "loop" de 100µl; detector de fluorescência programável HP modelo 1046A; integrador Waters 740, pré coluna Varian, com fase estacionária de sílica, coluna de guarda Varian, com fase estacionária de Octadecilsilil, coluna analítica Spherisorb ODS-2, 5µm, Sigma Aldrich, 250mm X 4,6mm. Dispositivo para filtração à vácuo para colunas de extração em fase sólida, modelo "Visiprep DL™", Supelco. Liquidificador para uso doméstico, marca Arno. Banho ultra-som, modelo SX-20, marca Microsonic. Ultrapurificador de água, Milli-Q.

## 2.4 — Preparo da curva padrão de ocratoxina A

Foi preparada uma solução estoque do padrão de ocratoxina A com 100 µg/mL em benzeno. A partir da solução estoque, foi preparada uma solução intermediária de aproximadamente 20 µg/mL em ácido acético/ benzeno (1+99) e a sua concentração exata foi determinada espectrofotometricamente segundo o procedimento da AOAC (1997). A partir desta solução intermediária foram feitas soluções de trabalho, diluídas em metanol/ácido acético 9% (65+35), nas seguintes concentrações: 2, 3, 5, 7, 10, 15, 20 ng/mL. Antes de empregar o padrão, este foi agitado no ultra-som por 30 segundos. A curva de calibração para a quantificação da ocratoxina A por cromatografia líquida de alta eficiência foi construída utilizando-se estas soluções trabalho. Foram realizadas três injeções em cada concentração e

calculados os coeficientes de variação das áreas obtidas. A partir destes resultados foi obtida a curva padrão por regressão linear.

## **2.5 — Extração e limpeza das amostras**

A metodologia utilizada para extração e limpeza das amostras foi a recomendada pelo fabricante das colunas de imunoafinidade e está descrita a seguir:

### ***Extração:***

Dez gramas da amostra foram extraídos com 200mL de 1% NaHCO<sub>3</sub> em liquidificador por 2 minutos. O extrato foi filtrado sob pressão reduzida de uma trompa de água e através de filtro Whatman GFB glass filter. Foi tomada uma alíquota de 20 mL do filtrado e a ela adicionados 20 mL de PBS.

### ***Limpeza com coluna de imunoafinidade:***

O extrato diluído foi aplicado em uma coluna de imunoafinidade sob pressão atmosférica ou a um fluxo de 2-3 mL/min. A coluna foi então lavada com 20 mL de água a um fluxo de aproximadamente 5 mL/min. Após a lavagem, a coluna foi seca por passagem de ar. A ocratoxina A foi eluída com 1,5 mL de uma mistura de metanol/ácido acético (98:2) e em seguida 1,5 mL de água (0,5 mL/min). Os extratos combinados foram evaporados até secura e redissolvidos em 1mL de metanol / ácido acético 9% (65+35). O extrato foi filtrado através de filtro com poros de 0,45 µm de diâmetro.

## **2.6 — Determinação da Ocratoxina A por CLAE**

A etapa de determinação da ocratoxina A foi realizada no cromatógrafo a líquido descrito no item 2.3 e as condições utilizadas foram isocráticas, descritas por STUDER-ROHR et alii (1995): fase móvel metanol / ácido acético 9% (65+35) e vazão de 1,0 mL/min. O comprimento de onda de excitação foi 330 nm e o de emissão 470 nm.

A quantificação foi realizada por padronização externa a partir de

injeções realizadas com o padrão nas condições cromatográficas acima descritas. A faixa de concentração foi de 0,2 a 2,0 ng no "loop" de 100 $\mu$ L.

## 2.7 — Controle de qualidade analítico

As amostras foram analisadas em séries de 10 e cada série incluiu um teste de recuperação onde uma amostra de referência não contaminada foi fortificada ao nível de 10 ng/g. Os teores de ocratoxina A encontrados nas amostras analisadas foram corrigidos de acordo com a recuperação encontrada na amostra de referência artificialmente contaminada pertencente a mesma série. As duplicatas de cada amostra contaminada foram analisadas em séries diferentes. Após a correção para recuperação o coeficiente de variação dos resultados que variassem em mais de 30% foram eliminados e as análises repetidas.

A repetibilidade do método foi fornecida pelas amostras artificialmente contaminadas ao nível de 10 ng/g que foram utilizadas para o controle de qualidade analítico.

O limite de detecção da ocratoxina A foi determinado como preconizado pela "AMERICAN CHEMICAL SOCIETY" (ACS, 1980) que recomenda tomar 3 vezes o desvio padrão da linha de base. A sensibilidade do detector foi calculada segundo a "INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY" (IUPAC, 1993).

## 3 — RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 — Curva Padrão

Os valores de área obtidos são resultados médios de três injeções. O coeficiente de variação médio das injeções foi de 4,1%. Com os dados das áreas, foi calculada a regressão linear e determinou-se que  $y = 222756x$  e  $r^2 = 0,9958$ . A curva padrão construída como descrita no item 2.3 está apresentada na Figura 1.

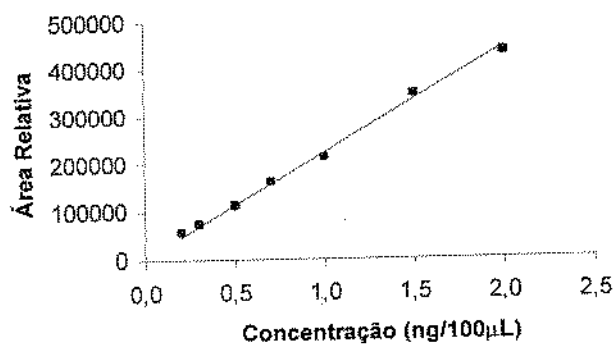


Figura 1. Curva padrão da ocratoxina A . CV médio = 4,1% (0,3 - 9,0) e  $y = 222756x$ ,  $r^2 = 0,9958$

### 3.2 — Controle de qualidade analítico

A recuperação média das amostras artificialmente contaminadas com 10 ng/g foi de 85,6% e com desvio padrão relativo de 12,6%. Esses dados mostram que a repetibilidade do método é adequada.

Nas condições de trabalho descritas, o limite de detecção foi de 0,7 ng/g. A sensibilidade do detector, calculada segundo IUPAC (1993) foi de  $24869 \times 10^7 \text{ mV} \cdot \text{cm}^3 \cdot \text{mg}^{-1}$ .

### 3.3 — Ocorrência de ocratoxina A nas amostras analisadas

As amostras foram analisadas e quantificadas por padronização externa utilizando-se a curva padrão apresentada no item 3.1 e os resultados estão apresentados na Tabela 1. Na Figura 2 está apresentado o cromatograma de uma amostra de café verde contaminada naturalmente e o cromatograma de uma amostra não contaminada.



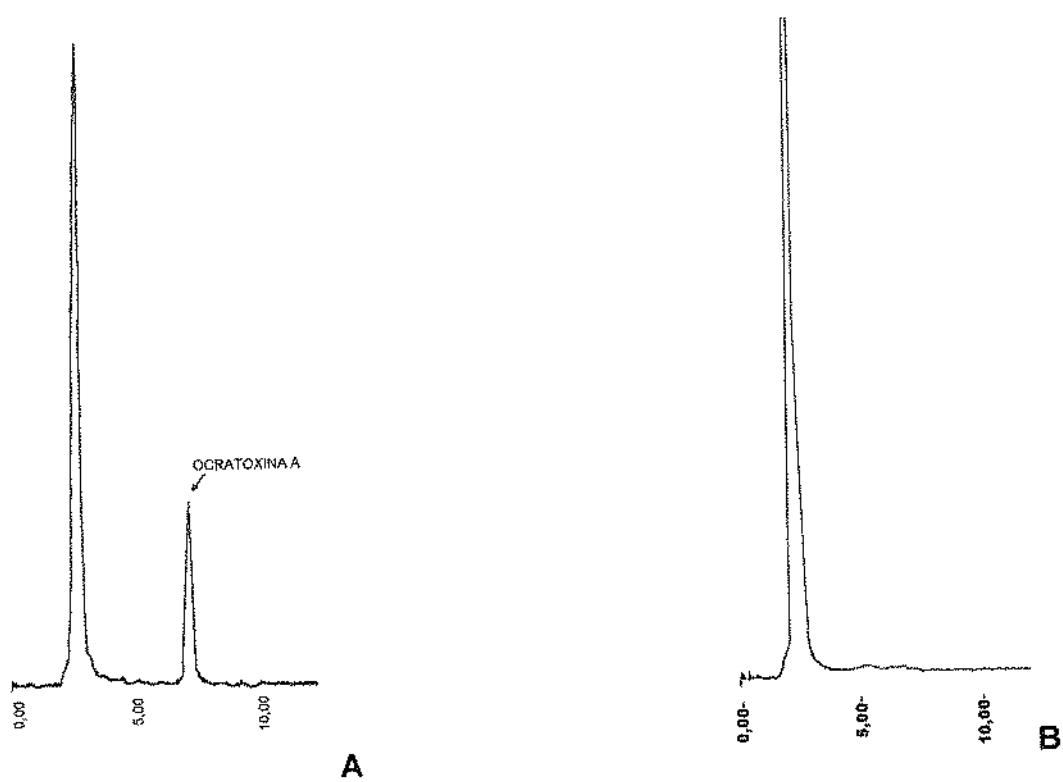


Figura 2. Perfil cromatográfico de uma amostra de café verde contaminada naturalmente (A) e uma amostra não contaminada (B).

Tabela 1. Níveis de contaminação por ocratoxina A em café verde proveniente de várias regiões brasileiras

ORIGEM DA AMOSTRA	NÚMERO DE AMOSTRAS	AMOSTRAS CONTAMINADAS <sup>a</sup>		
		Número de amostras	Nível (ng/g)	CV%
Paraná	38 <sup>b</sup>	8	5,7±0,6	11
			8,80±0,14	1,6
			2,7±0	0
			4,9±0,1	2,3
			3,6±0,3	7,8
			10,4±1,4	13,6
			4,15±0,07	1,7
			7,3±1,7	23
São Paulo	7 <sup>b</sup>	nd	—	—
Bahia	1 <sup>b</sup>	nd	—	—
Minas Gerais	24 <sup>b</sup>	3	6,3±1,7	27
			12,7±0,4	3,3
			1,7±0,3	20
Espírito Santo	9 <sup>c</sup>	5	147,5±17	11,2
			7,65±0,64	8,3
			4,3±0,1	3,3
			6,0±0	0
			4,0±0,2	7
Roraima	5 <sup>c</sup>	2	114,2±3,5	3,0
			5,5±1,3	23
TOTAL	84	18		

nd: não detectado

<sup>a</sup> - média de duplicatas

<sup>b</sup> - *C. arabica*

<sup>c</sup> - *C. conephora* cultivar Conilon

Os resultados apontaram 21,4% de amostras de café verde contaminadas. Esta incidência no entanto é bem menor ( $\cong$  21%) que a encontrada pelos países importadores (58%, MICCO et alii, 1989, 52%, STUDER-ROHR et alii, 1995, 38%, MAFF-UK<sup>8</sup>, 1996 e 50%, TRUCKSSES, 1997). Quando analisamos as variedades em separado, apenas 15,7% das amostras de *C. arabica* estavam contaminadas em níveis que variaram de 1,7 a 12,7 ng/g e 50% das amostras de *C. conephora* cultivar Conilon estavam contaminadas com ocratoxina A nos níveis de 4,0 a 147,5 ng/g.

Podemos notar que os estados do Espírito Santo e Roraima apresentaram a maior porcentagem de amostras contaminadas (50% e 40%) e níveis de contaminação também maiores dentre os vários estados onde as amostras foram coletadas. As amostras obtidas destes estados são da espécie *C. conephora* cultivar Conilon. O café desta última espécie alcança preços menores no mercado e coincidentemente recebe trato também bastante inferior ao *C. arabica* tanto no campo como durante a colheita.

O presente estudo é o primeiro que os autores têm notícia a ser realizado no país e apesar da amostragem limitada com relação ao volume da produção nacional aponta a necessidade de um estudo mais amplo.

#### 4 —CONCLUSÕES

O levantamento realizado mostrou que a incidência de ocratoxina A no café produzido no Brasil está abaixo do encontrado por pesquisadores de países importadores de café. Aproximadamente 18% do total das amostras apresentaram contaminação acima de 4 ng/g. Se essas amostras tivessem sido exportadas, provavelmente teriam sido barradas no país comprador. Cabe ressaltar que os lotes de café de onde as amostras foram coletadas foram consumidas no mercado interno e por isso os resultados recomendam um amplo exame da produção brasileira de

<sup>8</sup> Surveillance of Ochratoxin A in Green (unroasted) coffee MAFF UK Food Surveillance Information Sheet n° 80, March 1996. <http://www.maff.gov.uk/food/infsheet/1996/no80/80oacoff.htm>

café.

A espécie *C. conephora* cultivar Conilon, proveniente dos estados do Espírito Santo e Roraima, apresentou maiores teores de ocratoxina A. Foi também estes estados que apresentaram uma maior porcentagem de contaminação, mas como o presente levantamento concentrou-se em poucas amostras por estado, não podemos tirar maiores conclusões deste dado.

## 5 —BIBLIOGRAFIA

- AOAC INTERNATIONAL. **Official Methods of Analysis**, 16<sup>a</sup> ed., 3<sup>a</sup> rev., Gaithersburg, MD, Method 975.38, 1997.
- ACS COMMITTEE ON ENVIRONMENTAL IMPROVEMENT. Guidelines for data acquisition and data quality evaluation in environmental chemistry. **Analytical Chemistry**, v.52, n.4, p.2242-2249, 1980.
- BUSBY JR., W.F.; WOGAN, G.N. Ochratoxins. In: SHANK, R.C. **Mycotoxins and N-nitroso compounds: environmental risks**: Boca Raton: CRC Press, vol.II, chap.9: p.129-136 1981
- CANTÀFORA, A., GROSSI, M., MIRAGLIA, M. and BENELLI, L. Determination of ochratoxin A in coffee beans using reversed-phase high performance liquid chromatography. **La rivista della Società Italiana di Scienza dell'Alimentazione**, anno 12, n 2, 1983.
- INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY. Nomenclature for chromatography (IUPAC Recommendations 1993) **Pure & Applied Chemistry**, v.65, n.4, p.819-872, 1993
- LEVI, C. Mycotoxins in coffee, **Journal of Association Official of Analytical Chemistry**, v.63, p.1282-1285, 1980.
- LEVI, C. P., TRENK, H. L. and MOHR, H. K. Study of the occurrence of ochratoxin A in green coffee beans, **Journal of Association Official of Analytical Chemistry**, v.57, p.866-870, 1974.
- MICCO, C., GROSSI, M., MIRAGLIA, M. and Brera, C. A study of the contamination by ochratoxin A of green and roasted coffee beans, **Food Additives and Contaminants**, v.6, p.333-339, 1989.

- PATEL, S., HAZEL, C. M., WINTERTON, A. G. M. and GLEADLE, A. E. Survey of ochratoxin A in UK retail coffees, **Food Additives and Contaminants**, v.14, p.217-222, 1997.
- PITET, A., TORNARE, D., HUGGET, A. and VIANI, R. Liquid chromatographic determination of ochratoxin A in pure and adulterated soluble coffee using analyze immunoaffinity column cleanup procedure, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.44, p.3564-3569, 1996.
- PLESTINA, R. Nephrotoxicity of ochratoxin A, **Food Additives and Contaminants**, v.13, Supplement, p. 49-50, 1996.
- STEGEN, G. v. d., JÖRRISSEN, U., PITTET, A., SACCON, M., STEINER, W., VICENZI, M., WINKLER, M., ZAPP, J. and SCHLATTER, Chr. Screening of European coffee final products for occurrence of ochratoxin A (OTA), **Food Additives and Contaminants**, v.14, p.211-216, 1997.
- STUDER-ROHR, I., DIETRICH, D. R., SCHLATTER, J. and SCHLATTER, C. The occurrence of ochratoxin A in coffee, **Food Chemistry Toxicology**, v.33, p.341-355, 1995.
- TRUCKSESS, M. W.; CHOU, J.P.; YOUNG, K.; PAGE, S.W. Determination and Survey of Ochratoxin A in Barley, Green Coffee and Roasted Coffee. **FDA Science Forum Poster Abstract**, <http://vm.cfsan.fda.gov/~frf/forum97/97A30.htm> 1997.
- TSUBOUCHI, H., TERADA, H., YAMAMOTO, K., HISADA, K. and SAKABE, Y. Ochratoxin A found in commercial roast coffee, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.36, p.540-542, 1988.
- VAN EGMOND, H. P. Analytical methodology and regulations for ochratoxin A, **Food Additives and Contaminants**, v.13, Supplement, p. 11-13, 1996.

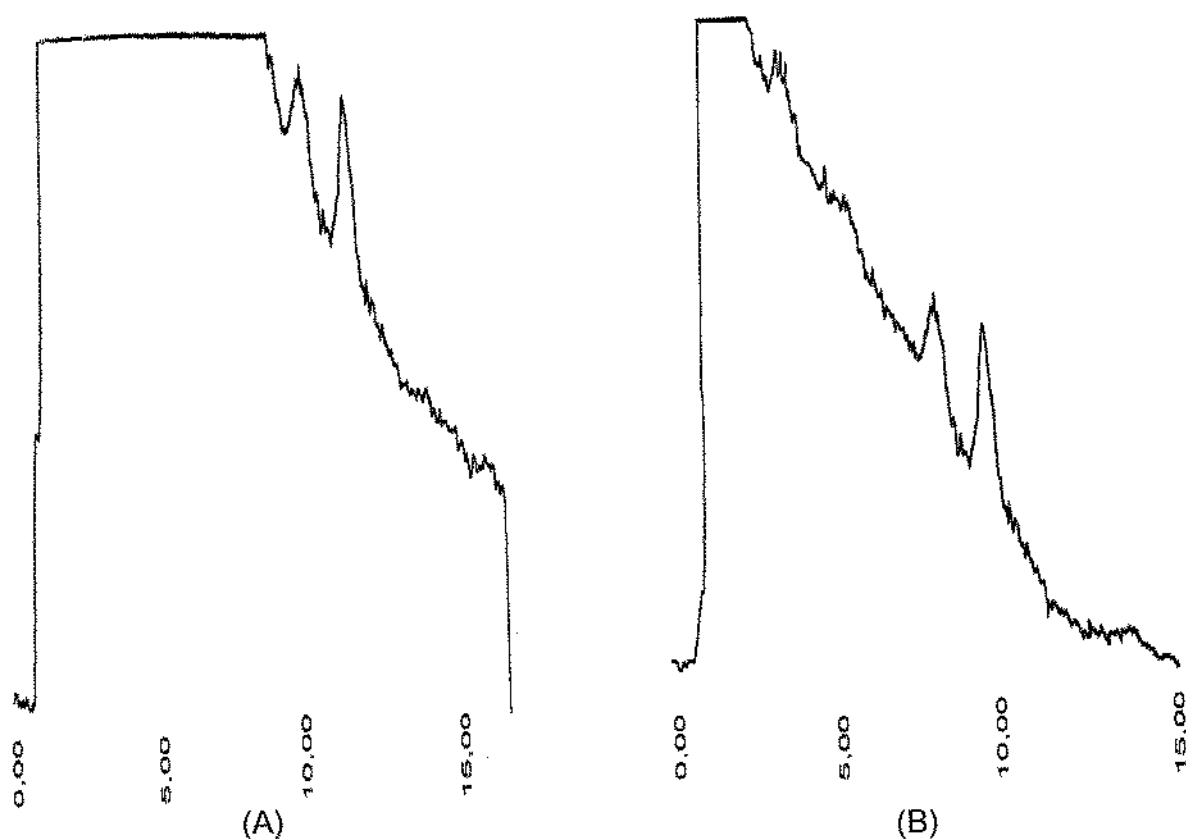
VERARDI, G. and ROSNER, H. **Natural Toxins**, v.3, p. 337-340, 1995.

## CONCLUSÕES FINAIS

1. As técnicas de limpeza que foram testadas para extratos de café verde e torrado e que incluíram clarificação e partição não produziram resultados satisfatórios. As colunas de extração em fase sólida de sílica, cianopropil e octadecilsilil que foram testadas para limpeza dos extratos de café verde e torrado, também não apresentaram limpeza ou recuperação adequadas para as amostras estudadas.
2. As colunas de extração em fase sólida, de imunoafinidade, mostraram-se eficientes quanto à limpeza e à recuperação, tanto quando só o padrão foi adicionado como para amostras artificialmente contaminadas. A técnica mostrou-se simples e rápida e também não expõe o analista a vapores tóxicos.
3. As diferenças na recuperação do padrão de ocratoxina A adicionada à colunas de imunoafinidade de marcas diferentes (97% e 73%) durante o primeiro uso, indicam a necessidade de testar as colunas durante sua utilização. Também indicam uma diferença na qualidade das marcas testadas em relação a qual os analistas devem estar alertas.
4. O levantamento realizado para determinar a incidência de ocratoxina A em 84 amostras de café verde, produzido no Brasil, demonstrou que 21% estavam contaminadas. Aproximadamente 18% do total das amostras apresentaram contaminação acima de 4 ng/g, níveis estes acima do sugerido pelas autoridades italianas e em vias de aprovação pela União Européia
5. A espécie *C. conephora* cultivar Conilon, proveniente dos estados do Espírito Santo e Roraima, apresentou maiores teores de ocratoxina A. Foram também estes estados que apresentaram uma maior porcentagem de contaminação. Porém como o presente levantamento concentrou-se em relativamente poucas amostras por estado, não há como tirar maiores conclusões deste dado. Os resultados, no entanto, recomendam uma ampla análise da produção brasileira em relação a essa toxina.



## ANEXOS



Perfil cromatográfico de uma amostra de café torrado (A) e uma amostra de café verde (B) contaminadas artificialmente com ocratoxina A (10ng/g). Extração com 0,4% KCL 90°C e posterior adição de MeOH. Clarificação com 10% CuSO<sub>4</sub> e limpeza com coluna de fase estacionária de sílica.

Condições cromatográficas:

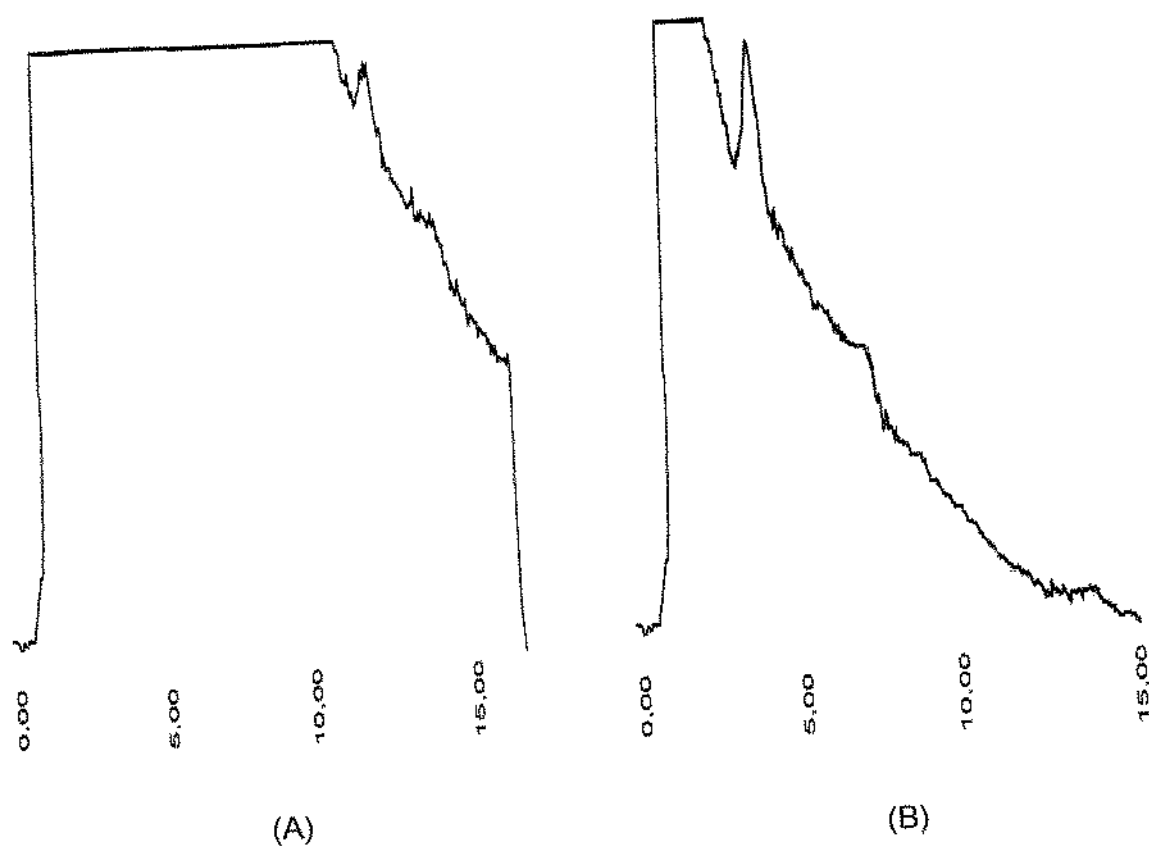
Coluna analítica Spherisorb ODS-2, 5 $\mu$ m, 250mm X 4,6mm

Detector de fluorescência -  $\lambda$  excitação = 330 nm

$\lambda$  emissão = 470 nm

Fase móvel: metanol/ácido acético 9% (65+35)

Vazão: 1,0 mL/min



Perfil cromatográfico de uma amostra de café torrado (A) e uma amostra de café verde (B) contaminadas artificialmente com ocratoxina A (10ng/g). Extração com 0,4% KCL 90°C e posterior adição de MeOH. Clarificação com 10% CuSO<sub>4</sub> e limpeza com coluna de fase estacionária de octadecilsilil.

Condições cromatográficas:

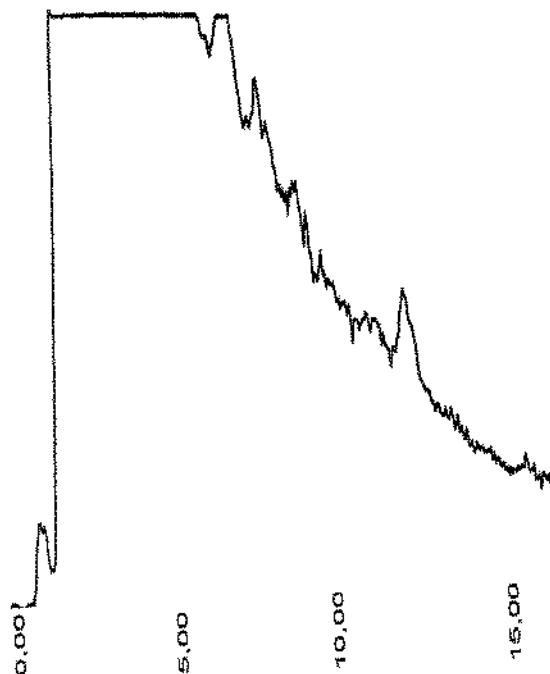
Coluna analítica Spherisorb ODS-2, 5 $\mu$ m, 250mm X 4,6mm

Detector de fluorescência -  $\lambda$  excitação = 330 nm

$\lambda$  emissão = 470 nm

Fase móvel: metanol/ácido acético 9% (65+35)

Vazão: 1,0 mL/min



Perfil cromatográfico de uma amostra de café verde contaminada artificialmente com ocratoxina A (10ng/g).. Extração com MeOH + 4% KCL (9+1) e clarificação com 10% CuSO<sub>4</sub> conforme descrito por SOARES & AMAYA (1985).

Condições cromatográficas:

Coluna analítica Spherisorb ODS-2, 5 $\mu$ m, 250mm X 4,6mm

Detector de fluorescência -  $\lambda$  excitação = 330 nm

$\lambda$  emissão = 470 nm

Fase móvel: metanol/ácido acético 9% (65+35)

Vazão: 1,0 mL/min