
Avaliação da eficiência de colunas de imunoafinidade para determinação de Ocratoxina A em amostras de café solúvel

**Luzia SHUNDO, Janete ALABURDA, Leda Conceição
Antonia LAMARDO, Sandra Aparecida NAVAS,
Valter RUVIERI, Myrna SABINO**

*Núcleo de Contaminantes Orgânicos, Centro de Contaminantes,
Instituto Adolfo Lutz*

A Ocratoxina A (OTA) é uma micotoxina nefrotóxica, possivelmente, carcinogênica encontrada em vários tipos de alimentos, incluindo o café¹. A União Europeia estabeleceu limite máximo de OTA em 5 µg/kg para o café torrado e 10 µg/kg para o café solúvel². No Brasil, a Resolução RDC nº 7 estabeleceu o limite máximo para Ocratoxina A em café solúvel em 10 µg/kg³.

As Colunas de Imunoafinidade (CIs) têm sido frequentemente utilizadas para o isolamento, a limpeza e a concentração de micotoxinas, pelo fato de apresentarem boa sensibilidade e especificidade. O desempenho de uma CI depende da habilidade de ligação do anticorpo ao antígeno, juntamente com sua capacidade, ou seja, a quantidade de anticorpos contidas nas colunas. Atualmente, existem diversas marcas de CIs para OTA disponíveis no mercado produzidas por diferentes fabricantes⁴.

Considerando a variação dos resultados obtidos nas determinações de OTA em café solúvel entre as CIs existentes, um estudo comparando a eficiência de CIs de três fabricantes distintos foi realizado em nosso laboratório utilizando como parâmetro a recuperação.

Amostras de café solúvel foram artificialmente contaminadas com OTA em níveis de 5 e 10 µg/kg. As CIs utilizadas foram de três diferentes fabricantes (A, B e C). A determinação de OTA nas amostras foi realizada seguindo a metodologia proposta (protocolo) de cada fabricante.

Para a separação e quantificação, foi utilizado CLAE-FL (Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência-Fluorescência) com coluna de fase reversa RP-18 (5 µm), Lichrosorb-Merck (250 mm), fase móvel Metanol:Acetonitrila:Ácido Acético 3,33% (35:35:30 V/V) com fluxo de 0,8 ml/min e comprimento de onda de excitação/emissão: 332/476 nm. Os limites de detecção e quantificação determinados foram de 0,24 µg/kg e 0,80 µg/kg, respectivamente.

Os resultados da recuperação estão apresentados na Tabela 1. As determinações utilizando as colunas do fabricante A não apresentaram recuperações nos níveis de 5 e 10 µg/kg. Testes utilizando uma quantidade maior de extrato da amostra (2,5 g) e diferentes solventes extratores (metanol, solução metanol-bicarbonato de sódio e bicarbonato de sódio com diferentes concentrações), foram realizados sendo que, em todas as situações, as recuperações foram insatisfatórias.

Tabela 1. Avaliação da recuperação (n = 3) de três colunas de imunoafinidade de diferentes fabricantes

Concentração da amostra (µg/kg)	A (%)	B (%)	C (%)
5	-	86,5	101,0
10	-	99,3	96,7

Adicionalmente, testes de recuperação utilizando padrão de OTA diretamente na coluna foram realizados em triplicata nos níveis de 5 e 100 ng. Nesse caso, as recuperações médias foram de 96,7%, 103,9% e 97,2% para as colunas dos fabricantes A, B e C, respectivamente.

De acordo com Senyuva⁵, a utilização de extratos da amostra na coluna é, provavelmente, a forma mais real para o estabelecimento de recuperações, embora frequentemente alguns métodos oficiais utilizem padrões diretamente na coluna. Entretanto, ainda não existe um protocolo harmonizado para se determinar recuperações. Sabe-se que a recuperação do analito em uma coluna de imunoafinidade depende da especificidade, da concentração do anticorpo na coluna e também da acessibilidade do analito ao anticorpo.

Recentemente, Trebstein et al⁶ publicaram um trabalho comparando a performance entre duas CIs comerciais para as toxinas T-2 e HT-2. A primeira (Easy-Extract[®]) apresentou uma recuperação superior a 80% nos níveis de 10-200 µg/kg tanto para as toxinas T-2 e HT-2 e a segunda (T-2test HPLC) apresentou recuperação de, aproximadamente, 60% independentemente dos níveis de fortificação. Os autores concluíram que a segunda coluna apresentou baixo desempenho como também foi afetada pelos componentes da matriz.

Da mesma forma que os autores anteriormente citados, concluímos que o baixo valor de recuperação apresentado pela coluna A poderá estar relacionado com os componentes da matriz, que impede a acessibilidade do analito ao anticorpo e também pela capacidade da coluna (concentração e/ou característica do anticorpo). O desempenho das CIs deve ser avaliado a cada novo lote a ser utilizado por meio de testes de recuperação e uso de materiais de referência quando possível, atendendo as normas de qualidade com vistas a garantir a exatidão, a precisão e a confiabilidade dos resultados analíticos.

REFERÊNCIAS

1. Jorgensen K. Occurrence of ochratoxin A in commodities and processed food – a review of EU occurrence data. *Food Addit Contam.* 2005;22:26-30.
2. Commission Regulation (EC) n° 123/2005 of 26 January 2005. Amending Regulation (EC) n° 466/2001 as regards ochratoxin A. *Official Journal of the European Union*, 28 of January 2005; L25/5.
3. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa. Resolução RDC n° 7, de 18 de fevereiro de 2011, dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. *Diário Oficial [da] União, Brasília*, 9 de março de 2011, Seção I.
4. Scott PM, Trucksess MW. Application of Immunoaffinity Columns to Mycotoxin Analysis. *Journal of AOAC Int.* 1997;80(5):941-948.
5. Senyuva HZ, Gilbert J. Immunoaffinity column clean-up techniques in food analysis: A review. *J Chromatogr B.* 2009;878(2):115-132.
6. Trebstein A, Seefelder W, Lauber U, Humpf HU. Determination of T-2 and HT-2 Toxins in Cereals Including Oats after Immunoaffinity Cleanup by Liquid Chromatography and Fluorescence Detection. *J Agric Food Chem.* 2008;56(13):4968-4975.