

IMPLEMENTAÇÃO DE ENSAIO DE PROFICIÊNCIA PARA LABORATÓRIOS DE ANÁLISE DE OCHRATOXINA A EM CAFÉ

Eugênia A. VARGAS, Eliene A. SANTOS, Luciana de CASTRO, Regina Coeli A. FRANÇA

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA, Laboratório Nacional Agropecuário – LANAGRO/MG
Belo Horizonte/MG, tel: (31) 3250-0398, e-mail: gena@cdlnet.com.br

Resumo

Este trabalho refere-se à implementação do objetivo 4 do projeto em parceria com a FAO (Global FAO/ICO/CFC Project GCP/INT/743/CFC) “Melhoria da qualidade do café pela prevenção do crescimento fúngico” e envolve parceiros no Brasil (SGS Santos, SGS Paranaguá, EMBRAPA CTAA e MAPA), Colômbia, Uganda, Quênia, Costa do Marfim, Indonésia, Índia e França. Os principais objetivos do projeto são: contribuir para a harmonização dos procedimentos analíticos para determinação de ocratoxina A em amostras de café beneficiado entre os laboratórios que participam do projeto; garantir que os resultados analíticos obtidos pelos laboratórios atendam aos critérios de aceitabilidade internacionalmente recomendados (CEN, 1999), garantir a qualidade e confiabilidade nos dados analíticos, garantir que os resultados analíticos serão reportados de forma harmonizada e apropriada e contribuir para o estabelecimento de uma rede de laboratórios em países produtores de café. Inicialmente foram produzidos os materiais a serem utilizados: amostras de referência e solução padrão de ocratoxina A. Após a realização do teste pré-proficiência empregando amostras de referência e artificialmente contaminadas, para indicação dos ajustes necessários a serem implementados pelos laboratórios, foi enviado aos participantes o material referente à primeira rodada do ensaio de proficiência. Os resultados enviados ao MAPA serão avaliados e mais duas rodadas do ensaio de proficiência serão realizadas.

Palavras-chave: ensaio de proficiência, ocratoxina A, café beneficiado

IMPLEMENTATION OF PROFICIENCY TEST FOR OCHRATOXIN A ANALYSIS

Abstract

This work refers to the implementation of the Objective 4 of Global FAO/ICO/CFC Project GCP/INT/743/CFC “ENHANCEMENT OF COFFEE QUALITY THROUGH PREVENTION OF MOULD FORMATION”. The project involves partners in Brazil, Colombia, Uganda, Kenya, Cote D’Ivoire, Indonesia, India and France. This project has as main objectives: contribute to harmonisation of analytical procedures of the laboratories that participate in the Project on ochratoxin A in green coffee samples, ensure that the analytical results of the Laboratories participating in the Project are obtained within the criteria of acceptability (CEN, 1999), ensuring quality and reliability of the analytical data; ensure that the analytical results of the Laboratories participating in the Project are reported in a harmonised and appropriate form, contribute to the establishment of a network of laboratories in the coffee producing countries and also, it is expected that with the data obtained by analysis of the reference samples and through participation in proficiency tests a validation action can be performed. Reference materials were produce, samples and ochratoxin A standard solution, to be used in the proficiency tests. After the pre proficiency test, with reference and artificially contaminated samples and ochratoxin A standard solution, the laboratories are taking part in the proficiency test first round. The results will be analysed by MAPA and two more rounds will sent to the participants.

Key words: proficiency test, ochratoxin A, green coffee

Introdução

Alguns países têm proposto limites regulatórios para a presença de ocratoxina A em alimentos em níveis de 2 a 50 ng/g. A comissão da Comunidade Européia, considerando que a presença de ocratoxina A em alimentos e rações representa risco à saúde humana, irá determinar limites para a presença desta toxina em café beneficiado e torrado, além de planos de amostragem e critérios de desempenho de métodos, como modificação das diretivas EC nº 2002/472/CE e 2002/26/CE, respectivamente.

Este fato determina, para os países produtores de café, a necessidade de possuir laboratórios que utilizem métodos validados e planos de amostragem e possuam sistema de garantia da qualidade para avaliar se a qualidade dos cafês a serem exportados atendem aos padrões impostos pelos países importadores. Uma das formas mais adequadas para demonstrar sua competência técnica e a validade dos resultados emitidos é a participação periódica do laboratório em ensaios de proficiência. Os ensaios de proficiência são ferramentas para a contínua demonstração da capacidade do laboratório em produzir dados confiáveis.

Material e métodos

Amostras de referência de café beneficiado (naturalmente contaminadas e branco), soluções padrão de ocratoxina A e formulários para registro dos dados foram produzidos pelo MAPA e distribuídos aos laboratórios participantes para análise de ocratoxina A segundo o método disponibilizado (Vargas et al, 2002).

Fase 1 – Preparo do material de referência

As amostras de café foram selecionadas, moídas, homogeneizadas e realizada análise para avaliação inicial da contaminação. Com a contaminação adequada, o material foi exaustivamente homogeneizado e analisado quanto à homogeneidade. O material homogêneo foi empacotado à vácuo e novamente retiradas alíquotas para teste de homogeneidade. O material homogêneo empacotado foi armazenado à temperatura de congelamento.

Fase 2 - Pré proficiência

Os laboratórios receberam amostras para serem utilizadas na avaliação interna da aplicabilidade e adequação dos métodos. Foi requisitado aos laboratórios analisarem as duas amostras de café (5.15 µg/kg e 13.46 µg/kg) e a artificialmente contaminada no mesmo dia, em duplicata, seguindo exatamente o método disponibilizado.

Os resultados devem ser utilizados pelos laboratórios para os ajustes necessários nas metodologias e procedimentos, considerando os critérios de desempenho descritos na Tabela 1 (CEN, 1999).

Tabela 1 – Critérios de desempenho de método (CEN, 1999)

Micotoxina	Nível (µg/kg)	Recuperação (%)	DPR _r %	DPR _R %
Ocratoxina A	< 1	50 a 120	≤ 40	≤ 60
	1 – 10	70 a 110	≤ 20	≤ 30

DPR: desvio padrão relativo, r: repetitividade, R: reprodutibilidade

Fase 3 – Primeira rodada do ensaio de proficiência

Os Laboratórios receberam amostras cegas (de contaminação desconhecida para o laboratório), amostra branco (para ser artificialmente contaminada), solução padrão de ocratoxina A e formulários para registro dos dados.

Os resultados das fases 1 e 2 serão tratados considerando a função z-score, que pode ser mostrada em forma gráfica e é habitualmente utilizada como gráfico de controle.

A função z-score é dada pela seguinte equação:

$$z = \frac{x - \bar{x}}{\sigma}$$

Em que, x é o valor da contaminação determinada pelo Laboratório;

\bar{x} é o valor que melhor representa a verdadeira medida da aflatoxina na amostra (conforme o certificado da amostra);

σ é o desvio-padrão do valor que melhor representa a verdadeira medida da aflatoxina, sendo que o desvio-padrão (σ) é calculado como $b \bar{x}$, onde: $b = \% RSD_R / 100$

Para concentrações do analito <120 µg/kg, RSD_R é obtido da forma modificada da equação de Horwitz, onde $RSD_R = 22\%$.

A interpretação do z-score é feita conforme descrito a seguir:

Faixas	O resultado do Laboratório é considerado:
Se $ z \leq 2$	“Satisfatório”
Se $2 < z \leq 3$	“Questionável”
Se $ z > 3$	“Insatisfatório”

Resultados e Discussão

Fase 1 – Preparo do material de referência

Amostras de referência

Foram preparados 04 materiais de referência de café beneficiado, validados conforme Horwitz (1995), Thompson and Wood (1993), ISO/IEC 43 (1997), Thompson (2000) e Vargas *et al.* (2004), totalizando 780 pacotes de amostras.

A homogeneidade do material empacotado foi verificada pela análise de variância (ANOVA), de acordo com o protocolo internacional harmonizado para ensaios de proficiência em laboratórios de química analítica (International Harmonized Protocol for the Proficiency Testing of (Chemical) Analytical Laboratories) e guia ISO 43-1 - Annex A, a 95% de nível de confiança (teste de F e S_s/σ , $S_s/\sigma=15\%$). O desvio padrão (σ) utilizado na avaliação da homogeneidade do material produzido foi de 15%.

Soluções padrão

Solução padrão de ocratoxina A (~40 µg/mL in toluene-acetic acid, 99+1, v/v) foi preparada e padronizada (AOAC, D-2 AOAC Collaborative Study Protocol). Esta solução foi diluída para o preparo da solução de trabalho na concentração de 10 µg/mL, a qual foi padronizada em espectrofotômetro. Alíquota da solução de trabalho foi diluída em tolueno-ácido acético (99+1, v/v) para o preparo da solução de contaminação (1 µg/mL ochratoxin A). Esta última solução foi acondicionada em ampolas de vidro e rotuladas para envio aos participantes.

Fase 2 - Pré proficiência

Em 10 de novembro de 2004, foram encaminhados aos 10 laboratórios participantes os seguintes materiais:

- a. Duas amostras de café arábica beneficiado naturalmente contaminadas (5.15 µg/kg e 13.46 µg/kg)
- b. Uma amostra de café arábica beneficiado branco (< 0.12 µg OTA/kg) para ser contaminada artificialmente
- c. Uma ampola de solução de trabalho de ocratoxina A (1 µg/mL)
- d. Instruções adicionais aos participantes
- e. Formulários para reportagem dos resultados
- f. Formulário de recibo do material
- g. Questionário analítico
- h. Cópia do método analítico

Os participantes foram orientados a retornar o formulário de recebimento assim que os materiais fossem recebidos e em 06 de dezembro de 2004 os resultados analíticos. Estes resultados foram tratados estatisticamente e elaborado relatório enviado aos laboratórios.

Fase 3 – Primeira rodada do ensaio de proficiência

Foram enviados aos laboratórios os materiais referentes à primeira rodada do ensaio de proficiência.

Conclusões

Os dados obtidos até o momento indicam que existem dificuldades em alguns laboratórios na correta execução dos procedimentos. Os comentários e conclusões do relatório referente ao teste pré-proficiência poderão ser utilizados pelos participantes para que os ajustes finais sejam realizados nos procedimentos analíticos, antes que as análises da primeira rodada do ensaio de proficiência sejam realizadas.

A produção de materiais de referência de café beneficiado para ocratoxina A constituiu-se uma grande colaboração do projeto para o desenvolvimento de tecnologia nacional no preparo de tais materiais e disponibilizou ferramentas importantes para a adequação dos métodos e procedimentos entre os países produtores de café.

Os resultados finais do projeto servirão de base para a formação de uma rede confiável de laboratórios para análise de ocratoxina A em café nos países produtores, incentivando as exportações e melhorando a qualidade do produto no mercado.

Referências bibliográficas

- [1] VARGAS, E. A., SANTOS, E.A., PITTET, A., 2002, Collaborative Study submitted for consideration by AOAC International: *D-2 Protocol* - Determination of ochratoxin A in green coffee by immunoaffinity column clean-up and HPLC. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Laboratório de Controle de Qualidade e Segurança Alimentar - LACQSA/LAV-MG, Brasil. 28p.
- [2] 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 clean up procedure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **44**, 3564-3569.
- [3] IUPAC – International Union of Pure and Applied Chemistry, 1995, IUPAC Harmonized Protocol. *Pure and Applied Chemistry*, **67**, 331-343.
- [4] IUPAC – International Union of Pure and Applied Chemistry, 1993, International Protocol for Proficiency Testing of (Chemical) Analytical Laboratories. *Pure and Applied Chemistry*, **60**, 855-864.
- [5] ISO/IEC Guide 43-1, 1997, Proficiency testing by interlaboratory comparisons – Part 1: Development and operation of proficiency testing schemes, second edition.
- [6] THOMPSON, M., 2000, Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relations to fitness for purpose criteria in proficiency testing. *Analyst*, **125**, 385-386.
- [7] AOAC – Association of Official Analytical Chemist, 1998, Natural Toxins. *Official Methods of AOAC International*. Chapter 49, pp. 39-40. 16th edition, 4th revision. (Software Adobe and E-DOC/CJS).
- [8] ENTWISLE, A. C., WILLIAMS, A. C., MANN, P. J., RUSSEL, J., SLACK, P. T., 2001, Combined phenyl silane and immunoaffinity column clean-up with liquid chromatography for determination of ochratoxin A in roasted coffee: Collaborative study. *Journal of AOAC International*, **84**, 444-450.
- [9] CEN – European Committee for Standardization, 1999, CEN Report: Food Analysis. Biotoxins: Criteria of analytical methods of mycotoxins, Brussels. *CR 13505*:1999 E. 8p.