

## AValiação DE MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE Ocratoxina A EM CAFÉS VERDES E TORRADOS

Regina Prado Zanes FURLANI\*  
Lucia M. VALENTE SOARES\*  
Paulo Lauro C. de OLIVEIRA\*\*

RIALA 06/870

FURLANI, R.P.Z.; SOARES, L.M.V.; OLIVEIRA, P.L.C. — Avaliação de métodos para determinação de ocratoxina A em cafés verdes e torrados. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 58(2): 87-98, 1999.

**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. Apenas as colunas de imunoafinidade foram capazes de remover os interferentes existentes nos extratos de café permitindo a determinação de ocratoxina A por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência em níveis de 0,7 ng/g. 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.

**DESCRITORES:** Ocratoxina A, café, micotoxinas.

### INTRODUÇÃO

A ocratoxina A é um metabólito tóxico produzido por determinadas cepas de *Penicillium e Aspergillus*. A principal espécie conhecida como produtora de ocratoxina é *A. ochraceus*<sup>15</sup>. A ocratoxina A é nefrotóxica e tem ação teratogênica. O fígado é um alvo secundário da toxina<sup>4,7</sup>. A nefropatia endêmica dos Balcãs, doença degenerativa dos rins em humanos que muitas vezes leva à morte, tem sido correlacionada com os altos níveis de contaminação por ocratoxina A constatada nos alimentos daquela região<sup>20</sup>.

A ocratoxina A tem sido encontrada em cereais diversos<sup>21,24,26</sup>, alimentos de origem animal<sup>11,20,21</sup>, cerve-

ja<sup>20,21</sup>, vinho e suco de uva<sup>36</sup>, grãos de café verde e torrado<sup>14,27,30,31</sup> e em café solúvel<sup>17</sup>.

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<sup>33</sup>. Na União Européia existem sugestões de limites máximos de 5 ng/g para cereais e 1 ng/g para alimentos infantis<sup>34</sup>. A Itália, em 1996, propôs um limite de 4 ng/g para café verde em grãos<sup>6</sup>. 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 café verde corresponde a 4,6% das exportações brasileiras, ocupando portanto um lugar de desta-

\* Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. CP 6121, 13081-970, Campinas. São Paulo.

\*\* Companhia Caciue de Café Solúvel, Rua Horácio Sabino Coimbra, 100, 86072-900, Londrina, Paraná.

que. O Brasil é atualmente o maior produtor mundial de café. A bebida, por sua vez, é largamente consumida no país e em 1997 absorveu internamente 11,4 milhões de sacas da produção total de 18,9 milhões de sacas produzidos no país<sup>13</sup>. No entanto, qualquer trabalho de investigação da incidência desta toxina em café nacional passa necessariamente por uma avaliação da metodologia analítica disponível e sua aplicabilidade às condições existentes nos laboratórios nacionais.

Vários procedimentos para determinação de ocratoxina A em café têm sido propostos. A metodologia da *AOAC International*<sup>2</sup> 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 atualmente 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 al*<sup>5</sup> introduziram a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência para separar e detectar a ocratoxina A em café verde e alcançaram um limite de detecção 100 vezes menor que o do método da *AOAC*<sup>2</sup>. TERADA *et al*<sup>29</sup>, também utilizando cromatografia líquida de alta eficiência com fluorescência, 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 e a recuperação citada foi de 80,7% ou melhor.

NAKAJIMA *et al*<sup>16</sup> 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. Estes autores relataram limites de detecção de 0,5 ng/g para cafés em grão e cafés solúveis e recuperações acima de 98%. PIT-TET *et al*<sup>19</sup> 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. O limite de detecção descrito foi de 0,2 ng/g e a recuperação de 80% ou mais.

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 sensibilidade, precisão e exatidão para que possa ser usada em laboratórios nacionais.

## MATERIAIS E MÉTODOS

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 microfibras de vidro GF/B, marca Whatman; tampão fosfato (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.

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 alça de 20 L ou de 100L; 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; liqüidificador 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.

Preparo do padrão de ocratoxina A: foi preparada uma solução estoque do padrão de ocratoxina A com 100 g/mL em benzeno. Foi verificada a pureza dessa solução em camada delgada, nas condições descritas no item seguinte 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*<sup>2</sup>. 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 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.

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 200 µL de benzeno, agitados em ultra-som por 30 minutos e aplicados na camada. As placas foram visualizadas sob luz ultravioleta de comprimentos de onda de 254 nm.

mento de onda 366nm. A quantificação da ocratoxina A foi conseguida por comparação visual com padrão.

Cromatografia líquida de alta eficiência: As condições utilizadas no cromatógrafo líquido de alta eficiência foram as descritas por STUDER-ROHR *et al*<sup>28</sup>. A fase móvel foi metanol/ácido acético 9% (65+35) e a vazão de 1,0 mL/min. Os comprimentos de onda utilizados foram: excitação = 330 nm e 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 para um volume de injeção de 100 µL e 2 ng para 20 µL. Todos os extratos secos foram redissolvidos em 1 mL da fase móvel e filtrado através de filtro 0,45 µm. Foi testada a repetibilidade do detetor injetando-se 5 vezes o padrão de 1 µg/mL em um volume de injeção de 20 µL do injetor, nas condições cromatográficas descritas acima.

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. Cem ng de ocratoxina A foram transferidos para a coluna com ajuda do eluente da primeira fração. Todas as frações foram recolhidas separadamente e evaporadas até a secura e redissolvidas em 200 µL de benzeno quando utilizando cromatografia em camada delgada ou em 1mL de metanol/ácido acético 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 da ocratoxina A em colunas de extração em fase sólida tipo octadecilsilil.

Condicionamento da coluna	Aplicação da toxina (Fração 1)	Fração 2	Fração 3	Fração 4	Referência
10 mL metanol e 10 mL água	10 mL metanol com 0,1% ácido acético	10 mL metanol com 0,1% ácido acético	10 mL tolueno / acetato de etila / ácido fórmico (60+40+0,5)		
10 mL metanol e 10 mL água	10 mL metanol	10 mL metanol	10 mL tolueno / acetato de etila / ácido fórmico (60+40+0,5)		
10 mL metanol e 10 mL água	4 mL água	15 mL 40% acetona em água	5 mL água	15 mL 40% acetonitrila em água	
20 mL metanol e 20 mL água e 2mL CTA 0,005M	10 mL água	15 mL 40% cetona em água	5 mL água	15 mL 40% acetonitrila em água	
8,5 mL metanol, 8,5 mL água e 2mL Brometo de cetiltrimetilamoníam 0,005M	10 mL tampão fosfato pH=5,6 em 2,5mM CTA	15 mL 40% acetona em água	5 mL água	15 mL 40% acetonitrila em água	TERADA <i>et al</i> <sup>29</sup>

Testes realizados com padrão de ocratoxina A (100 ng). Quantificação por cromatografia em camada delgada. CTA — Brometo de cetilmetilamoníam.

Tabela 2. Sistemas testados para eluição de ocratoxina A em colunas de extração em fase sólida tipo octadecilsilil

Condicionamento da coluna	Aplicação da toxina Fração 1	Fração 2	Fração 3	Fração 4	Referência
10 mL água	20 mL água	20 mL metanol com 0,1% ácido acético			JW Scientific Products <sup>12</sup>
—	5 mL metanol e 5 mL água	6 mL água	3 mL em gradiente 10% metanol até 100% metanol	3mL acetona	
5 mL hexano, 5mL acetato etila e 5 mL metanol	5 mL metanol	5 mL clorofórmio			

Testes realizados com padrão de ocratoxina A (100 ng). Quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência.

Tabela 3. Sistemas testados para eluição da ocratoxina A em colunas de extração em fase sólida tipo cianopropil.

Condicionamento da coluna	Aplicação da Toxina (Fração 1)	Fração 2	Fração 3
10 mL tolueno	30 mL Tolueno	20 mL tolueno / acetato de etila / ácido fórmico (5+4+1)	20 mL metanol com 0,1% ácido acético
10 mL clorofórmio	10 mL clorofórmio	10 mL metanol / clorofórmio (1+19)	20 mL tolueno/ acetato de etila / ácido acético (50+49+1)

Testes realizados com padrão de ocratoxina A (100 ng). Quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência.

Tabela 4. Sistemas testados para eluição da ocratoxina A em colunas de extração em fase sólida tipo sílica.

Condicionamento da coluna	Aplicação da toxina Fração 1	Fração 2	Fração 3	Fração 4	Referência
10 mL clorofórmio	4 mL clorofórmio	10 mL clorofórmio	15 mL clorofórmio/ácido fórmico (100+2)		VALENTA & GOLL <sup>32</sup> , BREITHOLTZ <i>et alii</i> <sup>3</sup> .
10 mL clorofórmio	10 mL clorofórmio	10 mL clorofórmio	20 mL clorofórmio / acetona (9+1)	20 mL clorofórmio / ácido fórmico (100+2)	
10 mL clorofórmio	10 mL clorofórmio	15 mL clorofórmio/ácido fórmico (100+2)	10 mL clorofórmio/acetona (9+1)		
10 mL hexano	10 mL hexano	10 mL hexano / clorofórmio (9+1)	10 mL metanol / clorofórmio (3+97)	10 mL tolueno / ácido acético (9+1)	HÄGGBLOM & GHOSH <sup>8</sup> .
10 mL clorofórmio	10 mL clorofórmio	10 mL clorofórmio/acetona (9+1)	10 mL metanol / clorofórmio (3+97)	10 mL tolueno / ácido fórmico (100+2)	

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

Limpeza dos extratos: três enfoques 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).

Clarificação: foram testados individualmente os seguintes clarificantes para amostras de café verde e torrado, todos já de uso tradicional em determinações 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 empregado 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 descrito em Material e Métodos.

Também foi testado, em amostras de café verde e torrado utilizando-se os clarificantes citados acima, o método proposto por SOARES & RODRIGUEZ-AMAYA<sup>22</sup>. O procedimento aplicado está apresentado na Figura 2. Os extratos obtidos a partir desse procedimento foram injetados em cromatógrafo líquido de alta eficiência.

Partição: foi testado um desengorduramento com ciclohexano antes da partição para clorofórmio.

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 avaliadas 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

Tabela 5. Sistemas testados para eluição da ocratoxina A em colunas de extração em fase sólida tipo sílica.

Condicionamento da coluna	Aplicação da toxina (Fração 1)	Fração 2	Fração 3	Fração 4	Referência
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)	10mL tolueno / acetato de etila / ácido acético (50+47+3)		
10 mL clorofórmio	10mL clorofórmico	20 mL clorofórmio / metanol (19+1)	20 mL clorofórmio / ácido fórmico (19+1)	20 mL metanol com 0,1% ácido acético	
10 mL clorofórmio	10 mL clorofórmio	20 mL / metanol clorofórmio / metanol (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 metanol e 7 mL clorofórmio	7 mL clorofórmio	5 mL metanol			
7 mL metanol e 7 mL clorofórmio	2+5 mL clorofórmio	5 mL metanol	5 mL acetona		
10 mL diclorometano	10 mL diclorometano	10 mL diclorometano / ácido fórmico (98+2)			SCOTT <i>et al.</i> <sup>23</sup>

Testes realizados com padrão de ocratoxina A (100 ng). Quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência.

Tabela 6. Sistemas testados para eluição de ocratoxina A em colunas de extração em fase sólida tipo imunoafinidade

Transferência da Ocratoxina A	Fração 1	Fração 2	Fração 3
10 mL bicarbonato de sódio 1% / tampão fosfato, pH7,4 (1+1)	20 mL água	1,5 mL metanol / ácido acético (98:2) e 1,5 mL água	Rhône-Diagnostics <sup>22</sup>

Testes realizados com padrão de ocratoxina A (100 ng). Quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência.

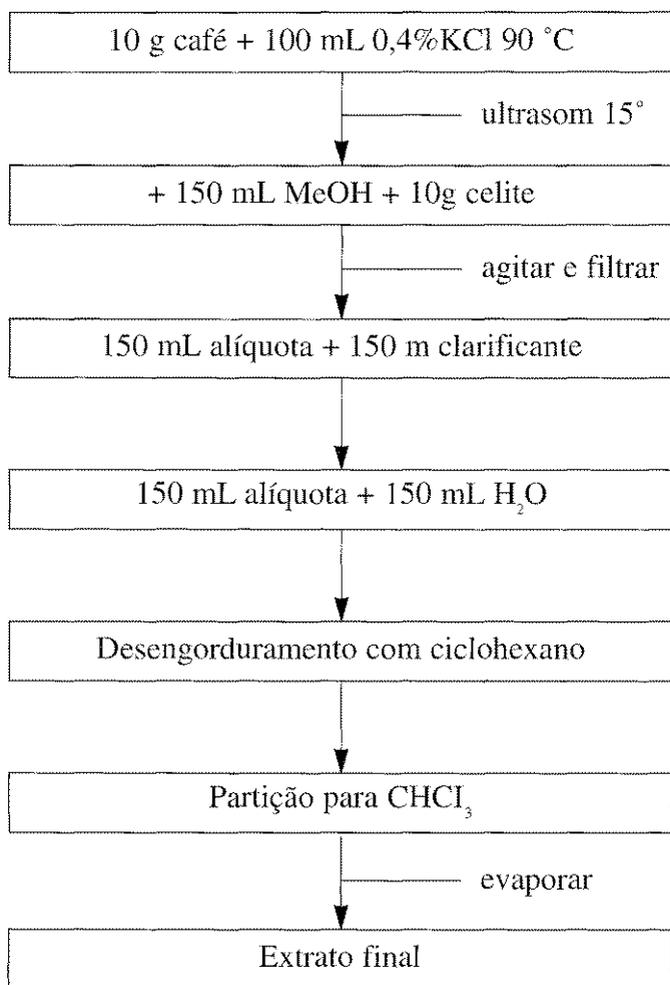


Figura 1 - Procedimento empregado para verificação da eficiência da limpeza de extratos de café verde e torrado com os clarificantes: sulfato de amônio (30%), acetato de chumbo (20%), sulfato de cobre (10%), mistura de ferrocianeto de potássio (0,25M) e acetato de zinco (1M) e mistura de acetato de chumbo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

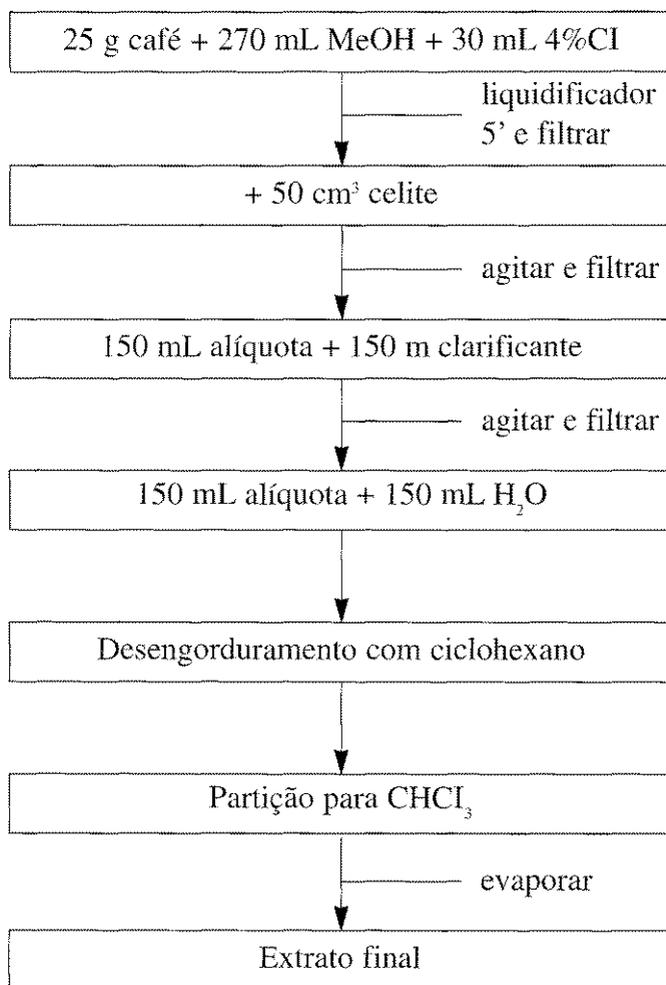


Figura 2 - Procedimento empregado para verificação da eficiência da limpeza de extratos de café verde e torrado com os clarificantes: sulfato de amônio (30%) e sulfato de cobre (10%).

Tabela 7. Sistemas testados para eluição da ocratoxina A em colunas de extração em fase sólida tipo sílica.

Condiciona- mento da coluna	Transferência da toxina (Fração 1)	Fração 2	Fração 3	Fração 4	Fração 5	Referência
5 mL tolueno	5 mL tolueno	5 mL tolueno/ acetona (95+5)	5 mL dietileter/ hexano (75+25)	5 mL clorofórmio / / metanol 97+3)	5 mL tolueno/ ácido acético (9+1)	Patel <i>et alii</i> <sup>18</sup> ; Howel&Taylor <sup>9</sup>

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

Tabela 8. Sistemas testados para eluição da ocratoxina A em colunas de extração em fase sólida tipo octadecilsilil.

Condicionamento da coluna	Transferência da Toxina (Fração 1)	Fração 2	Fração 3
10 mL água	10 mL água	20 mL água	Transferir a ocratoxina A da fase aquosa para clorofórmio
5 mL hexano, 5 mL acetato etila e 5 mL metanol	7 mL metanol	5 mL clorofórmio	

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

contaminadas foram extraídas conforme o procedimento apresentado na Figura 1, utilizando-se sulfato de cobre como clarificante.

— 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. A metodologia preconizada pelo outro fabricante de colunas de imunoafinidade foi considerada não apropriada por desativar a coluna desnaturando-a, impedindo a reutilização. O extrato obtido foi injetado em cromatógrafo líquido de alta eficiência, com volume de injeção de 100 µL, conforme descrito em Material e Métodos.

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 contendo azida de sódio (0,5g/L) e colocada sob refrigeração (3-8°C) em geladeira comum por no mínimo 48 horas<sup>35</sup>. Foi utilizada uma amostra não contaminada de café verde, à qual foi adicionado padrão de ocratoxina A dissolvido em metanol/ácido acético até obter 10 ng/g. Cem µL do extrato obtido foram injetados em cromatógrafo líquido de alta eficiência conforme descrito em Material e Métodos.

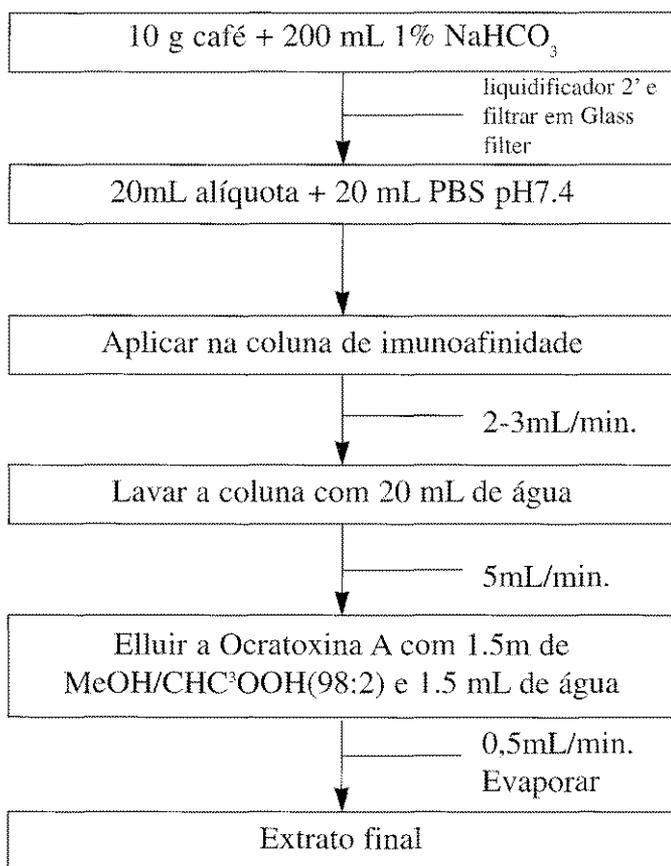


Figura 3. Procedimento empregado para a verificação da eficiência da limpeza de extratos de café verde e torrado em colunas de imunoafinidade.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Sensibilidade e repetibilidade 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%. A sensibilidade foi calculada como preconizado pela IUPAC<sup>10</sup>. A sensibilidade obtida foi 24869 x 10<sup>7</sup> mV. cm<sup>3</sup>. mg<sup>-1</sup>.

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, foi obtida uma recuperação de 95% da toxina na fração I (água). Quando a coluna foi condicionada com hexano, acetato de etila e metanol a recuperação foi de 84% na fração I (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 (Tabela 5), 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 I. 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 de recuperação foi de 87,5 ± 14,8% e o desvio padrão relativo médio foi de 10%.

Limpeza dos extratos de café verde e torrado:

— Clarificação: Os extratos de café torrado, após clarificação, apresentaram cor marrom escuro. 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 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.

— Partição: O desgorduramento com ciclohexano, antes da partição para clorofórmio, não apresentou mudanças significativas na limpeza dos extratos, tanto para café verde, quanto para café torrado.

— Limpeza em fase sólida: Os extratos de café verde e torrado obtidos da extração que foram aplicados em colunas de sílica e octadecilsilil (Tabelas 7 e 8) e sub-

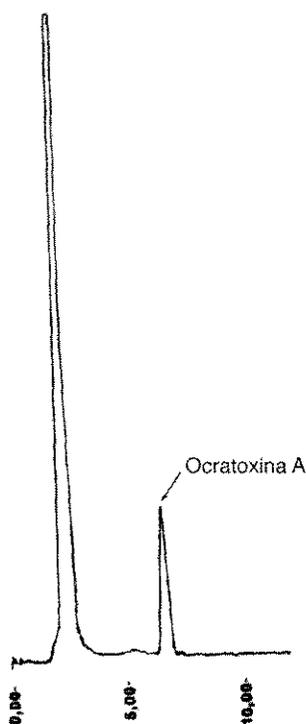


Figura 4. Perfil cromatográfico de uma amostra de café verde contaminado artificialmente com ocratoxina A.

metidos 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, 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 ± 2,5% com coeficiente de variação de 2,6%. Testes com café torrado mostraram recuperações da mesma ordem de grandeza que com café verde. Testes com café torrado mostraram recuperações da mesma ordem de grandeza que com café verde.

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. 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.

O limite de detecção em amostras de cafés verdes e torrados, após limpeza em coluna de imunoafinidade quantificação em cromatografia líquida de alta eficiência com fluorescência, foi determinado como preconizado pela ACS<sup>1</sup>. Nas condições empregadas e já descritas para cromatografia líquida, o limite de detecção foi de 0,7 ng/g. Este limite de detecção está na mesma ordem de grandeza do relatado por autores que usam colunas de imunoafinidade para limpeza dos extratos e cromatografia líquida de alta eficiência com fluorescência para quantificação da toxina<sup>16,17,19,28,29</sup>. Pequenas variações nos limites de detecção relatados nos diversos trabalhos podem ser atribuídos à diferentes níveis de sensibilidade dos detetores de fluorescência utilizados por cada laboratório.

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

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

## 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 com 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

RIALA 06/870

FURLANI, R.P.Z.; SOARES, L.M.V.; OLIVEIRA, P.L.C. — Evaluation of methods for ochratoxin A determination in green and roasted coffees. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 58(2) 87-98, 1999.

**ABSTRACT:** Different extraction solvents and cleanup techniques for mycotoxins determination were evaluated for green 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 interferences 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 repeated 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.

**KEY WORDS:** Ochratoxin A, coffee, mycotoxins.

## REFERÊNCIAS

1. AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. Guidelines for data acquisition and data quality evaluation in environmental chemistry. *Anal. Chem.* 52: 2242 — 2249, 1980.
2. AOAC INTERNATIONAL. *Official Methods of Analysis*, 16<sup>a</sup> ed., 3<sup>a</sup> rev., Gaithersburg, MD, Method 975.38, 1997.
3. BREITHOLTZ-EMANUELSSON, A.; OLSEN, M.; OSKARSSON, A.; PALMINGER, I. & HULT, K. Ochratoxin A in cow's milk and in human milk with corresponding human blood samples, *J. AOAC Int.*, 76: 842-846, 1993.
4. BUSBY JR., W.F. & WOGAN, G.N. Ochratoxins. In: *Mycotoxins and N-nitroso compounds: environmental risks*, Boca Raton, SHANK, R.C., 1981, vol.II, p.129-136.
5. CANTAFORA, A.; GROSSI, M.; MIRAGLIA, M. & BENELLI, L., Determination of ochratoxin A in coffee beans using reversed-phase high performance liquid chromatography, *Riv. Soc. Ital. Alimen.*, 12: 103-108, 1983.
6. DIPARTIMENTO DOGANE — *Circolare n.76* — Ministero delle Finanze — Roma, Itália, 21/03/1996.
7. DIRHEIMER, G. Mechanistic approaches to ochratoxin toxicity. *Food Add. Contam.*, 13: 45-48, Supplement, 1996.
8. HÄGGBLUM, P.E. & GHOSH, J. Postharvest production of ochratoxin A by *Aspergillus ochraceus* and *Penicillium viridicatum* in barley with different protein levels, *Appl. Environ. Microbiol.*, 49: 787-790, 1985.
9. HOWELL, M.V. & TAYLOR, P.W. Determination of aflatoxins, ochratoxin A, and zearalenone in mixed feeds, with detection by thin layer chromatography or high performance liquid chromatography, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 64: 1356-1363, 1981.
10. INTERNATIONAL UNION FOR PURE AND APPLIED CHEMISTRY. Nomenclature for chromatography. *Pure Appl. Chem.* 65: 819-872, 1993.
11. JORGENSEN, K. Survey of pork, poultry, coffee, beer and pulses for ochratoxin A, *Food Add. Contam.* 15: 550-554, 1998.
12. JW Scientific Products Catalog & Reference Guide, 1992-93.
13. MORICOCCHI, L. Café. [[http://www.iea.sp.gov.br/café\\_98.htm](http://www.iea.sp.gov.br/café_98.htm)], 29/06/99.
14. MICCO, C.; GROSSI, M.; MIRAGLIA, M. & BRERA, C. Study of the contamination by ochrato-

- xin A of green and roasted coffee beans. *Food Add. Contam.*, 6: 333-339, 1989.
15. MOSS, M. O. Mode of formation of ochratoxin A. *Food Add. Contam.*, 13: 5-9, Supplement, 1996.
  16. 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 Agric. Immunol.*, 2: 189-195, 1990.
  17. PATEL, S.; HAZEL, C. M.; WINTERTON, A. G. M. & GLEADLE, A. E. Survey of ochratoxin A in UK retail coffees. *Food Add. Contam.*, 14: 217-222, 1997.
  18. PATEL, S.; HAZEL, C. M.; WINTERTON, A. G. M. & MORTBY, E. Survey of ethnic foods for mycotoxins. *Food Add. Contam.*, 13: 833-841, 1996.
  19. 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. *J. Agric. Food Chem.*, 44: 3564-3569, 1996.
  20. PLESTINA, R. Nephrotoxicity of ochratoxin A. *Food Add. Contam.*, 13: 49-50, Supplement, 1996.
  21. POHLAND, A. E.; NESHEIM, S. & FRIEDMAN, L. Ochratoxin A. *Pure Appl. Chem.* 64: 1029-1046, 1992.
  22. RHÔNE-DIAGNOSTICS TECHNOLOGIES LTD. *ochaprep quantitative detection of ocratoxin A. Instructions for use*, Products codes: P14, P14B, Version P14/V2/ 11.08.97.
  23. SCOTT, P. M. & KANHERE, S. R. Determination of ochratoxin A in beer. *Food Add. Contam.*, 12: 591-598, 1995.
  24. SHARMA, R.P. & SALUNKHE, D.K. Occurrence of mycotoxins in foods and feeds. in: *Mycotoxins and phytoalexins*, Boca Raton, FL, SHARMA, R.P. & SALUNKHE, D.K., 1991, p.13-31.
  25. SOARES, L.M.V. & RODRIGUES-AMAYA, D.B., Screening and quantitation of ochratoxin A in corn, peanuts, beans, rice, and cassava, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 68: 1128-1130, 1985.
  26. SPEIJERS, J.A. & VAN EGMOND, H.P. Worldwide ochratoxin A levels in food and feeds, in: *Human ochratoxicosis and its pathologies*, Paris, CREPPY, E.E; CASTEGNARO, M. & DIRHEIMER, G., 1993, p. 85 — 100.
  27. STEGEN, G. V. D.; JÖRRISSEN, U.; PITTET, A.; SACCON, M.; STEINER, W.; VICENZI, M.; WINKLER, M.; ZAPP, J. & SCHLATTER, C. Screening of European coffee final products for occurrence of ochratoxin A (OTA). *Food Add. Contam.*, 14: 211-216, 1997.
  28. STUDER-ROHR, I.; DIETRICH, D. R.; SCHLATTER, J.; SCHLATTER, C. The occurrence of ochratoxin A in coffee. *Food Chemical Toxicology*, 33: 341-355, 1995.
  29. TERADA, H.; TSOUBUCHI, H.; YAMAMOTO, K.; HISADA, K. & SAKABE, Y. Liquid chromatographic determination of ochratoxin A in coffee beans and coffee products. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 69: 960-964, 1986.
  30. 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.
  31. TSUBOUCHI, H.; TERADA, H.; YAMAMOTO, K.; HISADA, K. & SAKABE, Y. Ochratoxin A found in commercial roast coffee. *J. Agric. Food Chem.*, 36: 540-542, 1988.
  32. VALENTA, H. & GOLL, M., Determination of ochratoxin A in regional samples of cow's milk from Germany. *Food Add. Contam.*, 13: 669-676, 1996.
  33. VAN EGMOND, H. P. Analytical methodology and regulations for ochratoxin A. *Food Add. Contam.*, 13: 11-13, Supplement, 1996.26.
  34. VERARDI, G.; ROSNER, H. Some Reflections on Establishing a Community Legislation on Mycotoxins. *Natural Toxins*, 3: 337-340, 1995.
  35. ZIMMERLI, B. & DICK, R. Study to repeated Use of commercial immunoaffinity columns. *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.*, 87: 732-742, 1996.
  36. ZIMMERLI, B. & DICK, R. Ochratoxin A in table wine and grape-juice: occurrence and risk assessment, *Food Add. Contam.*, 6: 655-668, 1996.

Recebido para publicação em 25/03/1999