

ANÁLISE DE OCRATOXINA A NO MONITORAMENTO DE CAFÉ POR CLAE

Ricardo M. R. RIBEIRO¹ E-mail: recheribeiro@yahoo.com.br, Simone FUJII¹, Maria Brígida S. SCHOLZ², Elisabete Y. S. ONO³, Cássia R. TAKABAYASHI¹, Andréia B. NOGARI¹, Elisa Y. HIROOKA¹

¹Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, ²Instituto Agrônomo do Paraná, IAPAR, Londrina, PR, ³Departamento de Bioquímica, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR.

Resumo:

A cafeicultura brasileira reveste-se de grande importância para a economia nacional, estando a qualidade e sanidade do café relacionadas com a contaminação fúngica, com ênfase a espécies produtoras de ocratoxina A (OTA). A presença desta micotoxina nefrotóxica em produtos agrícolas tem repercutido em efeitos deletérios à saúde humana e no mercado internacional. Estas implicações têm estimulado a pesquisa sobre monitoramento de ocratoxina A em café, visando direcionamento na prevenção de crescimento fúngico e produção de toxinas. Neste estudo, amostras de café foram analisadas por CLAE quanto à contaminação por OTA, utilizando CCD como etapa de limpeza. A metodologia analítica utilizada foi considerada eficiente para análise de OTA apresentando recuperação de 69,57 a 93,56 % e limite de quantificação de 0,05 ng/g. A contaminação natural por OTA variou de valores abaixo de 0,05 a 0,843 ng/g evidenciando a qualidade e sanidade das amostras de café analisadas.

Palavras-chave: café, ocratoxina, CLAE, CCD, fungos toxigênicos

ANALYSIS OF OCHRATOXIN A IN THE MONITORING OF COFFEE BY HPLC

Abstract:

The Brazilian coffee is one of the most important product aiming national economy, where the quality and sanity of coffee are closely related with fungal contamination, with emphasis on ochratoxin A (OTA) producing specimens. The presence of this nephrotoxic mycotoxin in agricultural product has been caused deleterious effect to the human health and international trade. These implications stimulate the research about monitoring of ochratoxin A in coffee, intended for directing the prevention of fungal growth and further toxin production. In this study, samples of coffee were analyzed to OTA contamination by HPLC, using TLC as clean-up step. The analytical methodology was efficient for OTA analysis with recovery ranged from 69,57 to 93,56 % and limit of quantification of 0,05 ng/g. The OTA natural contamination ranged from values below 0,05 to 0,843 ng/g showed adequate quality and sanity of coffee samples.

Key words: coffee, ochratoxin, HPLC, TLC, toxigenic moulds

Introdução

A cultura brasileira de café se destaca no mercado interno e expande para o âmbito internacional, classificando o Estado do Paraná, conhecido tradicionalmente como pólo da cafeicultura, entre os principais produtores nacionais (Toledo, 2000; Leoni et al., 2001).

Os frutos de café estão expostos à contaminação por uma variedade de microrganismos, principalmente de fungos capazes de afetar fases de pré e pós-colheita, resultando em perda no rendimento, descoloração, redução do valor nutricional e contaminação por micotoxinas (Souza & Carvalho, 1997). A intensidade e diversidade da microbiota, assim como a subsequente produção de toxinas, são condicionadas pelas etapas de colheita, preparo, transporte e armazenamento (Taniwaki *et al.* 1998 e 1999, Urbano *et al.*, 2001), associadas a condições ambientais que prevalecem nas regiões produtoras durante o ciclo produtivo (Souza & Carvalho, 1997; Hussein & Brasel, 2001).

A contaminação fúngica e a produção de metabólitos tóxicos constituem fatores inevitáveis de difícil controle, que repercutem na qualidade de café, economia do país e saúde do consumidor. (Petracco, 1998; ABIC, 2002).

Entre micotoxinas destaca-se a ocratoxina A, cuja relevância se justifica pela contaminação natural em uma variedade de alimentos e subsequente envolvimento em intoxicações animais e na etiologia de doenças renais em humano (Fink-Gremmels et al., 1995; Jodlbauer et al., 2002).

A ocratoxina A (OTA) pertence a grupo de metabólito secundário produzido na fase exponencial tardia, ou no início da fase estacionária de crescimento por alguns *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp., que frequentemente contaminam o café e ampla variedade de cereais (Larsen et al., 2001; Dall'Asta et al., 2004). *A. ochraceus* e *P. verrucosum* representam as principais espécies produtoras, sendo que se diferenciam nas condições ótimas de temperatura, pH, atividade de água e necessidades nutricionais para o crescimento e produção de OTA (Jodlbauer et al., 2002; Accensi et al., 2004).

Quimicamente, a OTA (7-[L-β-fenil alanil carbonil]carboxil-5-cloro-8 hidróxi-3,4 diidro-3R metil isocumarina) consiste de uma diidroisocumarina ligada através de seu grupo 7-carboxil, por uma ligação amida, à L-fenilalanina (Xiao et al., 1995; Trucksess et al., 1999; Dall'Asta et al., 2004).

Entre as ocratoxinas e análogos que compõem o grupo, a literatura relata ocorrência de ocratoxina A, ocratoxina B, ocratoxina C, ocratoxina α, metiléster de Oα, 4-hidroxi-OTA entre outros (Kawamura et al., 1989; Xiao et al., 1995; Harris e Mantle, 2001). OTA destaca-se pela maior toxicidade e ocorrência natural em produtos vegetais, envolvendo-se em intoxicações clínicas e subclínicas em animais e na etiologia de doenças humanas (Nefropatia Endêmica dos Balcãs) (Fink-Gremmels et al., 1995; Petzinger & Weiaenbach, 2002; Schwartz, 2002).

A evidência de propriedades toxicológicas da OTA em várias espécies animais se deve a efeitos nefrotóxicos e ação teratogênica, citotóxica, imunotóxica, genotóxica, imunossupressora e possivelmente carcinogênica (Fink-Gremmels et al., 1995; Creppy, 1999).

A exposição humana decorre da ingestão de uma variedade de alimentos, sendo os cereais e derivados, os principais contribuintes de OTA na dieta, além de fontes secundárias constituídas de produtos cárneos, especiarias, cerveja, vinho, chás, sucos de frutas e café (Abarca et al., 2001; Soleas et al., 2001). Referente a café, a OTA tem sido detectada desde grão verde, a produtos processados e comercializados sob forma de torrado/moído, solúvel e bebida (Prado et al., 2000; Otteneder & Majerus, 2001). No Brasil, a importância da cafeicultura no mercado interno e externo enfatizou a pesquisa de OTA em café, cuja presença repercute impacto na qualidade do produto, economia do país e saúde do consumidor (Leoni et al., 2001; Otteneder e Majerus, 2001).

Embora o café constitua uma fonte marginal de OTA na dieta, limites para os níveis desta micotoxina nos grãos de café têm sido propostos pela União Européia e adotados por vários países, sendo 8µg/Kg para café cru e 4µg/Kg para café torrado (Hoyland et al., 2000). No Brasil, ainda não existe legislação específica definindo OTA em qualquer tipo de alimento ou ração (Furlani et al., 1999; Prado et al., 2000).

O perigo potencial de OTA na saúde pública, aliada a inevitável presença em produtos alimentícios, requer desenvolvimento de métodos simples e rápidos, caracterizados pela alta sensibilidade e eficiência para monitorar exposição humana e animal (Chu, 1984; Furlani et al., 1998).

Metodologias analíticas para a detecção de OTA em café e derivados incluem cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia de afinidade (AOAC, 1995; Martins et al., 2000; Trucksess et al., 2000; Larsen et al., 2001). O método oficialmente aceito pela "Association of Official Analytical Chemists" (AOAC) para proceder análise quantitativa de micotoxinas é a CLAE, cuja aplicação depende de etapa de pré-limpeza da amostra para remoção de impurezas e concentração de micotoxinas presentes no extrato bruto.

O objetivo deste estudo consistiu em monitorar a contaminação de OTA em amostras de café visando o controle de qualidade através de metodologias analíticas (CCD e CLAE).

Material e Métodos

Foram utilizadas 48 amostras de grãos de café (*Coffea arabica*), colhidas na Estação Experimental do IAPAR de Londrina, no período de julho a outubro de 2003. A região de coleta consistiu em 4 canteiros (parcelas) contendo 10 plantas cada um. As amostras foram obtidas da planta (estágio de maturação cereja) e do solo, sendo a colheita realizada a cada 15 dias. Os frutos foram secos ao sol, em caixas teladas, até atingirem a umidade de 12 %. Em seguida as amostras foram beneficiadas, trituradas em moinho laboratorial (moinho A10 Janke & Kunkel IKA® Labortechnik) para 48 mesh e destinadas à análise de OTA.

A extração de OTA procedeu-se conforme Pittet et al. (2002) modificado, utilizando a metodologia de CCD como etapa de limpeza (Soarez e Rodrigues-Amaya, 1985). Após a separação dos componentes das amostras em CCD, as placas foram visualizadas sob luz UV a 333 nm e os "spots" que apresentarem valores de "Rf" equivalentes ao padrão de OTA foram raspados, introduzidos em tubo "ependorf" e adicionados de 2 mL de metanol. A mistura foi sonicada por 1 min, filtrada (MILLIPORE -HV, 0,45 µ) e seca a 40 °C sob fluxo de nitrogênio gasoso. As amostras foram ressuspendidas em 200 µL de acetonitrila:água (1:1, v/v) e analisadas por CLAE. A análise por CLAE procedeu-se segundo método de Pittet et al. (1996) modificado (Solcamp Indústria e Comércio), consistindo de sistema isocrático de fase reversa, bomba (Shimadzu LC10-AD), detector de fluorescência (Shimadzu RF535) com comprimento de onda de excitação e emissão de 335 e 475 nm, respectivamente e coluna Nucleosil 100 C18 (250 mm x 4 mm, Merck, KgaA, Darmstadt, Alemanha). A fase móvel consistiu de acetonitrila:água:ácido acético (99:99:2, v/v/v) sob vazão de 0,8 mL/min.

A metodologia de análise envolvendo as etapas de extração, limpeza e quantificação foi analisada quanto a recuperação de OTA utilizando amostras de café negativas para OTA e contaminadas artificialmente com padrão desta micotoxina nas concentrações de 100, 250 e 500 ng/g.

Resultados e Discussão

Os resultados obtidos da análise de recuperação da metodologia utilizada estão representados na Tabela 1. As amostras de café contaminadas artificialmente com 100 a 500 ng/g de OTA apresentaram valores de recuperação de 69,57 a 93,56 % por CLAE, evidenciando melhores resultados em amostras com menor nível de contaminação, sendo 93,56 % para

amostras contaminadas com 100 ng/g, 69,57 % para 250 ng/g e 70,64 % para 500 ng/g. Estes valores demonstraram eficiência da metodologia envolvendo etapas de extração, limpeza e quantificação, podendo ser considerada adequada para análise e monitoramento de OTA em grãos de café. O estudo de recuperação demonstrou ainda a eficiência da técnica de CCD como etapa de limpeza de extrato bruto de café, minimizando custos em relação ao uso de minicolunas e outros métodos de limpeza.

Tabela 1 - Recuperação de OTA por CLAE em grãos de café cereja.

	OTA		Recuperação (%) ^a
	Adicionada	Recuperada	
100ng/g	93,56 ± 3,49	93,56 ± 3,49	93,56 ± 3,49
250ng/g	173,93 ± 8,38	69,57 ± 3,35	69,57 ± 3,35
500ng/g	353,2 ± 15,05	70,64 ± 3,01	70,64 ± 3,01

^a média ± desvio padrão de duas repetições em duplicata

A curva de calibração referente à metodologia foi confeccionada utilizando 5 concentrações de OTA (5, 10, 25, 50, 75, 100 ng/mL) em acetonitrila:água (50:50, v/v). A curva apresentou coeficiente de correlação de 0,998 e limite de quantificação de 0,05ng OTA/g café, constituindo técnica sensível para análise de OTA.

A Tabela 2 apresenta os resultados da análise de OTA por CLAE em 48 amostras de café. As concentrações de OTA variaram de valores abaixo de 0,05 a 0,843 ng/g, evidenciando baixo nível de contaminação. Os valores obtidos podem também ser justificados pelo fato de que as amostras de café não foram submetidas à etapa de estocagem, considerada um processo crítico na garantia da qualidade do produto por favorecer a produção de OTA quando realizada de maneira inadequada.

Tabela 2 – Análise de OTA por CLAE em amostras de café.

Data da Coleta	Amostra	Local da Coleta	OTA (ng/g) ^a			
			Canteiro 1	Canteiro 2	Canteiro 3	Canteiro 4
15/08/03	1	Planta	nd ^b	nd	nd	nd
	2	Solo	0,637 ± 0,071	nd	nd	nd
01/09/03	3	Planta	nd	nd	nd	nd
	4	Solo	nd	nd	nd	nd
15/09/03	5	Planta	nd	nd	nd	nd
	6	Solo	nd	nd	nd	nd
30/09/03	7	Planta	nd	nd	nd	0,843 ± 0,14
	8	Solo	nd	0,104 ± 0,01	0,082 ± 0,003	nd
15/10/03	9	Planta	nd	0,092 ± 0,026	nd	nd
	10	Solo	nd	nd	nd	0,146 ± 0,011
31/10/03	11	Planta	nd	nd	nd	nd
	12	Solo	nd	nd	0,104 ± 0,028	nd

^a média ± desvio padrão de 1 repetição em duplicata.

^b não detectado considerado abaixo do limite de quantificação da metodologia (0,05 ng/g).

Os resultados deste estudo indicaram uma baixa contaminação por OTA das amostras analisadas, evidenciando a qualidade e sanidade do café. No entanto, embora o café constitua uma fonte marginal de OTA na dieta, o monitoramento desta micotoxina neste substrato torna-se essencial perante os limites impostos pelos países importadores (8µg/Kg para café cru e 4µg/Kg para café torrado) (Hoyland *et al.*, 2000) aliado ao alto consumo da bebida no país.

Referências bibliográficas

- Abarca, M.L.; Accensi, F.; Bragulat, M.R. Cabañes, F.J. (2001) Review: Current importance of ochratoxin A producing *Aspergillus* spp. **Journal of Food Protection**. 64:903-906.
- Accensi, F.; Abarca, M.L.; Cabañes, F.J. (2004) Occurrence of *Aspergillus* species in mixed feeds and component raw materials and their ability to produce ochratoxin A. **Food microbiology**. 21:623-627.
- AOAC INTERNATIONAL (1995). Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists International. Edited by Cunniff, P. 16th ed, V.II, Chapter 49:37-41.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ (ABIC), 2002. <http://www.abic.com.br>.
- Chu, F.S.(1984) Immunoassays for analysis of mycotoxins. **Journal of Food Protection**.47:562-569.
- Creppy, E.E. (1999) Human ochratoxicosis. **Journal of Toxicology-Toxin Reviews**, 18:277-293.
- Dall'asta, C.; Galaverna, G.; Dossena, A.; Marchelli, R. (2004) Reversed-phase liquid chromatographic method for the determination of ochratoxin A in wine. **Journal of Chromatography A**, 1024:275-279.
- Fink-Gremmels, J.; Jahn, A.; Blom, M.J. (1995) Toxicity and Metabolism of Ochratoxin A. **Natural Toxins**, 3:214-220.
- Furlani, R.P.Z.; Oliveira, P.L.C.; Soares, L.M.V. (1998) Ocratoxina A em cafés verdes brasileiros: diferenças com relação a espécie. In: IX Encontro Nacional de Micotoxinas e I Simpósio em Armazenagem Qualitativa de Grãos do Mercosul, **Resumos...** Florianópolis, SC, p.19.
- Furlani, R.P.Z.; Oliveira, P.L.C.; Soares, L.M.V. (1999) Avaliação de métodos para determinação de ocratoxina A em cafés verdes e torrados. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 58:87-98.
- Hussein, S.H.; Brasel, J.M. (2001) Toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, 167:101-134.
- Jodlbauer, J.; Maier, N.M.; Lindner, W. (2002) Towards ochratoxin A selective molecularly imprinted polymers for solid-phase extraction. **Journal of Chromatography A**, 945:45-63.
- Larsen, T.O.; Svendsen, A.; Smedsgaard, J. (2001) Biochemical characterization of ochratoxin A producing strains of the genus *Penicillium*. **Appl. Environ. Microbiol.**, 67:3630-3635.
- Leoni, L.A.B.; Furlani, R.P.Z.; Valente Soares, L.M.; Oliveira, P.L.C. (2001) Ochratoxin A in Brazilian green coffees. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, 21:105-107.
- Martins, D.O.; Babadopulos, P.; Santos, E.A.; Vargas, E.A. (2000) Use of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay (Elisa) for detection and quantification of ochratoxin A in green coffee. In: X INTERNATIONAL IUPAC SYMPOSIUM ON MYCOTOXINS AND PHYCOTOXINS, Guarujá, 2000. **Anais...** Guarujá: IUPAC, 2000, p.19.
- Otteneder, H.; Majerus, P. (2001) Ochratoxin A (OTA) in coffee: nation wide evaluation of data collected by German Food Control 1995-1999. **Food Additives and Contaminants**, 18:431-435.
- Petracco, M. (1998) Melhoria da Qualidade do Café pela Redução do Crescimento de Fungos. In. IX Encontro Nacional de Micotoxinas, 1998. **Palestra...** Florianópolis, SC, p. 1-20.
- Petzinger, P.; Weidenbach, A. (2002) Mycotoxins in the food chain: the role of ochratoxins. **Livestock Production Science**, 76:245-250.
- Pittet, A.; Tornare, D.; Huggett, A.; Viani, R. (1996) Liquid chromatographic determination of ochratoxin A in pure and adulterated soluble coffee using an immunoaffinity column cleanup procedure. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 44:3564-3569.
- Pittet, A.; Royer, D. (2002) Rapid, low cost thin layer chromatographic screening method for the detection of ochratoxin A in green coffee at control level of 10 µg/kg. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**,50:243-247.
- Prado, G.; Oliveira, M.S.; Abrantes, F.M. (2000) Incidência de ocratoxina A em café torrado e moído e em café solúvel consumido na cidade de Belo Horizonte, MG. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, 20: 192-196.

- Schwartz, G.G. (2002) Hypothesis: does ochratoxin A cause testicular cancer? **Cancer Causes Control**, 13:91-100.
- Soares, L.M.V.; Rodriguez Amaya, D.B.(1985) Screening and quantitation of ochratoxin A in corn, peanuts, beans, rice and cassava. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists International**, 68:1128-1130.
- Soleas, G.J.; Yan, J.; Goldberg, D.M. (2001) Assay of ochratoxin A in wine and beer by high pressure liquid chromatography photodiode array and gas chromatography mass selective detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 49:2733-2740.
- Souza, S.M.C.; Carvalho, V.L. (1997) Efeitos de microrganismos na qualidade da bebida do café. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte-MG, 18:21-23.
- Taniwaki, M.H.; Banhe, A.A.; Iamanaka, B.T. Incidência de fungos em café. In: IX Encontro Nacional de Micotoxinas e I Simpósio em Armazenagem Qualitativa de Grãos do Mercosul, 1998. **Resumos...** Florianópolis, SC,p.32.
- Taniwaki, M.H.; Banhe, A.A.; Iamanaka, B.T. Incidência de fungos em café. In: III SIBAC, III Seminário Internacional sobre Biotecnologia na Agroindústria Cafeeira, 1999. **Anais...** Londrina, PR, p.487-492.
- Toledo, L. (2000) Os diferentes sabores e preços do café brasileiro. **Rev. Exportar & Gerência-Brasília**, 20:18-24.
- Trucksess, M.W.; Giler,J.; Young, K.; White, K.D.; Page, S.W. (1999) Determination and Survey of Ochratoxin A in Wheat, Barley and Coffee. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists International**, 82:85-89.
- Trucksess, M.W. Rapid analysis (Thin layer chromatographic and immunochemical methods) for mycotoxins in food and feeds. In: X INTERNATIONAL IUPAC SYMPOSIUM ON MYCOTOXINS AND PHYCOTOXINS, Guarujá, 2000 (a). **Anais...** Guarujá: IUPAC, p.5, 2000.
- Urbano, G.R.; Taniwaki, M.H.; Leitão, M.F.; Vicentini, M.C. (2001) Occurrence of ochratoxin A producing fungi in raw Brazilian coffee. **Journal of the Food Protection**,64:1226-1230.
- Xiao, H.; Marquardt, R.R.; Frohlich, A.A.; Ling, Y.Z. (1995) Synthesis and structural elucidation of analogs of ochratoxin A. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 43:524-530.