

AValiação de Ocratoxina A em Café Canéfora Produzido em Rondônia e Espírito Santo

Izabela Miranda de Castro¹; Otniel Freitas-Silva²; Alessandra da Silva Teixeira⁴; Maria de Lourdes Mendes de Souza⁵;
Evelyn Fonseca Pinheiro⁶; Jéssica Feitoza da Rocha⁷; Enrique Anastácio Alves³

¹Pesquisador, D.Sc., Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro-RJ, izabela.castro@embrapa.br

²Pesquisador, D.Sc., Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro-RJ, otniel.freitas@embrapa.br

³Pesquisador, D.Sc., Embrapa Rondônia, Porto Velho-RO, enrique.alves@embrapa.br

⁴Técnica B, M. Sc., Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro-RJ, alessandra.teixeira@embrapa.br

⁵Analista A, D.Sc., Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro-RJ, marialourdes.m.souza@embrapa.br

⁶Bolsista CNPq, B.Sc., Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro-RJ, evelynfonsekp@hotmail.com

⁷Bolsista CNPq, B.Sc., Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro-RJ, jessica.bqpn@gmail.com

RESUMO: O objetivo desse trabalho foi determinar ocratoxina A (OTA) em café canéfora. As análises de OTA foram realizadas em 106 amostras de café verde oriundas dos estados de Rondônia (N = 96) e do Espírito Santo (N = 23), usando colunas de imunoafinidade e quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência (CLAE / DFL). Dentre as 106 amostras de café verde analisadas, 93% evidenciaram a presença de OTA. A incidência elevada deste metabólito fúngico nas amostras positivadas ficou na faixa de 0,02 a 84,1 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$, e a concentração média de OTA nestas amostras foi de 6,02 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$. A contaminação por OTA nas amostras de ambos os estados pode representar uma via de exposição deste metabólito para os consumidores devido ao consumo frequente e prolongado da bebida café pela população brasileira. Isto indica claramente que estratégias de mitigação devem ser adotadas para a redução desta micotoxina em café.

PALAVRAS-CHAVE: ocratoxina A, *Coffea canephora*, CLAE/DFL.

EVALUATION OF OCHRATOXIN A IN CANEPHORA COFFEE PRODUCED IN RONDONIA AND ESPÍRITO SANTO

ABSTRACT: The objective of this study was to determine ochratoxin A (OTA) in canephorus coffee. The OTA analysis was performed on 106 samples of green coffee coming from the states of Rondônia (N = 96) and Espírito Santo (N = 23), using immunoaffinity columns and quantification by high performance liquid chromatography with fluorescence detection (HPLC / FLD). Among the 106 green coffee samples analyzed, 93% showed the presence of OTA. The high incidence of this fungal metabolite in positives samples was in the range from 0.02 to 84.1 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ and the average concentration of OTA in these samples was 6.02 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$. The OTA contamination in the samples from both states can be a route of exposure of this metabolite to consumers due to frequent and prolonged consumption of coffee drink by the Brazilian population. This clearly indicates that mitigation strategies should be adopted to reduce this mycotoxins in coffee.

KEYWORDS: ochratoxin A, *Coffea canephora*, HPLC/FLD.

INTRODUÇÃO

O café é uma das bebidas mais consumidas em todo mundo (BELITZ et al., 2009), e o Brasil é o principal produtor e exportador com uma produção de cerca de 46 milhões de sacas de café, e tendo uma exportação média de 36 milhões de sacas em 2014. Assim, o Brasil é responsável por mais de um terço de toda a produção mundial de café, 3,7 vezes mais do que a Colômbia, o terceiro maior produtor, segundo dados da ABIC (ABIC, 2015).

Existem quase cem espécies de café no mundo, mas entre elas duas se destacam como as mais comercializadas, *Coffea arábica* (café arábica), responsável por cerca de 75% da produção mundial, e *Coffea canéfora* (café robusta) que responde pelos outros 25%. Estas espécies possuem características físico-químicas bem diferenciadas, que produzem bebidas com características sensoriais bastante distintas (CLARKE, 1987).

O Brasil destaca-se na produção e consumo mundial de café arábica e robusta. Ultimamente a produção e o consumo do café canéfora tem aumentado, sendo os estados de Rondônia e Espírito Santo, os protagonistas nacionais de produção deste tipo de grãos.

Não obstante a preocupação com a produção do café ser uma constante, a sua qualidade pode trazer sérios prejuízos às divisas geradas por essa *commoditie*. Um dos grandes problemas para a qualidade do café é a sua contaminação por micotoxinas. Nesse sentido, vários autores destacam a sua colonização por fungos micotoxigênicos (CAMPOS et al, 2009; BATISTA & CHALFOUN, 2007; CHALFOUN & BATISTA, 2006; BATISTA et al., 2003), principalmente os produtores de ocratoxina A (OTA). A OTA (CAMPOS et al, 2009), uma micotoxina nefrotóxica e nefrocarcinogênica, é relatada como sendo a micotoxina mais frequentemente encontrada em café (EFSA, 2006; 2008). A OTA é produzida

por três diferentes táxons de fungos. Diversos são os fatores responsáveis pela produção de ocratoxina A em grãos de café, podendo ser citadas as condições ambientais como umidade e temperatura, tanto quanto os fatores intrínsecos, como a atividade de água (ESTEBAN et al., 2006; CAMPOS et al, 2009). O potencial de produção de OTA dependerá não apenas dessas condições isoladas, como também da interação de todos esses fatores associados a uma contaminação externa (MORAES & LUCHESE, 2003).

Estratégias eficientes de controle da presença de OTA em café devem ser adotadas, por representarem entraves na comercialização desse produto e também por colocarem em risco a saúde dos consumidores. Nesse sentido, os mercados importadores estão cada vez mais exigentes, reduzindo os níveis de tolerância de OTA (COMUNIDADE EUROPÉIA, 2005).

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

As amostras de café verde foram coletadas diretamente de produtores cadastrados ou de cooperativas. Foi coletado um total de 106 amostras sendo 96 provenientes de Rondônia e 23 do Espírito Santo.

Solventes, padrão e água

O padrão de ocratoxina A utilizado foi fabricado pela Sigma Aldrich Corp. (St. Louis, MO, USA). Os solventes orgânicos acetonitrila e metanol e o ácido acético foram adquiridos da Tedia Inc. (Fairfield, OH, USA). O sal bicarbonato de sódio foi produzido pela F. Maia (Cotia, SP, BR). A água ultrapura utilizada nestes ensaios foi produzida em nosso laboratório no sistema Millipore Advantage A10 (Rios™/Milli Q).

Análise de ocratoxina A

A metodologia utilizada neste estudo baseia-se na IN 09 do MAPA (BRASIL, 2000). Este método emprega a extração da ocratoxina A (OTA) com solução de metanol: bicarbonato de sódio, purificação do extrato obtido por coluna de imunoafinidade e a detecção e quantificação de OTA por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção por fluorescência (DFL).

Extração: Cerca de 25,0g da amostra de café moída (homogênea) é extraída com 100 mL da solução de bicarbonato de sódio 3% e 100 mL de metanol, em recipiente de vidraria específica do dispersor de alta rotação Omni Mixer®, por 5 minutos a 800rpm. A mistura é filtrada à vácuo em filtro de vidro sinterizado Millipore usando papel de filtro de filtração rápida e depois em outras duas diferentes membranas: de fibra de vidro GF/B 1µm e de teflon 0,45µm. Retira-se uma alíquota de 4,0 mL do filtrado para um erlenmeyer de 250 mL, adiciona-se 96 mL de solução tampão fosfato homogeneizando manualmente a solução.

Purificação da ocratoxina A: adapta-se uma seringa de polipropileno à coluna de imunoafinidade OchraTest® da Vicam utilizando um adaptador e instalando o conjunto no manifold com saída para vácuo. Transfere-se quantitativamente o conteúdo do erlenmeyer para a coluna, deixar passar através desta com fluxo de 2 a 3 mL/min. Após lavagem com 10 mL de água ultrapura, adiciona-se 4mL de metanol grau HPLC usando a seringa. Eluir a ocratoxina A para um frasco âmbar de 8 mL com o fluxo de 2 a 3 mL/min. Evaporar o eluato até a completa secura, sob atmosfera de nitrogênio, em banho-maria a 40°C e ressuspender o eluato em 300µl de fase móvel para aplicação no sistema CLAE/DFL.

Quantificação de Ocratoxina A

Preparo das soluções padrão: preparar as soluções estoque e de trabalho de ocratoxina A, e a partir destas soluções, preparar uma curva padrão de cinco pontos com as seguintes concentrações: 1,0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10 µg/L.

Sistema de CLAE/FLD: O sistema cromatográfico LC-20 utilizado neste estudo foi fabricado pela Shimadzu Corp. Ele é composto por uma bomba binária (LC-20AT), amostrador (SIL-20AC), controlador (CBM-20A), detector de fluorescência (RF-20A) e o software de aquisição e tratamento de dados LC Solution.

Condições Cromatográficas:

Fase móvel: Água (29): ACN (35): MeOH (35):Ác. Acético (1)

Fluxo: 0,8mL

Coluna: X Terra® RP18, 5µm, 4,6x250mm

Detector: Fluorescência. Excitação: 333; Emissão: 476

Volume de injeção: 20µL

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O método usado para determinação de OTA foi considerado adequado para ser usado na matriz café verde. Todas as etapas da metodologia foram cuidadosamente avaliadas visando a melhoria do desempenho da análise. A partir das curvas analíticas, a linearidade do método foi verificada dentro da faixa de trabalho correspondente ao intervalo de concentrações de OTA usadas na composição da curva analítica. A curva analítica obtida para a ocratoxina A no sistema CLAE/DFL se encontra na Figura 1. Neste estudo, as quantificações de OTA nas amostras foram feitas por

padronização externa e utilizando a curva analítica com 5 pontos, em triplicata, com a concentração variando de 1,0 a 10,00µg/L.

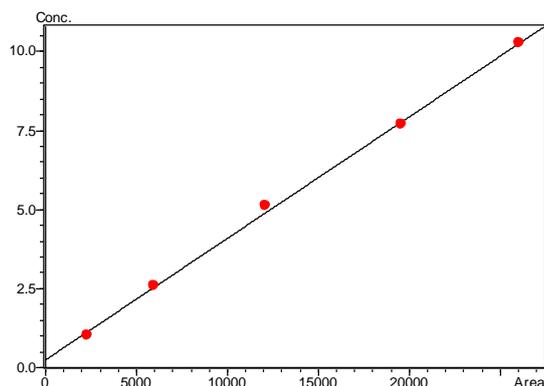


Figura 1: Curva analítica de ocratoxina A no sistema CLAE/DFL. Esta curva foi construída com injeção das soluções padrão de OTA em quintuplicata. Cada ponto mostrado na curva representa a média das 5 replicatas.

O coeficiente de correlação (R^2) da curva analítica obtido foi de 0,998 que é superior ao recomendado pela SANCO (2014). Os ensaios de recuperação de ocratoxina A na matriz café verde foram feitos em triplicata e em dois níveis de contaminação. A percentagem média de recuperação foi de 88% que está dentro dos limites preconizados pela DG SANCO (2014). Foram realizados ensaios para se avaliar possíveis interferências da matriz café na análise de OTA. Para isso, uma curva de adição na matriz em três replicatas foi aplicada no sistema cromatográfico. Não foi observado grandes discrepância destes resultados com a curva de OTA feita em solvente. No entanto, para melhorar o desempenho da análise, decidiu-se por efetuar as quantificações usando uma curva de adição na matriz. A Figura 2 exposta abaixo ilustra os cromatogramas obtidos para a ocratoxina A quando analisada em solvente, na matriz fortificada e em uma amostra real.

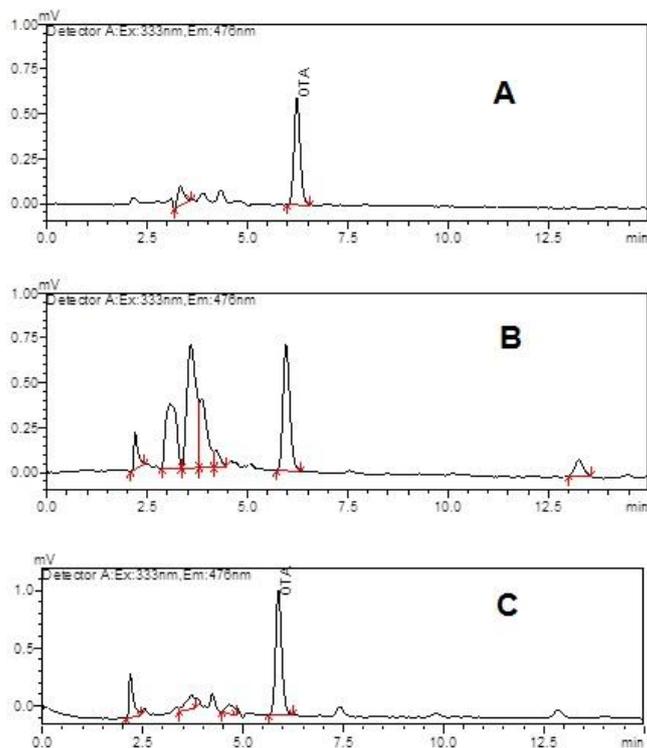


Figura 2: Cromatogramas de OTA obtidos no sistema CLAE/DFL: A) padrão OTA em solvente; B) padrão de OTA em matriz+solvente; C) OTA em amostra de café verde

Dentre as 106 amostras de café verde analisadas provenientes de RO e de ES, 93% evidenciaram a presença de ocratoxina A. Esta forte incidência de OTA nas amostras positivadas ficou na faixa de 0,02 a 84,1 µg.Kg⁻¹, e a concentração média de OTA nestas amostras foi de 6,02 µg.Kg⁻¹.

A legislação brasileira (BRASIL, 2011) estabelece o limite máximo tolerável (LMT) para café torrado e solúvel de 10 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ para a ocratoxina A. Assim, considerando que não há LMT específico para o café verde na legislação, utilizamos o que está descrito para o café torrado. Nas amostras analisadas, observamos que 12% apresentaram concentração de OTA acima do limite de 10 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$. A distribuição de ocratoxina A nas amostras de café verde avaliadas neste estudo se encontram na Tabela 1.

Tabela 1: Distribuição de OTA nas 106 amostras de café verde.

Faixa de Concentração de OTA ($\mu\text{g.Kg}^{-1}$)	Nº de amostras de café avaliadas
0 - 5	92
5 - 10	1
> 10	13

CONCLUSÕES

O método adaptado utilizado para análise de ocratoxina A em café verde, estabelecido neste estudo, demonstrou boa recuperação deste analito nesta matriz, além de uma execução facilitada e rápida, comprovando ser bastante adequado para monitorar a presença deste contaminante nestas amostras. A purificação dos extratos utilizando colunas de imunoafinidade e posterior análise por CLAE/DFL demonstrou ser bastante conveniente. A utilização deste sistema cromatográfico permitiu a separação dos extratos das amostras e a obtenção de limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) apropriados para quantificação de OTA dentro de faixas de concentração bem baixas.

Dentre as 106 amostras de café verde analisadas, a incidência de OTA foi de 93%. A concentração média de ocratoxina A observada foi de 6,02 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$, o que está dentro dos padrões (LMT) definidos pela legislação (BRASIL, 2011) para o café torrado que é de 10 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$. Porém, cabe ressaltar que 12 % das amostras avaliadas estavam fora dos padrões estabelecidos, ou seja, apresentavam concentrações de OTA maiores que o LMT.

Os resultados apresentados evidenciaram a elevada incidência de OTA em café canéfora. Em alguns casos, os níveis detectados de OTA ultrapassaram em até oito vezes o limite máximo tolerável pela legislação brasileira. Muito embora a OTA seja uma micotoxina que é degradada parcialmente durante a torra, estudos devem ser priorizados para a prevenção da formação deste metabólito fúngico. A contaminação de café por OTA nas amostras de ambos os estados pode representar uma via de exposição deste metabólito para os consumidores brasileiros devido ao consumo frequente e prolongado da bebida café em nosso país. Isto indica claramente que estratégias de mitigação devem ser adotadas para a redução desta micotoxina em café.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIC - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ. *Produção Mundial - Principais Países Produtores*. Disponível em: <http://www.abic.com.br/publicue/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=48>. Acesso em: 09/04/2015.
- BELITZ, H.-D., GROSCH, W., SCHIEBERLE, P. *Food Chemistry* (4^o ed.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2009
- BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Instrução Normativa Nº 9 de 24 de março de 2000. Diário Oficial da União, Brasília, n.62, 30 de março de 2000. Seção I, p.37.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *RDC Nº 7 / 2011*. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 18 de fevereiro de 2011. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 12 de dezembro de 2012.
- CLARKE, R.J. Grading, storage, pre-treatments and blending. In: Clarke, R.J.; Macrae R. (Eds). *Coffee Technology*. London: Elsevier Applied Science, vol. 2, 1987, p. 35–58.
- BATISTA, L. R.; CHALFOUN, S. M. Incidência de ocratoxina A em diferentes frações do café (*Coffea arabica* L.): bóia, mistura e varrição após secagem em terreiros de terra, asfalto e cimento. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 31, n. 3, p. 804-813, 2007.
- BATISTA, L. R.; CHALFOUN, S. M.; PRADO, G.; SCHWAN, R. F.; WHEALS, A. E. Toxigenic fungi associated processed (green) coffee beans (*Coffea arabica* L.). *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v. 83, p. 293-300, 2003.
- CAMPOS, R. S. et al. Fungos micotoxigênicos e ocratoxina a em cafés com permanência prolongada na planta e no solo, colhidos nas regiões do cerrado mineiro e baiano. *Coffee Science*, v. 4, n. 2, p. 136-148, Dez. 2009.
- CHALFOUN, S. M.; BATISTA, L. R. incidência de ocratoxina a em diferentes frações de grãos de café (*Coffea arabica* L.). *Coffee Science*, Lavras, v. 1, n. 1, p. 28-35, 2006.
- COMUNIDADE EUROPEIA. Regulamento (CE) Nº 123/ 2005, de 26 de Janeiro de 2005. Jornal Oficial [da] União Européia, Bruxelas, 28 jan. 2005. série L, n. 25. Disponível em: Acesso em: 19 out. 2014.
- ESTEBAN, A.; ABARCA, M. L.; BRAGULAT, M. R.; CABAÑES, F. J. Study of the effect of water activity and temperature on ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius*. *Food Microbiology*, London, v. 23, p. 634- 640, 2006

EFSA. EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Opinion of the scientific panel on contaminants in food chain on a request from the commission related to ochratoxin A (OTA) as undesirable substance in animal feed. The EFSA Journal, v. 101, p. 1-36, 2004. Disponível em: Acesso em: 19 out. 2008.

EFSA. EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the Commission related to ochratoxin A in food. The EFSA Journal, v. 365, p. 1-56, 2006.

MORAES, M. H. P. de; LUCHESE, R. H. Ochratoxin A on green coffee: influence of harvest and drying processing procedures. Journal Agriculture Food Chemistry, Easton, v. 51, p. 5824-5828, 2003.

SANCO, EUROPEAN UNION COMMISSION, Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. Document N° SANCO/12571/2013, 01/01/2014.