

COMPARAÇÃO DE MÉTODOS DE ANÁLISE PARA OCRATOXINA A NO CAFÉ: UMA REVISÃO.

Comparison of methods of analysis for ochratoxin A in coffee: a review

Thais Matsue Uekane^{1*}; Raquel Duarte da Costa Cunha Bandeira²; Márcia Cristina Silva¹.

¹Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro, *campus* Rio de Janeiro, RJ.

²Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, *campus* Seropédica, RJ.

*email: thais.uekane@gmail.com

RESUMO

A ocratoxina A (OTA) é um metabólito produzido por fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* considerado nefrotóxico, teratogênico e imunotóxico. O café é um produto importante para a economia brasileira, mas devido aos baixos limites permitidos de OTA, técnicas sensíveis de análise são necessárias. O objetivo deste trabalho é estabelecer uma revisão bibliográfica para comparar métodos de análise de OTA existentes, a fim de gerar subsídios técnicos para possíveis inovações na análise de OTA no café.

Palavras-chave: micotoxinas; café; cromatografia líquida.

ABSTRACT

Ochratoxin A (OTA) is a metabolite produced by fungi of the *Aspergillus* and *Penicillium* genus and considered nephrotoxic, teratogen and immunotoxic. Coffee is an important product for Brazil's economy, but due to the low limits permitted more sensible techniques are necessary. The aim of this study is to do a review in the literature to compare analytical methods of OTA to generate subsidies for possible innovations in the analysis of OTA in coffee.

Keywords: mycotoxins; coffee; liquid chromatography.

INTRODUÇÃO

As micotoxinas são toxinas produzidas pelo metabolismo secundário de fungos que ocorrem nos alimentos e rações, produzidas sob condições ambientais específicas, no campo, no período pós-colheita, durante armazenamento, processamento e distribuição. Estima-se que 25% da produção mundial de alimentos e 20% da produção europeia podem estar contaminadas com micotoxinas, gerando perdas na produção agrária, custos veterinários, de saúde e regulatórios (ALMEIDA *et al.*, 2007; BANDEIRA, 2005; BATISTA *et al.*, 2001).

Os efeitos tóxicos das micotoxinas vão desde afecções renais e do fígado, toxicidade aguda podendo chegar à morte, redução da produção de leite e ovos, supressão da função imune, resistência reduzida a infecções, câncer e outras doenças crônicas, além de mutagenicidade e teratogenicidade (BAYMAN & BAKER, 2006).

As micotoxinas representam uma fonte de preocupação nos alimentos, devido ao risco potencial em humanos e animais, causado pela contaminação direta nos alimentos ou indireta, através de tecidos animais, leite e ovos. Estudo recente, realizado no Brasil, em relação à incidência de micotoxina, observou que a aflatoxina é mais encontrada nos seguintes produtos: amendoim, paçoca, milho, trigo, leite em pó, queijo, ovo, farinha, algodão, carnes e rações. A fumonisina também foi encontrada em milho e seus produtos; a patulina, em frutas e seus sucos e a ocratoxina A em cereais e seus subprodutos, milho, vinho, suco de uva, passas, cerveja, frutas secas, cacau, temperos, produtos animais e no café; as fontes de exposição dietética para adultos e crianças, podendo ser detectada em fluidos biológicos como leite humano e plasma (ALMEIDA *et al.*, 2007; BANDEIRA, 2005; BATISTA *et al.*, 2001; BECKER *et al.*, 1998; BLANC *et al.*, 1998; BRASIL, 1999; BULLERMAN, 2003; CARVALHO, 2006; CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, 2006; COMMISSION REGULATION, 2005; FAO/WHO/UNEP, 1999; FERNANDES *et al.*, 2001).

Entre as ocratoxinas e análogos que compõem o grupo, já foram relatadas a ocorrência de ocratoxina A, B e C (FUJII *et al.*, 2002; FUJII *et al.*, 2007). A ocratoxina A destaca-se pela maior toxicidade e ocorrência natural em produtos vegetais e animais. Na Figura 1 encontram-se as estruturas das ocratoxina A, B e C (ALMEIDA *et al.*, 2007; BANDEIRA, 2005; BULLERMAN, 2003; FUJII *et al.*, 2002; FURLANI & SOARES, 1999; FURLANI, 1998).

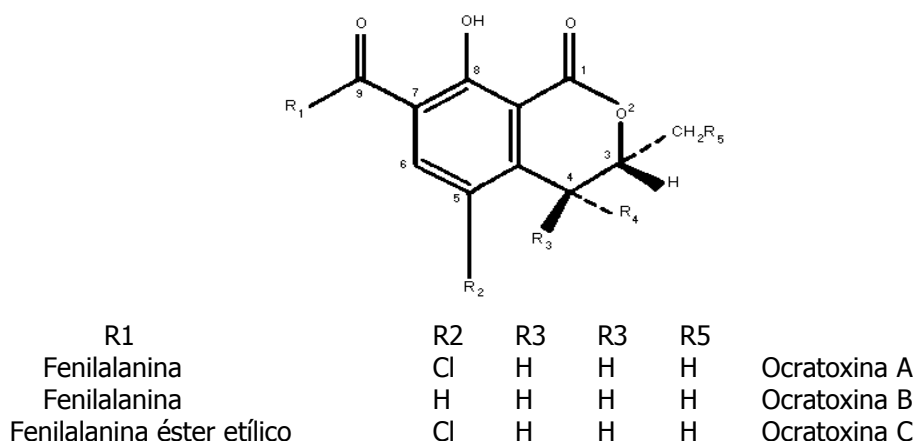


Figura 1. Estrutura da Ocratoxina A, B e C. (FUJII *et al.*, 2002)

A ocratoxina A (OTA) é um metabólito secundário produzido por fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium*. As principais espécies de fungos *Aspergillus* produtores de OTA no café são *A. ochraceus*, *A. carbonarius*, *A. niger* e mais recentemente identificado o *A. westerdijkiae*, que anteriormente era identificado como *A. Ochraceus* (GILBERT & ANKLAM, 2002). Dentre as espécies do gênero *Penicillium*, as produtoras de ocratoxina A são *P. brevicompactum*, *P. crustosum*, *P. olsonii* e *P. oxalicum* sendo a principal *P. Verrucosum* (GOLLUCKE *et al.*, 2004).

A OTA é um composto nefrotóxico, possivelmente associado à nefropatia endêmica dos Balcãs, teratogênico e imunotóxico, demonstrando potencial carcinogênico para ratos e possivelmente para humanos, por atuar na inibição da síntese de proteína por competição com a fenilalanina e aumentar a peroxidação lipídica, levando a um dano celular e mitocondrial (BANDEIRA, 2005; BLANC *et al.*, 1998; BRASIL, 1999; BULLERMAN, 2003; CARVALHO, 2006; CODEX ALIMENTARIUS

COMMISSION, 2006; COMMISSION REGULATION, 2005; FAO/WHO/UNEP, 1999; FERNANDES *et al.*, 2001; FURLANI & SOARES, 1999; GONZALES-PENA *et al.*, 2006; HORWITZ & LATIMER, 2005). Quimicamente a OTA consiste em uma isocumarina, ligada através de seu grupo 7-carboxil covalentemente pelo grupamento amido à fenilalanina, possuindo polaridade média e alta estabilidade térmica (BULLERMAN, 2003).

O café pertence à família Rubiaceae e ao gênero *Coffea* L. Representa uma cultura de grande importância para o Brasil desde da época do império até os dias de hoje, sendo que as principais espécies cultivadas economicamente são *Coffea arabica* L. e *Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner, conhecidas internacionalmente como o café Arábica e Robusta. No Brasil a variedade de *C. canephora* mais cultivada é a Conillon, sendo produzidas 33,7 milhões de sacas de café beneficiado em 2007/2008. O consumo interno de café no Brasil vem crescendo, no ano de 2007 registrou o consumo de 17,1 milhões de sacas, representando um acréscimo de 4,74% em relação ao período anterior de 2006, atualmente sendo o terceiro consumidor mundial (JIAO *et al.*, 1992; KONISHI *et al.*, 2006; LAU *et al.*, 2000).

Segundo a Organização Internacional do Café (OIC), o consumo anual por habitante do Brasil foi de 5,53kg/hab/ano, em níveis semelhantes ao consumo de países como a Alemanha 5,86 kg/hab/ano; a França, 5,07 kg/hab/ano e a Itália, 5,63 kg/hab/ano, países que apresentam o maior consumo *per capita* em todo mundo (KONISHI *et al.*, 2006).

O café é um produto agrícola importante no mundo, sendo produzido em 78 países, representando grande parte dos recursos de países em desenvolvimento. Cerca de 80% desta produção é exportada aos países industrializados e parte deste café retorna aos países produtores na forma de café instantâneo e café torrado (CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, 2006; KONISHI *et al.*, 2006; LEONI *et al.*, 2001).

A presença dos compostos voláteis produzidos pela decomposição de alguns compostos fenólicos durante a torrefação; os efeitos fisiológicos e psicológicos devido a presença da cafeína e das tiobutirolactona, g-butirolactona e a g-valerolactona, que contribuem para manter um elevado nível de atenção nas ações do ser humano, são algumas das razões do sucesso deste produto (LINDENMEIER *et al.*, 2004; MAAROUFI *et al.*, 1995).

Considerando a importância econômica do café para o Brasil e a exigência internacional de padrões de qualidade, é de suma importância a existência de métodos para a determinação e quantificação da OTA devido ao risco potencial desta substância à saúde humana.

Dessa forma o objetivo principal desse trabalho foi a elaboração de uma revisão bibliográfica, baseada na literatura especializada, na qual é apresentada a comparação dos métodos de análise existentes, a fim de gerar subsídios técnicos para possíveis inovações na análise de OTA no café.

1. OCORRÊNCIA DE OCRATOXINA A NO CAFÉ.

A ocorrência de OTA em café verde tem sido muito relatada, no entanto pouco se sabe com relação às condições de contaminação e as espécies de fungos responsáveis pela produção ou sua propagação. Os fatores ambientais, as características químicas inerentes da matriz e as condições inadequadas de armazenamento de grãos são fatores que podem contribuir para o aparecimento da OTA; a secagem e as condições de torrefação podem contribuir para a propagação e controle da OTA apresentando grande preocupação em relação aos produtos de café (FAO/WHO/UNEP, 1999; LEONI *et al.*, 2001; MYCOTOXINS, 2007).

O primeiro relato de contaminação de café por OTA, foi descrito por Levi e colaboradores em 1974, em níveis de 0,2 e 360 ug/kg, em amostras visivelmente contaminadas (GONZALES-PENA *et al.*, 2006; MANTLE, 2000). Pesquisas em todo o mundo confirmaram a presença da OTA em café verde, torrado e solúvel em níveis variando de 20 a 360 ug/kg, em café verde e 3,2 a 17 ug/kg, em café torrado. Esta diferença de teores entre o café verde e torrado pode ser explicado pela redução de OTA durante o processo de torrefação relatado em alguns estudos, podendo chegar a 90% (MASOUD & KALTOFT, 2006; MICCO *et al.*, 1989). Observa-se uma maior frequência da contaminação por OTA em algumas áreas com climas semi-tropicais e temperados, entretanto nenhum país produtor está totalmente livre de contaminação, incluindo o Brasil (ALMEIDA *et al.*, 2007; CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, 2006; FURLANI, 1998).

Em 1995, STUDER-ROHR e colaboradores na Suíça analisaram amostras de café verde, onde observaram contaminação de OTA variando em níveis de 0,9 a 50 ug/kg (BLANC *et al.*, 1998). No Brasil 132 amostras de café verde, provenientes de 5 estados brasileiros, foram analisadas, observou-se que 21% das amostras estavam contaminadas em média com 7,1 ug/kg de OTA. Em outro estudo realizado em 37 amostras de café verde, destinado exclusivamente à exportação e coletadas no período de 1999/2000 e 2000/2001, mostrou que 54% das amostras não apresentaram níveis de OTA e 43% das consideradas positivas apresentaram níveis abaixo de 5 ug/kg (BRASIL, 1999; MONACI & PALMISANO, 2004).

No Japão, pesquisadores analisaram amostras de café torrado e moído vendidos no varejo e verificaram que 7% apresentaram contaminação por OTA em níveis de 3,2 a 17 ug/kg (MOREIRA *et al.*, 2000). MICCO e colaboradores relataram uma contaminação de 58% de OTA em cafés torrados italianos, armazenados em níveis de 0,2 a 15 ug/kg e observaram que a bebida preparada, a partir de grãos contaminados, apresentavam resíduos de OTA (MICCO *et al.*, 1989). No estado de Minas Gerais, PRADO e colaboradores analisaram 47 amostras de café torrado e moído no período de 1998/1999 e encontraram, em 41 amostras, níveis de OTA de 0,99 a 5,87 ug/kg (FAO/WHO/UNEP, 1999).

PITTET e colaboradores analisaram 101 amostras de café solúvel de diferentes países, onde 75% apresentaram contaminação com OTA em níveis de 0,2 a 6,5 ug/kg (PARDO *et al.*, 2004). Almeida e colaboradores, em estudo para analisar 82 amostras de café solúvel comercializadas na cidade de São Paulo, no período de Agosto a Dezembro de 2004, observaram que 98,8% apresentavam contaminação com concentrações variando de 0,17 a 6,29 ug/kg (ALMEIDA *et al.*, 2007).

TANIWAKI e colaboradores analisaram 135 amostras de café coletadas durante o período de 1999 e 2000 em quatro regiões produtoras de café do Brasil, somente 7% apresentaram níveis de OTA maiores que 5ug/kg, sendo observado que a produção desta micotoxina é influenciada pelas condições climáticas locais e o tipo de colheita. A colheita por derriça é a técnica mais utilizada no Brasil, por sua rapidez, não ocorrendo a seleção dos frutos, sendo estes colhidos em diferentes pontos de maturação, densidade e teores de umidade o que poderia influenciar a presença de OTA no café (TANIWAKI *et al.*, 2003 ; LAU *et al.*, 2000; MANTLE, 2000).

Em estudo realizado pelo Ministério da Saúde da Alemanha, por um período de 2,5 anos, com objetivo de avaliar a exposição da população aos alimentos contaminados com OTA, demonstrou-se que 5% de 6.476 alimentos analisados apresentaram níveis de maiores que 0,01 ug/kg, não representando um risco para população (BATISTA *et al.*, 2001).

Estudos para avaliar a exposição humana à OTA foram realizados em diversos países da Europa, analisando soro e plasma de seres humanos, sendo encontrados níveis de 0,02- 0,1 ng/mL possivelmente provenientes de alimentos e ambiente contaminados. O controle dessa substância é importante devido ao café torrado e solúvel ser comercializado, representando uma potencial fonte alimentar de contaminação (FURLANI, 1998; PITTET *et al.*, 1996; POHLAND *et al.*, 1992).

2. REGULAÇÃO DE OCRATOXINA A EM CAFÉ

Devido ao grande consumo de café pela população mundial e a presença de OTA na bebida obtida por métodos convencionais de preparo, estima-se que 12% do total ingerido desta micotoxina seja proveniente da ingestão deste produto. A União Européia estabelece como limite máximo permitido 5 ug/kg, para café torrado e 10 ug/kg, para café instantâneo. A Itália preconiza limite de 4 ug/kg para café verde em grãos. O Brasil ainda não possui limites específicos para esta micotoxina (CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, 2006; COMMISSION REGULATION, 2005; FAO/WHO/UNEP, 1999; PRADO *et al.*, 2000; RODRIGUA-AMAYA & SABINO, 2002).

De acordo com a União Europeia, um limite máximo permitido de 5 ug/kg no café verde significaria em uma rejeição média de aproximadamente 7% da produção mundial devido a presença de ocratoxina A, o que implicaria na economia dos países exportadores, inclusive o Brasil (BRASIL, 1999; ROMANI *et al.*, 2000).

3. ANÁLISE DE OCRATOXINA A

A natureza heterogênea da contaminação por fungos com subsequente distribuição desigual do teor de OTA faz com que uma das etapas mais importantes para sua análise seja a amostragem, devendo esta ser conduzida cuidadosamente, exigindo um número significativo de amostras e maior número de análises da mesma amostra em sequência visando minimizar a variabilidade estatística (BLANC *et al.*, 1998; CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, 2006; GONZALES-PENA *et al.*, 2006; SCOTT, 2005).

Diversos métodos foram descritos na literatura, para análise de OTA, em matrizes como cereais e seus produtos, vinho, cerveja, grãos, tempero e outros, em sua maioria são utilizadas técnicas para detecção por fluorescência. Na Figura 2 encontra-se um gráfico das técnicas de análise para OTA em alimentos encontrados na literatura, no período 1990 a 2006. A cromatografia líquida de alta eficiência, com detector de fluorescência, tem sido a técnica mais utilizadas para as diversas matrizes seguida pela cromatografia líquida de alta eficiência, acoplada à espectrometria de massas.

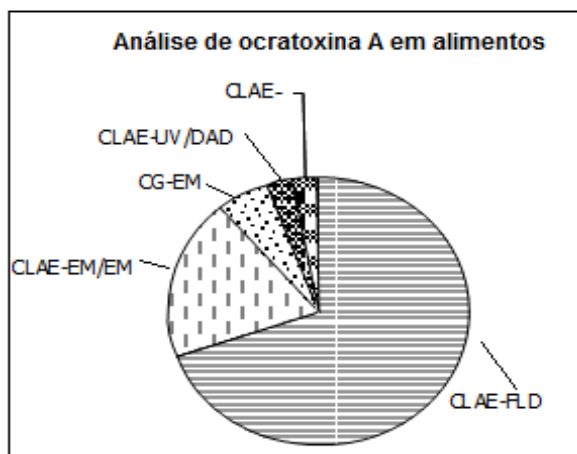


Figura 2. Técnicas de análise para OTA em alimentos.

4.1 ANÁLISE DE OCRATOXINA A EM CAFÉ

As legislações e os limites máximos que permitem a presença de OTA no café, implicam na procura por métodos precisos e sensíveis, em nível de ppb. A dificuldade na análise de extração de OTA em café ocorre devido ao fato desse analito se ligar facilmente à proteínas e DNA presentes nesta complexa matriz (ALMEIDA *et al.*, 2007; BRASIL, 1999; GONZALES-PENA *et al.*, 2006; SFORZA *et al.*, 2006). Alguns métodos existentes para análise de OTA, no café, estão resumidos na Tabela 1.

Métodos baseados em ensaios imunoenzimáticos (ELISA) demonstraram serem adequados para triagem rápida de grande número de amostras, tendo em alguns estudos a sensibilidade comparável com detecção por fluorescência, por serem simples, específico, com potencial de automação e possibilidade de uso no campo.

O desenvolvimento de anticorpos contra o complexo ocratoxina A-proteína permitiu análise em matriz de café verde, torrado e solúvel, com limite de detecção de 3,7 ug/kg, com recuperações variando de 46 a 80% para estas matrizes. A matriz pode influenciar na análise de OTA por ensaios imunoenzimáticos, por ocorrência de reações cruzadas com seus componentes, que pode ser minimizada por técnicas de preparo de amostras como diluições. No entanto, apesar dos limites de detecção do método estar de acordo com a legislação, as recuperações mínimas para OTA em café, de acordo com o *Codex Alimentarius*, é de no mínimo 80%, sendo também necessários, para a confirmação inequívoca da presença de OTA, outras técnicas analíticas, a fim de evitar resultados falsos positivos ou falsos negativos (ALMEIDA *et al.*, 2007; BULLERMAN, 2003; CARVALHO, 2006; CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, 2006).

A cromatografia em camada delgada tem sido utilizada por sua facilidade, baixo custo e robustez para detecção de OTA no café verde e torrado, entretanto possui baixa sensibilidade, uma vez que sofre influência dos interferentes de matriz, com limite de detecção de 10 a 20 ug/kg, que não atinge os limites requeridos pelas legislações de órgãos internacionais, com recuperações entre 60,5 e 85,6% (ALMEIDA *et al.*, 2007; BULLERMAN, 2003; GONZALES-PENA *et al.*, 2006).

Tabela 1. Métodos para análise de OTA no café.

Matriz	Preparo de amostra	Deteção	Referência
Café verde	0	TLC- FLD.	ALMEIDA <i>et al.</i> , 2007
Café torrado	0	Imunoensaio (ELISA).	ALMEIDA <i>et al.</i> , 2007
Café torrado	EFS + IAC.	0	ALMEIDA <i>et al.</i> , 2007
Café verde	ELL (metanol bicarbonato de sódio). IAC.	0	BRASIL, 1999
Café torrado, plasma humano.	ELL (metanol bicarbonato de sódio). IAC.	CLAE-FLD e CLAE-EMEM.	FUJII <i>et al.</i> , 2007
Café verde, torrado e instantâneo.	ELL (acetonitrila, água, clorofórmio e cloreto de sódio). IAC.	Imunoensaio competitivo direto (ELISA).	CARVALHO, 2006
Café verde	ELL (metanol e bicarbonato de sódio). IAC.	0	MONACI & PALMISANO, 2004
Café verde	ELL (metanol e bicarbonato de sódio). IAC.	0	SFORZA <i>et al.</i> , 2006
Café, trigo e cerveja	ELL (cloreto de magnésio e tolueno).	0	VAN DER STEGEN <i>et al.</i> , 2001
Café verde, cereais e passas.	ELL (metanol bicarbonato de sódio). IAC ou EFS.	CLAE-FLD.	WATSON, 1999
Café, trigo, vinho, passas	ELL (solução aquosa de carbonato de sódio). IAC.	CLAE- EMEM.	ZOLLNER & MAYER-HELM, 2006
Café verde	ELL (clorofórmio, ácido fosfórico 0,1M, solução bicarbonato). EFS (C18).	0	MYCOTOXINS
Café verde e torrado	ELL (solução aquosa de bicarbonato de sódio). EFS.	CLAE- EMEM.	ABIC

ELL -extração líquido-líquido; IAC - coluna de imunoafinidade; EFS - Extração em fase sólida; C18 - coluna octadecilsilano; TLC-FLD - Cromatografia em camada delgada com detector de fluorescência; CLAE-FLD- Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência; CLAE-EMEM Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de espectrometria de massas em linha.

Métodos baseados em cromatografia gasosa são poucos empregados em análises de rotina, uma vez que consomem muito tempo, devido à etapa e derivatização, necessária para atingir volatilidade dos analitos. Entretanto, métodos baseados em cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas podem ser utilizados com sucesso para confirmação da presença de OTA em amostras (ALMEIDA *et al.*, 2007; BATISTA *et al.*, 2001; BLANC *et al.*, 1998; FURLANI & SOARES, 1999; STUDER-ROHR *et al.*, 1995).

A cromatografia líquida de alta eficiência foi introduzida por CANTAFORA *et al.* (1983) para separar e quantificar OTA no café verde, utilizando uma extração com bicarbonato de sódio e metanol, seguida de etapa desengordurante, partição e passagem por coluna de celite, tendo sido empregado a cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência, cujo limite de detecção foi de aproximadamente 0,2 ug/kg (TANIWAKI *et al.*, 2003).

Em 1986, TERADA e colaboradores descreveram um método para análise de café verde, torrado, instantâneo em pó e café coado, utilizando extração com bicarbonato de sódio e metanol, seguida de partição e eluição por coluna de fase reversa (octadecilsilano) e cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de fluorescência, cujo limite de detecção foi de aproximadamente de 2 ug/kg para grãos de café, 5 ug/kg para café instantâneo e 0,2 ug/kg para café coado (BATISTA *et al.*, 2001; BULLERMAN, 2003; GONZALES-PENA *et al.*, 2006; TANIWAKI *et al.*, 2003).

Estudos realizados, utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência, demonstraram que esta técnica é sensível, apresentando alta resolução, cuja eficiência depende da etapa de pré-limpeza e do tipo de detector utilizado. Apesar da cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência ser sensível, pode apresentar problemas analíticos como a coeluição dos analitos com interferentes e com deslocamento do tempo de retenção, que pode gerar resultados errôneos, entretanto, esses problemas podem ser solucionados com ajuste cromatográfico adequado (ALMEIDA *et al.*, 2007; BANDEIRA, 2005; BULLERMAN, 2003; GONZALES-PENA *et al.*, 2006; TANIWAKI *et al.*, 2003; TSUBOUCHI *et al.*, 1988; VAN DER STEGEN *et al.*, 2001).

Atualmente a metodologia oficial da *Association of Official Analytical Chemists International* (AOAC) para o café verde e torrado é a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência (ALMEIDA *et al.*, 2007; VARGAS *et al.*, 2005; VEGA *et al.*, 2006). A cromatografia líquida de alta eficiência, acoplada a detecção de fluorescência, é a mais utilizada devido à fluorescência natural da OTA e facilidade de utilização (VAN DER STEGEN *et al.*, 2001; VARGAS *et al.*, 2005).

Para análise de OTA em café verde no Brasil, é utilizada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento um método baseado na extração com solventes orgânicos, purificação da toxina com coluna de imunoafinidade e a detecção e quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência (SCOTT, 2005; VENTURA *et al.*, 2003).

Para extração da amostra de café torrado podem ser utilizados água, solventes orgânicos puros ou em mistura com sais ou ácidos, levando em consideração as possíveis perdas da OTA. Para a limpeza do extrato, é comumente empregado extração líquido-líquido ou partição líquido líquido seguido de extração por fase sólida em cartuchos recheados (EFS), sendo utilizados principalmente as colunas de imunoafinidade desde sua introdução na análise de café em 1990 por NAKAJIMA, que desenvolveu técnica sensível, específica e rápida com limite de detecção de 0,5 ug/kg (GONZALES-PENA *et al.*, 2006; PARDO *et al.*, 2004; SFORZA *et al.*, 2006; WATSON, 1999; ABIC, 2008).

O café torrado é uma matriz extremamente complexa, necessitando realizar uma limpeza adequada (*clean up*) do extrato para remover substâncias como os lipídeos e pigmentos presentes que possam interferir nas técnicas analíticas, visando o alcance de limite de detecção mais baixos.

A técnica de cromatografia líquida de alta eficiência, acoplada à espectrometria de massas é considerada uma técnica de grande impacto e aplicação nas últimas décadas, pois combina a alta resolução na separação cromatográfica com sensibilidade e especificidade do espectrômetro de massas, permitindo a confirmação e elucidação estrutural da OTA, a fim de minimizar falsos positivos (ALMEIDA *et al.*, 2007; BANDEIRA, 2005; BULLERMAN, 2003; GONZALES-PENA *et al.*, 2006; TANIWAKI *et al.*, 2003; TSUBOUCHI *et al.*, 1988; VAN DER STEGEN *et al.*, 2001; ZOLLNER & MAYER-HELM, 2006).

Algumas técnicas de ionização utilizadas na espectrometria de massas são: a ionização química negativa, introdução líquida direta, termonebulização (TS), eletronebulização (ESI) e ionização química a pressão atmosférica (APCI) (ALMEIDA *et al.*, 2007; FUJII *et al.*, 2007).

As técnicas como termonebulização e introdução líquida direta, utilizadas na espectrometria de massas, apresentam desvantagens em termos de sensibilidade, robustez e dificuldade de operação.² A técnica de ionização química a pressão atmosférica (APCI) em alguns estudos, demonstrou menor sensibilidade quando comparada à técnica de eletronebulização (ESI), uma vez que nesta última a ionização é mais branda, sendo sensível e a fragmentação menos intensa, no entanto, ambas podem ser utilizadas como método confirmatório de amostras em substituição à cromatografia gasosa com espectrometria de massas (ALMEIDA *et al.*, 2007; BATISTA *et al.*, 2001). A técnica de eletronebulização (ESI) foi extensamente estudada para detecção de OTA em plasma humano e alimentos, por ser uma excelente ferramenta para elucidação estrutural e na quantificação de níveis traços dessa micotoxina (ALMEIDA *et al.*, 2007).

Métodos analíticos para determinação de micotoxinas devem ser validados para serem utilizados na implementação de legislação, monitoramento e estudos de avaliação de riscos. Para OTA alguns métodos já foram validados, entretanto, para o café torrado a validação esteve atrelada à técnica de cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência, necessitando de maiores estudos de validação com a utilização da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência, acoplada à espectrometria de massas com diferentes formas de ionização (BATISTA *et al.*, 2001; XIAO *et al.*, 1995).

Análises quantitativas por cromatografia líquida de alta eficiência, acoplada a espectrometria de massas, oferecem grande sensibilidade em uma variedade de alimentos, como por exemplo, vinho, uva, farinhas, cervejas, temperos e outros. A alta sensibilidade apresentada por esse tipo de detector não é necessária para a maioria das matrizes, entretanto para matrizes complexas como o café, facilitaria a análise devido ao aumento da sensibilidade (ALMEIDA *et al.*, 2007; BATISTA *et al.*, 2001).

CONCLUSÃO

Devido à ampla ocorrência de OTA e uma legislação rígida para a presença desta no café torrado, faz-se necessária a disponibilidade de métodos validados cada vez mais sensíveis, capazes de identificar níveis traços na matriz complexa como o café. Desta forma, a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, com diferentes formas de ionização, vem ganhando destaque, sendo necessários mais estudos no desenvolvimento, otimização e validação de método para análise de OTA no café torrado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DO CAFÉ (ABIC). Disponível em: <<http://www.abic.com.br>> Acesso em: 10 Fev. 2008.

ALMEIDA, A. P. *et al.* Ochratoxin A in Brazilian instant coffee. **Braz. J. Micro.**, **38**: 300-303, 2007.

BANDEIRA, Raquel Duarte da Costa Cunha. **Identificação de compostos voláteis de café sadio e com defeitos por cromatografia gasosa e análise multivariada**. Rio de Janeiro, 2005. Dissertação (Mestrado em Ciências). Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

BATISTA, L. R.; CHALFOUN, S. M.; PRADO, G. Ochratoxina A em grãos de café beneficiado e sua relação com o padrão da bebida. *In: Simpósio de pesquisa dos cafés do Brasil*, **2**, Vitória: 2001, v. 2.

BAYMAN, P.; BAKER, J. L. Ochratoxins: A global perspective. **Mycoph**, **162**:215-223,2006.

BECKER, M. *et al.* Column liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry for the analysis of ochratoxin. **J. Chromatogr., A**, **818**: 260-264,1998.

- BLANC, M. et al. Behavior of Ochratoxin A during Green Coffee Roasting and Soluble Coffee Manufacture. *J. Agric. Food Chem.*, **46**(2): 673-675, 1998.
- BRASIL. Decretos e Leis. **Metodologia Analítica para Determinação de Ocratoxina A por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência**, Brasília, DF. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, 1999, n. 138, 46.
- BULLERMAN, L. B. In: CABALLERO, B.; TRUGO, L. C., FINGLAS, P. (eds.) **Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition**. London: Academic Press, 2003, vol. 6, 4080.
- CARVALHO, G.R., O mercado de café em perspectiva. **Embrapa monitoramento por Satélite**, 2006.
- FAO/WHO. **Codex Alimentarius**. Joint FAO/WHO food standards programme Codex Committee on contaminants in food, 1, 2006.
- COMMISSION REGULATION. Commission Regulation (EC) n. 123/2005 of 26 January 2005 amending Regulation (EC) No 466/2001 as regards ochratoxin A. **Official Journal of European Union**, L.25/3-L.25/5.,2005.
- FAO/WHO/UNEP. **Conference Report, 3rd International Joint FAO/WHO/UNEP Conference on Mycotoxins**, 1999.
- FERNANDES, S. M. et al. Teores de polifenóis, ácido clorogênico, cafeína e proteína em café torrado. *Rev. Bras. de Agrociência*, **7**(3):, 197-199, 2001.
- FUJII, S.; ONO, E.Y.S.; HIROOKA, O E. Ochratoxina A em café: controle e metodologia analítica com ênfase a inovação no contexto de segurança alimentar. **Semina: Ciências Agrárias**, **23** (2), 273-292, 2002.
- _____. A comparison between enzyme immunoassay and HPLC for Ochratoxin A detection in green, roasted and instant coffee. **Braz. Arch. Biol. and Technol.**, **50**, 349-359, 2007.
- FURLANI, R. P. Z.; SOARES, L. M. V. Avaliação de métodos para determinação de Ochratoxina A em cafés verdes e torrados. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, **58**, 87-98, 1999.
- FURLANI, Regina Praso Zanés. **Ochratoxina A em café brasileiro**. Campinas, 1998. Campinas, SP: Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos). Faculdade de Engenharia, Universidade Estadual de Campinas.
- GILBERT, J.; ANKLAM, E. Validation of analytical methods for determining mycotoxins in foodstuffs. **Trends Analyt. Chem.**, **21**(6), 468-486, 2002.
- GOLLUCKE, A.P.B.; TANIWAKI, M.H.; TAVARES, D.Q. Survey on ochratoxin A in Brazilian green coffee destined for exports. *Ciênc. Tecn. Alim.*, **24**, 641-645, 2004.
- GONZALES-PENA, E. et al. Comparison between capillary electrophoresis and HPLC-FL for ochratoxin A quantification in wine. *Food Chem.* **97**, 349-354, 2006.
- HORWITZ, W.; LATIMER, G. W. In: HORWITZ, W.; LATIMER, G. W (eds.) **Official methods of analysis of AOAC International**. Gaithersburg: AOAC International, 2005, cap. 49, 58-65.
- JIAO, Y. et al. Identification of ochratoxin A in food samples by chemical derivatization and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. Sci.*, **595**, 364-367, 1992.
- KONISHI, Y. S. et al. The comparison of two clean-up procedures, multifunctional column and immunoaffinity column, for HPLC determination of ochratoxin A in cereals, raisins and green coffee beans. *Talanta*, **69**, 650-655, 2006.
- LAU, B. P. Y. et al. Quantitative determination of ochratoxin A by liquid chromatography/ electrospray tandem mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom.*, **35**, 23-32, 2000.
- LEONI, L. A. B. et al. Ochratoxin A in Brazilian green coffee. *Ciênc. Tecn. de. Alim.*, **21**(1), 105-107, 2001.
- LINDENMEIER, M.; SCHOEBERLE, P.; RYCHLICK, M. Quantification of ochratoxin A in foods by stable isotope dilution assay using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **1023**, 57-66, 2004.
- MAAROUFI, K. et al. Foodstuffs and human blood contamination by the mycotoxin ochratoxin A: correlation with chronic interstitial nephropathy in Tunisia. *Arch. Toxicol.*, **69**(8), 552-558, 1995.
- MANTLE, P.G. Risk assessment and the importance of ochratoxins. *Int. Biodet. Biodeg.*, **50**, 143-146, 2000.
- MASOUD, W.; KALTOFT, C. H. The effects of yeasts involved in the fermentation of *Coffea arabica* in East Africa on growth and ochratoxin A (OTA) production by *Aspergillus ochraceus*. *Int. J. Food Micro.*, **106**, 229-234, 2006.
- MICCO, C. et al. A study of the contamination by ochratoxin A of green and roasted coffee beans. *Food Addit. Contam.*, **6**, 333-339, 1989.
- MONACI, L.; PALMISANO, F. Determination of ochratoxin A in foods: state-of-the-art and analytical challenges. *Anal. Bioanal. Chem.*, **378**, 96-103, 2004.
- MOREIRA, R. F. A.; TRUGO, L. C.; DE MARIA, C. A. B. Componentes voláteis do café torrado. Parte II. Compostos alifáticos, alicíclicos e aromáticos. *Química Nova*, **23**(2), 195-203, 2000.

- MORELLO, L. G. *et al.* Detection and quantification of *Aspergillus westerdijkiae* in coffee beans based on selective amplification of beta-tubulin gene by using real-time PCR. **Int. J. Food Micro.**, **119**(3), 270-276, 2007.
- MYCOTOXINS. Disponível em: <<http://www.mycotoxins.org>> Acesso em: 10 Dez. 2007.
- PARDO, E. *et al.* Occurrence of Ochratoxigenic Fungi and Ochratoxin A in Green Coffee from Different Origins. **Food Sci. Technol Int.**, **10**, 45-50, 2004.
- PITTET, A. *et al.* Liquid chromatographic determination of ochratoxin A in pure and adulterated soluble coffee using an immunoaffinity column cleanup procedure. **J. Agric. Food Chem.**, **44**, 3564-3569, 1996.
- POHLAND, A. E.; NESHEIM, S.; FRIEDMAN, L. Ochratoxin A: a review. **Pure Appl. Chem.**, **64**(7), 1029-1046, 1992.
- PRADO, G. *et al.* Incidência de Ocratoxina A em café torrado e moído e em café solúvel consumido na cidade de Belo Horizonte, MG. **Ciênc. Tecn. Alim.**, **20**(2), 192-196, 2000.
- RODRIGUA-AMAYA, D. B.; SABINO, M. Mycotoxin research in Brazil: the last decade in review. **Braz. J. Micro.**, **33**, 1-11, 2002.
- ROMANI, S. *et al.* Screening on the occurrence of ochratoxin A in green coffee beans of different origins and types. **J. Agric. Food Chem.**, **48**, 3616-3619, 2000.
- SCOTT, P. M., Biomarkers of human exposure to ochratoxin A. **Food Addit Contam.**, **22**, 99-107, 2005.
- SFORZA, S.; DALL'ASTA, C.; MARCHELLI, R. Recent advances in mycotoxin determination in food and feed by hyphenated chromatographic techniques/Mass spectrometry. **Mass Spectrom. Reviews**, **25**, 54-76, 2006.
- STUDER-ROHR, I. *et al.* The occurrence of ochratoxin A in coffee. **Food Chem. Toxicol.**, **33**(5), 341-355, 1995.
- TANIWAKI, M. H. *et al.* The source of ochratoxin A and Brazilian coffee and its formation and relation to processing methods. **Int. J. Food Micro.**, **82**(2), 173-179, 2003.
- TSUBOUCHI, H. *et al.* Ochratoxin A found in commercial roasted coffee. **J. Agric. Food Chem.**, **36**, 540-542, 1988.
- VAN DER STEGEN, G. H. D., ESSENS, P. J. M., VAN DER LIJN, J. Effect of Roasting Conditions on Reduction of Ochratoxin A in Coffee **J. Agric. Food Chem.**, **49**(10), 4713-4715, 2001.
- VARGAS, E. A.; SANTOS, E. A.; PITTET, A. Determination of ochratoxin A in green coffee by immunoaffinity column cleanup and liquid chromatography: collaborative study. **J. AOAC Int.**, **88**(3), 773-779, 2005.
- VEGA, F.E. *et al.* *Penicillium* species endophytic in coffee plants and ochratoxin A production. **Mycologia**, **98**(1), 31-42, 2006.
- VENTURA, M. *et al.* Analysis of ochratoxin A in coffee by solid phase cleanup and narrow bore liquid chromatography- fluorescence detector mass spectrometry. **J. Agric Food Chem.**, **51**, 7564-7567, 2003.
- XIAO, H. *et al.* Synthesis and structural elucidation of analogs of ochratoxin A. **J. Agric. Food Chem.**, **43**, 524-530, 1995.
- WATSON, G. D. **Pharmaceutical Analysis**, 1st. ed., Edinburg, 1999.
- ZOLLNER, P.; MAYER-HELM, B. Trace mycotoxin analysis in complex biological and food matrices by liquid chromatography- atmospheric pressure ionisation mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, **1136**, 123-169, 2006.