



INSTITUTO NACIONAL AUTÓNOMO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS

<b>Fecha de presentación</b>	Marzo del 2010
<b>Estación Experimental</b>	Santa Catalina
<b>Programa/Departamento</b>	Departamento de Nutrición y Calidad
<b>Proyecto</b>	Código: 2100527033 Proyecto de Fortalecimiento: Agroindustria, Energía y Nutrición.
<b>Componente 1</b>	Valoración de cultivos y materias primas para respaldar las certificaciones de origen, desarrollar y aplicar procesos tecnológicos agroindustriales a través de sistemas integrados de calidad, sanidad e inocuidad a lo largo de la cadena agroproductiva.
<b>Título</b>	Evaluación del contenido de Ocratoxina A en café tostado por el método de Cromatografía Líquida de Alta Resolución.
<b>Ubicación</b>	Estación Experimental Santa Catalina Cutuglagua-Pichincha
<b>Autor</b>	Egda. María José Jácome Gallardo
<b>Co-autores</b>	Dr. Iván Samaniego Quim. MS. Susana Espín
<b>Colaboradores</b>	Consejo Cafetalero Nacional COFENAC
<b>Fecha Inicio</b>	Enero del 2010
<b>Fecha Terminación</b>	Diciembre del 2010
<b>Presupuesto</b>	<b>\$12125.62</b>
<b>Fuente de Financiamiento</b>	INIAP: 67.95% APORTE TESISTA: 32.05 %

## 1 ANTECEDENTES

El Ecuador es uno de los pocos países del mundo donde se cultivan las dos variedades de café mayormente comercializadas: *Coffea arabica* (arábiga) y *Coffea canephora* (robusta). De la producción nacional, el 55% corresponde a la variedad arábica y el 45% a la robusta. Actualmente, el café es cultivado en 20 de las 24 provincias del territorio ecuatoriano y según datos proporcionados por el Instituto Nacional de Estadísticas y Censos para el año 2008 la superficie nacional plantada con café fue de 191.189 hectáreas, mientras que la superficie total cosechada fue de 168.479 hectáreas, lo que arrojó una producción total de 32.097 Toneladas métricas. De la producción anual alrededor del 10% se destina al consumo interno, doméstico e industrial; mientras que el otro 90% a la exportación, siendo Estados Unidos el mayor comprador de café ecuatoriano en grano y la Unión Europea junto con Japón los principales destinos del café industrializado (INEC, 2008; Vera, 2008).

En nuestro país la producción cafetalera es una actividad familiar realizada en pequeñas granjas en donde la producción primaria no es tecnificada y demanda un arduo trabajo manual. Ésta actividad representa la principal fuente de ingresos para aproximadamente 130.000 familias que lamentablemente se han visto afectadas con las diferentes crisis que han afectado el comercio internacional del café. Las estimaciones anteriores no consideran el número de trabajos generados por la industrialización y comercialización de los granos de café pero estadísticas indican que aproximadamente el 8% de la población depende directa o indirectamente de la producción de café (Lopez-García R., 2008).

Un diagnóstico realizado por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) determinó que las zonas productoras de café del Ecuador son vulnerables a la formación de hongos productores de Ocratoxina A y otros contaminantes, debido a sus condiciones agroecológicas y a la forma como se procesa a lo largo de todas las etapas de producción, comercialización, transporte e industrialización (FAO, 2006). Lo anterior se basa en el hecho de que los granos de café son susceptibles a contaminación por hongos en las diferentes etapas de la cadena de producción, que va desde la cosecha hasta la industrialización, sobre todo si éstos no están suficientemente secos para lograr una actividad de agua adecuada ( $a_w < 0,76$ ) o si se rehidrataron durante cualquiera de las etapas de la cadena (Pérez de Obanos A., 2005).

La Ocratoxina A (OTA), es una micotoxina nefrotóxica y nefrocarcinogénica producida por varias especies de hongos de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*, especialmente *Aspergillus niger*, *carbonarius*, *ochraceus* y *Penicillium verrucosum*. (Mounjouenpou P., 2007). El Centro Internacional de Investigaciones sobre el cáncer la ha clasificado como un agente cancerígeno clase 2B, es decir que probablemente causa cáncer. Se conoce que la OTA es bastante estable al frío ya que puede almacenarse en metanol en congelación y también es estable en calor, ya que resiste muy bien al autoclave durante 3 horas (Comisión del Codex Alimentarius, 2007).

La cadena de producción del café incluye el proceso de tostado, en el cual el grano es sometido a un tratamiento térmico a temperaturas que van desde 200 a 250 °C por 3 a 5 minutos, este proceso puede tener un efecto sobre el contenido de OTA (Suárez-Quiroz Mirna, 2005). El estudio realizado por Tsubuchi utilizando un método de Cromatografía Líquida de Alta Resolución, documentó por primera vez la presencia de OTA en granos de café tostado comercial encontrando que 5 de 68 muestras contenían entre 3,2 a 17,0 µg/kg de OTA (Tsubouchi Haruo, 1988).

Antes de 1988 se pensó que la OTA era totalmente destruida durante el tostado, pero desde entonces, numerosos trabajos han sido publicados dando resultados contradictorios; algunos autores reportaron una fuerte destrucción de OTA después del tostado, mientras que en otros reportes se informó solo una ligera reducción después del tratamiento con calor de lotes de café verde contaminados de forma natural y artificial. Estas contradicciones se atribuyeron a la variabilidad en los tipos de contaminación del café como son los diferentes tipos de tostado y la heterogeneidad en la contaminación micótica (Pérez de Obanos A., 2005).

Actualmente comisiones como la del Codex Alimentarius han establecido algunos criterios para evitar la comercialización de productos que puedan ocasionar algún tipo de perjuicio a la salud, algunas de estas medidas incluyen la fijación de límites máximos de contaminación para algunos productos, encontrándose las micotoxinas consideradas dentro de estos lineamientos. Dentro de estas medidas existen los Límites Máximos de Residuos (LRM) que son permitidos y hay que cumplirlos, para el caso del café tostado está establecido un valor de 5 µg/kg (CE, 2005).

Se conoce que en el año de 1999 se negó el ingreso de un cargamento de café procesado proveniente de Ecuador a un puerto francés debido a que su contaminación por OTA tenía niveles de 21.1 y 13.8 µg/kg. Subsecuentemente se realizó un análisis en el año 2002 y mostró que la contaminación por OTA fluctuaba entre 0.6 y 104.1 µg/kg, con un promedio de contaminación de 14.95 µg/kg (Lopez-García R., 2008).

## 2 JUSTIFICACIÓN

Estudios sobre micotoxinas tienen gran trascendencia a nivel mundial debido a los daños que éstas causan a la salud de la población así como las pérdidas económicas en la comercialización de alimentos contaminados ya que investigaciones en todo el mundo indican que las pérdidas de alimentos a causa de las micotoxinas rodean los 1.000 millones de toneladas al año.

El café es una de las bebidas más ampliamente consumidas en el mundo debido a su sabor agradable y su efecto estimulante sobre la reserva mental y física, basándose en este hecho se asume que su contribución a la ingesta diaria de OTA es relativamente alta; por lo que es de suma importancia conocer la situación del café tostado que se comercializa actualmente en nuestro país, lo que permitirá en un futuro cercano realizar controles de la presencia de esta micotoxina, logrando así proteger la salud de los consumidores y evitar graves pérdidas económicas debido a la presencia de este contaminante.

Para la determinación de los niveles de contaminación por OTA en café tostado es primordial la validación del método de análisis, lo que permitirá mediante estudios de laboratorio establecer una base de datos que demuestren científicamente que el método analítico tiene las características de trabajo adecuadas, garantizando de esta forma que el procedimiento analítico escogido es selectivo y además capaz de generar resultados confiables. Este procedimiento además permitirá que el Laboratorio LSAIA del Departamento de Nutrición y Calidad de la Estación Experimental Santa Catalina del INIAP logre la acreditación para este ensayo bajo los parámetros de la norma ISO/IEC 17025.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 GENERAL:**

Evaluar cuantitativamente el contenido de Ocratoxina A en café tostado de consumo local mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).

#### **3.2 ESPECÍFICOS:**

- Validar el método de análisis para Ocratoxina A en café tostado utilizando columnas de inmunoafinidad y Cromatografía Líquida de Alta Resolución con detector de fluorescencia.
- Determinar los niveles de Ocratoxina A presentes en muestras de café tostado adquiridas en el mercado mediante el método previamente validado y comparar el cumplimiento con los Límites Máximos de Residuos permitidos por la Unión Europea para este producto.

### **4 HIPÓTESIS**

#### **4.1 HIPÓTESIS DE LA FASE I: Validación del método.**

H<sub>0</sub>: El proceso de validación no demuestra experimentalmente los parámetros de calidad que aseguren la aptitud del método de análisis y la competencia técnica del laboratorio.

#### **4.2 HIPÓTESIS DE LA FASE II: Evaluación de la contaminación por OTA en café tostado de consumo local.**

H<sub>0</sub>: Los niveles de contaminación por Ocratoxina A en café tostado de venta en el mercado local, no cumplen el límite máximo de 5 µg/kg permitido por la Unión Europea.

### **5 MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **5.1 MATERIALES Y EQUIPOS:**

Véase Anexo I, página 18.

#### **5.2 MUESTRAS Y MATERIALES DE REFERENCIA:**

- Muestras de café tostado de diferentes marcas de venta en el mercado local.
- Materiales de referencia certificados FAPAS (Food Analysis Performance Assessment Scheme).
- Estándares certificados de OTA.

## 5.3 METODOLOGÍA:

### 5.3.1 Características del Sitio Experimental

Laboratorio de Servicio de Análisis e Investigación en Alimentos (LSAIA), Estación Experimental Santa Catalina del INIAP.

#### UBICACIÓN

**Provincia:** Pichincha  
**Cantón:** Mejía  
**Parroquia:** Cutuglagua  
**Lugar:** Estación Experimental Santa Catalina  
**Dirección:** Panamericana Sur Km 1

#### SITUACIÓN GEOGRÁFICA<sup>1</sup>

**Altitud:** 3058 m  
**Latitud:** 00°22'S  
**Longitud:** 78°33'W  
**Temperatura Promedio:** 11.6°C  
**Tipo de Clima:** Templado-Húmedo

### 5.3.2 Método de Análisis

Los análisis de laboratorio se realizarán tomando como referencia el Método Oficial AOAC 2004.10 que corresponde a la determinación de Ocratoxina A en café verde mediante columnas de inmovilización de anticuerpos y Cromatografía Líquida, el mismo que será adaptado y validado para utilizarlo en café tostado.

### 5.3.3 Procedimiento

La investigación se realizará en dos fases:

**Fase I:** Validación del método de análisis de Ocratoxina A en café tostado utilizando columnas de inmovilización de anticuerpos y Cromatografía Líquida de Alta Resolución.

**Fase II:** Evaluación de los niveles de contaminación por OTA en muestras de café tostado comercial disponibles en el mercado local.

#### **FASE I: Validación del método de análisis de Ocratoxina A en café tostado utilizando columnas de inmovilización de anticuerpos y Cromatografía Líquida de Alta Resolución.**

Para la validación del método de análisis de Ocratoxina A en café tostado mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución con detector de fluorescencia se trabajará con estándares certificados de Ocratoxina A y muestras de referencia de café tostado

---

<sup>1</sup> Documento de difusión del Instituto Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), Estación Experimental Santa Catalina: "Tecnología para la Seguridad, la Soberanía Alimentaria y el Desarrollo Agrícola de la Región Interandina". 1961-2008. p.3.

contaminado artificialmente con OTA para establecer un conjunto de parámetros de calidad que aseguren el proceso de adaptación y validación de la metodología.

Se establecerán los siguientes parámetros:

**a. Rango Lineal y Linealidad**

Rango lineal es el rango de concentraciones que va desde la concentración más pequeña a la que se pueden realizar mediciones cuantitativas (LOQ) hasta la concentración a la que la curva de calibrado se desvía de la linealidad (limite de linealidad, LOL) (Sookg, 2001).

La linealidad es la capacidad de un instrumento para dar una respuesta lineal dentro de todo su alcance de medición nominal (FAO, 2006).

La linealidad del método se evaluará relacionando la función de respuesta del equipo con la concentración de estándares certificados de Ocratoxina A, mediante el siguiente esquema (ASECAL, 2008):

Concentración Estándar	Respuesta del equipo				
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
P <sub>1</sub>					
P <sub>2</sub>					
P <sub>3</sub>					
P <sub>4</sub>					
P <sub>5</sub>					

Con los resultados obtenidos se realizará el estudio de regresión lineal, evaluando los siguientes parámetros (Purifluidos y Waters, 2008):

- Coeficiente de correlación (r):

$$r = \frac{\sum xy - \sum x \sum y / n}{\left[ \sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n} \right]^{1/2} \left[ \sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n} \right]^{1/2}}$$

- Pendiente (m):

$$m = \frac{\sum xy - \sum x \sum y / n}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}} = \frac{S_{yx}}{S_{xx}}$$

- Intercepto(L):

$$L = \frac{\sum y - m \sum x}{n} = y - mx$$

- Desviación de la pendiente (Sm):

$$Sm = \frac{\sqrt{S^2_{yx}}}{\sqrt{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}} = \frac{S_{yx}}{\sqrt{S_{xx}}}$$

- Desviación del intercepto (SL):

$$SL = \sqrt{Sm^2 \frac{\sum x^2}{n}} = Sm \sqrt{\frac{\sum x^2}{n}}$$

- Error Típico( $S_{y,x}$ ):

$$S_{y,x} = \sqrt{\frac{\sum (y - \hat{y})^2}{n-2}}$$

- Límite de confianza de la pendiente:

$$m: m \pm t. Sm$$

- Límite de confianza del intercepto:

$$L: L \pm t. SL$$

Se aceptará curvas de calibración con un  $r^2 \geq 0,995$ , se establecerá los límites de confianza para el intercepto y la pendiente mediante t- students al 95% de confianza para n-2 grados de libertad, los mismos que servirán como controles de calidad del método una vez validado. Se utilizará el valor de  $S_{y,x}$  para la estimación de la incertidumbre por curva de calibración como contribución a la incertidumbre total del método.

#### **b. Límite de Detección**

Llamada también "cantidad mínima detectable" (LOD), es la concentración más baja del compuesto en estudio que es posible detectar (no cuantificar) con certeza. Esta es la concentración que proporciona una relación señal-ruido igual a tres (Purifluidos y Waters, 2008).

Utilizando el estudio de regresión lineal, se evaluará el límite de detección con la siguiente relación:

$$LD = 3 L/m$$

En donde:  $L$  = intercepto  
 $m$  = pendiente

#### **c. Límite de cuantificación**

Es la concentración más baja de un analito que puede ser determinado con precisión y exactitud aceptables (LOQ), bajo las condiciones operacionales establecidas para el método. Esta concentración es proporcional a una respuesta, que después de haber aplicado el método completo, es igual a la media de la respuesta del blanco (ruido) más diez desviaciones estándar (Purifluidos y Waters, 2008).

Utilizando el estudio de regresión lineal, se evaluará el límite de cuantificación con la siguiente relación:

$$LC = 6 L / m$$

En donde:  $L$  = intercepto  
 $m$  = pendiente

**d. Precisión (Repetibilidad y Reproducibilidad)**

Se define como el grado de concordancia entre réplicas de mediciones de la misma cantidad. Es decir, es la repetibilidad de un resultado. La precisión mide además el error aleatorio de un análisis. Los parámetros usados para medir la precisión son: repetibilidad y reproducibilidad (Purifluidos y Waters, 2008).

El estudio de repetibilidad y reproducibilidad se realizará utilizando muestras artificialmente contaminadas con OTA, mediante el siguiente esquema:

Nivel	Repeticiones	Respuestas				
		Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
P <sub>1</sub>	R <sub>1</sub>					
	R <sub>2</sub>					
	R <sub>3</sub>					
P <sub>2</sub>	R <sub>1</sub>					
	R <sub>2</sub>					
	R <sub>3</sub>					
P <sub>3</sub>	R <sub>1</sub>					
	R <sub>2</sub>					
	R <sub>3</sub>					

**Nota:** Se analizará un material de referencia certificado (MCR) de café tostado.

Mediante estos resultados se realizará un análisis de varianza y se evaluará la desviación estándar de la repetibilidad  $S_r$  y la desviación estándar de la reproducibilidad  $S_R$ .

El análisis de varianza se realizará mediante el siguiente esquema (ASECAL, 2008):

Análisis simple de la varianza			
Origen de la varianza	Grados de libertad (v)	Suma de diferencias cuadráticas (SDC)	Diferencias cuadráticas medias (DMC=SDC/v)
Entre niveles (Between)	$v_1 = k - 1$	$SDC_B = \sum_{i=1}^k p(\bar{x}_i - \bar{x})^2$	$DCM_B = \frac{SDC_B}{k - 1}$
Dentro de niveles (Within)	$v_2 = n - k$	$SDC_W = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^p (x_{ij} - \bar{x}_i)^2$	$DCM_W = \frac{SDC_W}{n - k}$
Total	$v = n - 1$ $= (v_1 + v_2)$	$SDC_T = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^p (x_{ij} - \bar{x})^2$ $= (SDC_B + SDC_W)$	$DCM_T = \frac{SDC_T}{n - 1}$

Las diferencias cuadráticas medias (DMC) son las respectivas varianzas.

Se evaluará el valor estimado de  $F$  el mismo que será comparado con el correspondiente valor de  $F$  tabulado:



$$\hat{F} = \frac{DCM_B}{DCM_W}$$

La desviación estándar de repetibilidad ( $S_r$ ) se calcula con la siguiente ecuación:

$$S_r = \sqrt{DCM_W}$$

Utilizando la  $S_r$  se calculará la desviación estándar relativa de repetibilidad  $RSD_r$ :

$$RSD_r = \left( \frac{S_r}{\bar{x}} \right) \times 100$$

Se aceptará valores de  $RSD_r \leq 20\%$ , de acuerdo a criterios expuestos en el Diario Oficial de las Comunidades Europeas para métodos de análisis de control de OTA (CE, 2006) (Véase Anexo IV, página 21).

La desviación estándar de reproducibilidad ( $S_R$ ) es:

$$S_R = \sqrt{S_r^2 + S_L^2}$$

Donde:

$$S_L^2 = \frac{DCM_B - DCM_W}{P}$$

Siendo el denominador ( $P$ ) igual al número de observaciones que se realizan cada día en cada nivel (ASECAL, 2008).

Por lo tanto:

$$P = 3$$

Utilizando  $S_R$  se calculará la desviación estándar relativa de reproducibilidad  $RSD_R$ :

$$RSD_R = \left( S_R / \bar{x} \right) \times 100$$

La  $RSD_R$  se evaluará de acuerdo a la ecuación de Horwitz:

$$RSD_R = 2 \left( 1 - 0.5 \log C \right)$$

En donde  $C$  es la tasa de concentración (es decir, 1=100g/100g, 0,001=1000mg/kg).

Se aceptará valores de  $RSD_R \leq 30\%$ , de acuerdo a la ecuación de Horwitz, que relaciona los valores de  $RSD_R$  con el nivel de la tasa de concentración en la que se va a evaluar el analito (rango de 1 a 10 ppb) (ASECAL, 2008).

#### e. Exactitud

Es el grado de concordancia entre el valor medido y el valor real. Dado que es difícil establecer un valor absoluto verdadero, se puede definir exactitud como la concordancia entre el valor medido y el valor real aceptado. Se mide como el

porcentaje de recuperación del analito que es recuperado en un ensayo, mediante el uso de muestras "spike", o muestras a las que se les adiciona cantidades conocidas del compuesto en estudio, y que después de aplicado el método permiten presentar resultados que comparen la cantidad encontrada vs. la cantidad adicionada (ASECAL, 2008).

Se calculará el porcentaje de recuperación en cada uno de los niveles expuestos en la tabla para el análisis de la repetibilidad y reproducibilidad mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{Recuperación} = \frac{C_{\text{obtenido}}}{C_{\text{esperado}}} \times 100$$

$C_{\text{obtenido}}$  es el resultado obtenido  
 $C_{\text{esperado}}$  es el valor teórico del mismo

Se aceptará valores entre el 70 y 110% de recuperación de OTA en cada nivel en muestras de café tostado artificialmente contaminadas y en el material de referencia certificado (CE, 2006)(Véase Anexo IV, página 21).

#### f. Selectividad

Es la capacidad o atributo de un método de análisis para medir y/o identificar de manera exacta los analitos de interés, de forma inequívoca, en presencia de otras sustancias que puedan estar presentes en la muestra (Purifluidos y Waters, 2008).

Normalmente este parámetro se establece bibliográficamente pues el método seleccionado cuenta con información sobre su selectividad y las interferencias que se conocen, además se está utilizando columnas de inmunoafinidad específicas con anticuerpos monoclonales específicos para OTA, que permiten separar al analito de las interferencias producidas por la matriz.

#### g. Incertidumbre

El cálculo de la incertidumbre se basará en el siguiente procedimiento (ASECAL, 2008):

- Se colocará la expresión del resultado final a obtener (Estimación de salida) en función de todas las estimaciones de entrada (incluyendo las estimaciones de las magnitudes de influencia que se consideren convenientes).

$$Y = f(x_1, \dots, \dots, x_n)$$

Estimación de Entrada + Estimación de Magnitud de Influencia (si interesa)

Nota:

Medida directa → Una sola magnitud de entrada  
Medida indirecta → Varias magnitudes de entrada

- Se aplicará la ley de propagación de las varianzas [Se expresa  $u(y)$  en función de las  $u(x_i)$  ]

$$u^2(y) = \sum_{i=1}^N c_i^2 u^2(x_i) + 2 \sum_{i=1}^{N-1} \sum_{j=i+1}^N c_i c_j u(x_i, x_j)$$

Donde:  $u(y)$  = incertidumbre típica

El cálculo de la incertidumbre asociada a cada  $x_i$ ,  $u(x_i)$ , se realizará considerando todas las contribuciones asociadas según la siguiente ecuación general:

$$u(x_i) = \left[ \sum u^2 (\text{tipo A y B}) \right]^{1/2}$$

- Se identificará y estimará otras contribuciones no consideradas.
- Se calculará la incertidumbre típica total  $u(y)_{total}$  añadiendo a  $u(y)$  las contribuciones determinadas en el paso anterior.

$$u(y)_{total} = \left[ u^2(y) + \sum \text{otras contribuciones no consideradas}^2 \right]^{1/2}$$

- Se determinará el valor del factor de cobertura  $k$ .

$$k = 2 \text{ al } 95.45 \% \text{ de confianza y } v_{ef} = \infty$$

Donde:

$$v_{ef} \rightarrow \text{N}^\circ \text{ de grados efectivos de libertad}$$

- El cálculo de  $v_{ef}$  se realizará con la siguiente fórmula:

$$v_{ef} = \frac{u_{y \text{ total}}^4}{\sum_{i=1}^N \frac{(c_{x_i}^4 u_{x_i}^4)}{V_{x_i}} + \sum_{i=1}^N \frac{(\text{otras contribuciones})^4}{v}}$$

- Según la ecuación descrita a continuación se calculará la incertidumbre asociada al resultado:

$$U = k \cdot u(y)_{total} + \sum |\text{correcciones no realizadas}|$$

Donde:  $U$  = Incertidumbre asociada al resultado

$k$  = factor de cobertura

- Finalmente se expresará el resultado de la siguiente forma:

$$y \pm U$$

Se aceptarán valores de incertidumbre inferiores al 40% del límite de cuantificación.

#### **h. VARIABLES EN ESTUDIO**

Las variables constituyen los parámetros de validación del método analítico para OTA en café tostado:

- Selectividad
- Exactitud
- Precisión: Repetibilidad y Reproducibilidad
- Límite de Detección
- Límite de Cuantificación
- Linealidad y Rango Lineal
- Incertidumbre

#### **Fase II: Evaluación de los niveles de contaminación por OTA en muestras de café tostado comercial disponibles en el mercado local.**

##### **a. Factores en estudio**

**Factor A:** Marca de café tostado comercial.

- A<sub>1</sub>: Café tostado marca 1
- A<sub>2</sub>: Café tostado comercial marca 2
- A<sub>3</sub>: Café tostado comercial marca 3
- A<sub>4</sub>: Café tostado sin marca de consumo local 4
- A<sub>5</sub>: Café tostado sin marca de consumo local 5

**Factor B:** Lote de fabricación.

- B<sub>1</sub>: Lote de fabricación 1
- B<sub>2</sub>: Lote de fabricación 2
- B<sub>3</sub>: Lote de fabricación 3

##### **b. Tratamientos**

Código	Tratamientos	Descripción
1	A <sub>1</sub> * B <sub>1</sub>	Café tostado marca 1 * Lote de fabricación 1
2	A <sub>1</sub> * B <sub>2</sub>	Café tostado marca 1 * Lote de fabricación 2
3	A <sub>1</sub> * B <sub>3</sub>	Café tostado marca 1 * Lote de fabricación 3
4	A <sub>2</sub> * B <sub>1</sub>	Café tostado marca 2 * Lote de fabricación 1
5	A <sub>2</sub> * B <sub>2</sub>	Café tostado marca 2 * Lote de fabricación 2
6	A <sub>2</sub> * B <sub>3</sub>	Café tostado marca 2 * Lote de fabricación 3
7	A <sub>3</sub> * B <sub>1</sub>	Café tostado marca 3 * Lote de fabricación 1
8	A <sub>3</sub> * B <sub>2</sub>	Café tostado marca 3 * Lote de fabricación 2
9	A <sub>3</sub> * B <sub>3</sub>	Café tostado marca 3 * Lote de fabricación 3
10	A <sub>4</sub> * B <sub>1</sub>	Café tostado sin marca de consumo local 4 * Lote de fabricación 1
11	A <sub>4</sub> * B <sub>2</sub>	Café tostado sin marca de consumo local 4 * Lote de fabricación 2
12	A <sub>4</sub> * B <sub>3</sub>	Café tostado sin marca de consumo local 4 * Lote de fabricación 3
13	A <sub>5</sub> * B <sub>1</sub>	Café tostado sin marca de consumo local 5 * Lote de fabricación 1
14	A <sub>5</sub> * B <sub>2</sub>	Café tostado sin marca de consumo local 5 * Lote de fabricación 2
15	A <sub>5</sub> * B <sub>3</sub>	Café tostado sin marca de consumo local 5 * Lote de fabricación 3

### c. Procedimiento

#### • **Diseño Experimental**

- Tipo de diseño: Se utilizará un diseño completamente al azar (DCA) en arreglo factorial AxB (5x3).
- Número de observaciones: 3 muestras de café tostado de cada lote.
- Unidad Experimental: estará constituida por 1 kg de café tostado molido tomando en cuenta lo establecido en el Diario Oficial de la Unión Europea N°401/2006 (CE, 2006).

#### • **Análisis Estadístico**

- La fuente de la ADEVA es la siguiente:

Fuente de variación	Grados de libertad
Total	44
Repeticiones (r)	2
Factor A (Marca)	4
Factor B (Lote)	2
Interacciones:	
AxB	8
Error Experimental	28

- Análisis Funcional:

Para los tratamientos e interacciones significativas se aplicará la Prueba de Tukey al 5%.

- Análisis de la Incidencia de OTA:

- o Se establecerá por el porcentaje de incidencia de OTA, mediante la siguiente expresión:

$$\% \text{ incidencia} = \frac{\text{N}^\circ \text{ muestras contaminadas}}{\text{N}^\circ \text{ total de muestras}} \times 100$$

- o Se establecerá el promedio de contaminación en las muestras que presenten incidencia de OTA mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Prom. contaminación} \left( \frac{\mu\text{g}}{\text{kg}} \right) = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n}$$

- o Se aplicará la prueba t-students para comparar el promedio de contaminación obtenido del análisis de las muestras con el valor aceptado por la Unidad Europea (5µg/kg) con un  $\alpha = 0.05$ , utilizando la siguiente expresión:

$$t_{ob} = \frac{(\bar{X} - X)}{S} \sqrt{n}$$

Donde:

$\bar{X}$  = Promedio de presencia de OTA en  $\mu\text{g}/\text{kg}$  en muestras contaminadas.

X = Valor de contaminación aceptado por la Unión Europea en  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

S = Desviación estándar.

n = número de repeticiones.

Se aplicará los siguientes criterios:

Si  $t_{obtenido} < t_{tabulado}$  no existe diferencia estadística significativa entre el promedio de contaminación y el valor referencial de la Unión Europea con un  $\alpha = 0.05$ .

Si  $t_{obtenido} > t_{tabulado}$  existe diferencia estadística significativa entre el promedio de contaminación y el valor referencial de la Unión Europea con un  $\alpha = 0.05$ .

#### d. Variables en estudio

El contenido de ocratoxina A expresado en  $\mu\text{g}$  OTA /kg de café, corresponde a la variable en estudio, la misma que será evaluada en cada uno de los niveles por triplicado.

## 6 MANEJO ESPECÍFICO DEL EXPERIMENTO

### 6.1 MUESTREO

El procedimiento de muestreo al azar se realizará a partir del mes de junio del 2010, tomándose una muestra de 1 kg de café tostado cada dos meses de tres lotes de fabricación diferentes en un supermercado de la ciudad de Quito; mientras que las muestras de café tostado sin marca se tomarán de dos centros de expendio masivo de la misma ciudad y con la misma frecuencia.

### 6.2 LUGAR DE ENSAYO

La determinación de los niveles de contaminación de Ocratoxina A se desarrollarán en el Laboratorio de Servicios Analíticos e Investigación en Alimentos (LSAIA) del Departamento de Nutrición y Calidad de la Estación Experimental Santa Catalina.

### 6.3 ANÁLISIS DE LABORATORIO

### 6.3.1 Preparación de las muestras

Las muestras de café para el análisis de OTA y los materiales de referencia se ingresarán al laboratorio, se codificará y se almacenarán en congelación a una temperatura de aproximadamente -20°C y en fundas plásticas con cierre hermético hasta el momento de realizar los análisis.

### 6.3.2 Fundamento del método seleccionado

El método seleccionado se basa en el uso de columnas de inmunoafinidad que poseen anticuerpos monoclonales específicos para OTA, tecnología que es altamente específica, sensible y rápida en relación a las tecnologías tradicionales de purificación. En este método la OTA es extraída de la muestra con soluciones de metanol con bicarbonato de sodio, la misma que es aplicada sobre la columna de inmunoafinidad que atrapa a la toxina, la columna es lavada para eliminar todas las interferencias y la OTA es recuperada de la columna con una solución de metanol, la toxina recuperada es cuantificada por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), utilizando una columna de fase reversa C18 y detector de Fluorescencia.

## 7 CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

ACTIVIDADES	MESES											
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
1. Revisión bibliográfica y elaboración del anteproyecto	x	X										
2. Aprobación del anteproyecto en el INIAP y UCE			x									
3. Fase I: Validación del método			x	x	X	X						
4. Fase II: Determinación de contaminación en muestras de café tostado						X	x	x	x	x		
5. Interpretación de los resultados								x	x	x		
6. Escritura y revisión de tesis									x	x	x	
7. Presentación informe final											x	x

## 8 PRESUPUESTO

Concepto	Unidad	Cantidad	Costo Unitario	Costo Total
Tesista	mes	12	323,85	3886,2
<b>INSUMOS Y MATERIALES</b>				
Membrana HV (Durapore) EM PVDF, 0,45 µm de poro, 47mm de diámetro, blanca lisa	Caja x 100	1	98,9	98,9

Membrana HV (Durapore) EM PVDF, 0,22 µm de poro, 25mm de diámetro, blanca lisa	Caja x 100	1	43,42	43,42
Jeringuillas de polipropileno de 10 mL	Caja x 100	1	10	10
Jeringuillas de polipropileno de 60 mL	Caja x 100	1	12	12
Columnas de inmunoafinidad para purificación de OTA OCHRAPREP	Caja x 50	4	768,18	3072,72
Gas Nitrógeno 99.9% de pureza 6 m <sup>3</sup>	Unidad	8	144,5	1156
Guantes quirúrgicos	Caja x 100	1	9	9
Guantes de caucho	Par de guantes	12	1,4	16,8
Kleenex	Cajas x 100	2	2,5	5
Papel parafilm	Rollo	1	24,99	24,99
Papel toalla	Rollo	5	1,5	7,5
Membrana de fibra de vidrio tipo APFB	Caja x 50	4	72,57	290,28
<b>REACTIVOS</b>				
Bicarbonato de sodio p.a Baker. Analyzed Reagent 35-0605	kg	1	157,4	157,4
Acetonitrilo grado HPLC Merck 1.00030.4000	L	5	18,2	91
Metanol grado HPLC marca Merck A 452-4	L	10	9,8	98
Metanol grado p.a. Emsuretm ACS,ISO,Reag.PH EUR	L	20	7,6	152
Estándar Ocratoxina A	mg	2,5	124,4	311
Cloruro de Potasio Fluka 60130	g	100	3,04	304
Cloruro de sodio Fluka 71380	g	500	0,036	18
Dihidrogeno fosfato de potasio Baker Analyzed Reagent 3246	g	100	5,896	589,6
Hidrogeno fosfato disódico anhidro. Merck. 1.06580.1000	g	50	9,26	463
Ácido Acético grado p.a. Merck Art. 63	mL	500	0,0808	40,4
<b>COMPRA DE MUESTRAS</b>				
Café tostado comercial	kg	45	10	450
<b>MATERIALES DE OFICINA</b>				
CDRw	Unidad	10	1	10
Hojas bond tamaño A4	Resmas	5	3	15
Copias	Unidad	100	0,04	4
Empastado de tesis	Unidad	8	9	72
Tonner	Unidad	2	70	140
<b>Subtotal</b>				<b>11548,21</b>
<b>Imprevistos (5%)</b>				<b>577,41</b>
<b>Total</b>				<b>12125,62</b>



9 FUENTES DE FINANCIAMIENTO: PROYECTO FORTALECIMIENTO INSTITUCIONAL 2100527033

Organización	Porcentaje aporte (%)
INIAP	67.95%
Tesista	32.05%
<b>TOTAL</b>	<b>100%</b>

10 BIBLIOGRAFÍA

1. **ASECAL**. 2008. Curso de Cálculo de incertidumbre de medida. Quito, EC. p.15-16.
2. **ASECAL**. 2008. Curso de Validación de Métodos Analíticos. Quito, EC. p.14-19.
3. **CE (Comisión de las Comunidades Europeas)**. 2005. Diario Oficial de la Comunidad Europea. Reglamento (CE) N° 123/2005 de la Comisión del 26 de enero del 2005. Bruselas, BE.
4. **CE (Comisión de las Comunidades Europeas)**. 2006. Diario Oficial de la Comunidad Europea. Reglamento (CE) N° 401/2006 de la Comisión del 23 de febrero de 2006. Bruselas, BE.
5. **Comisión del Codex Alimentarius**. 2007. Documento de debate sobre la ocratoxina en el café. FAO/OMS. CX/CF 07/1/18. Beijing, CH.
6. **FAO** (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). 2006. Plan Nacional para prevención de OTA en café ecuatoriano. Quito, EC.
7. **FAO** (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). 2006. Taller Subregional sobre metodología de muestreo analítico, principios de metrología científica y cálculos de incertidumbre. Quito, EC.
8. **INEC** (Instituto Nacional de Estadísticas y Censos, EC). 2008. Quito, EC.
9. **Lopez-García R., Mallmann C. y Pineiro M.** 2008. Desing and implementation of an integrated management system for ochratoxin A in the coffee production chain. Journal of Food Additives and Contaminants. 25: 231-240.
10. **Mounjouenpou P., Durand N., Guyot B. y Guiraud J.P.** 2007. Effect of operating conditions on ochratoxin A extraction from roasted coffee. Journal of Food and Additives and Contaminants. Montpellier, FR. 24: 730-734.
11. **Pérez de Obanos A., González-Peñas E. y López de Cerain A.** 2005. Influence of roasting and brew preparation on the ochratoxin A content in coffee infusion. Journal of Food Additives and Contaminants. Pamplona, ES. 22: 463–471.
12. **Purifluidos y Waters**. 2008. Curso de Validación de Metodologías Analíticas. Quito, EC.

13. **Sookg L., Holler J.M. y Nieman T.A.** 2001. Principios de Análisis Instrumental. 5ta Ed. Madrid, ES. McGraw-Hill/Interamericana de España. p.14.
14. **Suárez-Quiroz Mirna, De Louise Béatrice, Gonzalez-Rios Oscar, Barel Michel, Guyot Bernard, Schorr-Galindo Sabine y Guiraud Joseph-Pierre.** 2005. The impact of roasting on the ochratoxin A content of coffee. *Internacional Journal of Food Science and Technology*. Mexico, MX. 40: 605-611.
15. **Tsubouchi Haruo, Terada Hisaya, Yamamoto Katsuhiko, Hisada Kazuo y Sakabe Yoshio.** 1988. Ochratoxin A found in commercial Roast Coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Nagoya, JP. 36: 540-542.
16. **Vera Edgar.** 2008. Historia e Importancia del Sector Cafetero Ecuatoriano. [Documento]. Quito, EC. MAGAP.

## 11 ANEXOS

### ANEXO I. MATERIALES Y EQUIPOS

- Molino Thomas Wiley
- Probetas de borosilicato de 100, 50 y 1000 mL
- Erlenmeyer de vidrio borosilicato de 250 mL con tapa rosca
- Erlenmeyer de vidrio borosilicato de 250 mL
- Vasos de precipitación de borosilicato de 10, 100 y 600 mL
- Embudos de filtración de vidrio de 12,5 cm de diámetro
- Tubos de ensayo de vidrio borosilicato con tapa rosca de 15 y 25 mL
- Tubos de ensayo de vidrio con punta cónica de 20 mL
- Sistema de extracción al vacío compuesto de kitasato de 1000 mL, reservorios de 500 mL con membrana de filtro poroso y pinza metálica
- Gradillas porta tubos de ensayo
- Micropipeta automática de 100 a 1000  $\mu$  L y de 10 a 100  $\mu$  L
- Puntas para micropipeta automática
- Papel filtro de 12,5 cm de diámetro Whatman 4 o equivalente
- Membrana HV (Durapore) EM PVDF, 0,45  $\mu$ m de poro, 47 mm de diámetro, blanca lisa
- Membrana HV (Durapore) EM PVDF, 0,22  $\mu$ m de poro, 25 mm de diámetro, blanca lisa
- Membrana de fibra de vidrio tipo APFB
- Jeringuillas de polipropileno de 10 mL y 60 mL
- Balanza analítica de precisión 0.1mg Shimadzu, modelo AUX220
- Columnas de inmunoafinidad para purificación de OTA OCHRAPREP
- Evaporador de muestras
- Baño María
- Equipo de Extracción en fase sólida al vacío Waters
- Agitador de Tubos Vortex
- Baño Ultrasonido
- Gas Nitrógeno 99.9% de pureza de 6 m<sup>3</sup>
- Equipo HPLC Agilent 1100 series
- Licuadora Osterizer 2.0301-N
- Vasos de vidrio para licuadora de 500mL
- Cronómetro digital Thomas Scientific

## ANEXO II. REACTIVOS

- Agua tipo I, conductividad 0,056  $\mu\text{S}/\text{cm}$
- Bicarbonato de sodio p.a Baker. Analyzed Reagent 35-0605
- Acetonitrilo grado HPLC Merck 1.00030.4000
- Metanol grado HPLC marca Fisher A 452-4
- Metanol grado p.a. Mallinckrodt UN 1230
- Estándar Ocratoxina A
- Cloruro de Potasio Fluka 60130
- Cloruro de sodio Fluka 71380
- Dihidrogeno fosfato de potasio Baker Analyzed Reagent 3246
- Hidrogeno fosfato disódico anhidro. Merck. 1.06580.1000
- Ácido Acético grado p.a. Merck Art. 63

## ANEXO III. PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS

### Preparación de la muestra:

- Moler 2 kg de granos de café tostado en el molino, obtener un tamaño de partículas de 2mm.
- Colocar un frasco de vidrio de 500mL, con número de identificación de la muestra sobre la balanza, encerar la balanza.
- Homogenizar la muestra realizando movimientos envolventes de misma dentro de la funda plástica.
- Pesar 25 gramos de muestra previamente homogenizada en el frasco de vidrio con la ayuda de una espátula.
- Llevar el frasco de vidrio con la muestra hacia el lugar de extracción.

### Observaciones:

- La operación de molienda solo se realizará si la muestra no viene molida en su envase original y en el caso de existir dificultad este proceso, se recomienda utilizar nitrógeno líquido para congelar la muestra y facilitar el proceso.
- Para la operación de pesado de la muestra se debe tomar en consideración dos cifras decimales.

### Extracción de la Muestra:

- Adicionar al frasco con la muestra 200 mL de solución de Metanol: bicarbonato de sodio 3% (1:1v/v).
- Colocar el frasco en el ultra turrax, asegurar el mismo y homogeneizar durante 5 minutos a alta velocidad.
- Filtrar la muestra usando papel filtro.
- Filtrar el extracto a través de membrana de fibra de vidrio.
- Tomar 4 mL del filtrado y transferir a un balón volumétrico de 100 mL, aforar a 100mL con la solución tampón PBS 1% y homogeneizar.
- El extracto restante taparlo y almacenar en refrigeración.

### Purificación de la Muestra:

- Adaptar una jeringa de polipropileno de 60 mL a una columna de inmunoafinidad y conectar al sistema de filtración al vacío.

- b. Pasar cuantitativamente el contenido del balón de 100 mL por la columna, dejar pasar a través de la columna con un flujo de 2/3 mL por minuto aproximadamente.
- c. Lavar la columna con 10 mL de agua y dejar que se seque.
- d. Desconectar la columna del sistema de vacío y aplicar presión positiva.
- e. Sustituir la jeringa de plástico de 60 mL por una jeringa de plástico de 10 mL.
- f. Transferir 4 mL de metanol grado HPLC por la jeringa de vidrio, dejar en contacto por 3 minutos y eluir la ocratoxina A utilizando presión positiva y controlando el flujo por medio del embolo de la jeringa (2-3 mL/min).
- g. Evaporar el eluido a sequedad utilizando nitrógeno en baño de agua con agitación y control de temperatura a 45°C.

#### Cuantificación por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC):

- a. Redisolver los residuos obtenidos en la etapa de purificación con 300 µL de metanol grado HPLC, agitar utilizando un agitador de tubos (vortex) y en un baño ultrasonido por 5 minutos.
- b. Inyectar 20 µL en el HPLC (Agilent 1100) bajo las siguientes condiciones:

CONDICIONES DEL EQUIPO	
Columna:	Zorbax SB - C18 (150 x 4,6 mm), tamaño de partícula de 5 µm
Temperatura de Columna:	30°C
Detector de Fluorescencia:	Longitud de Onda de Excitación 330 nm, Emisión. 475 nm
Fase móvil:	Metanol: Acido Acético 0.2% en agua (40:30:30 v/v/v)
Flujo:	1mL /minuto
Volumen de Inyección:	20 µL
Tiempo de Cromatografía	7 minutos
Tiempo de retención de la Toxina:	4,125 minutos

#### Cálculos y expresión de los resultados

La cuantificación se realiza utilizando una curva de calibración realizada previamente en el equipo y utilizando la siguiente fórmula:

$$OTA(\mu\text{g} / \text{kg}) = \frac{(ABC)}{(DE)}$$

Donde:

- A = área del pico correspondiente a OTA de la muestra
- B = concentración de OTA (ng/µL) de solución estándar
- C = Volumen final de muestra (µL)
- D = área de el pico de OTA en la solución patrón
- E = peso de la muestra representada en la solución (g)

## ANEXO IV. CRITERIOS DE ACEPTACIÓN PARA ANÁLISIS OTA

9.3.2006

ES

Diario Oficial de la Unión Europea

L 70/3

### 4. MÉTODO DE ANÁLISIS QUE UTILIZARÁ EL LABORATORIO Y REQUISITOS DE CONTROL DEL LABORATORIO

#### 4.1. Definiciones

Algunas de las definiciones más comúnmente utilizadas que el laboratorio deberá aplicar son las siguientes:

$r =$  Repetibilidad, valor por debajo del cual cabe esperar que la diferencia absoluta entre dos resultados de prueba obtenidos en condiciones de repetibilidad (misma muestra, mismo operador, mismo aparato, mismo laboratorio y breve lapso entre ambos) se encuentre en un margen específico de probabilidad (típicamente 95 %), por lo que  $r = 2,8 \cdot s_r$ .

$s_r =$  Desviación estándar, calculada a partir de los resultados obtenidos en condiciones de repetibilidad.

$RSD_r =$  Desviación estándar relativa calculada a partir de los resultados obtenidos en condiciones de repetibilidad  $[(s_r / \bar{x}) \cdot 100]$ .

$R =$  Reproducibilidad, valor por debajo del cual cabe esperar que la diferencia absoluta entre dos resultados de prueba obtenidos en condiciones de reproducibilidad (material idéntico obtenido por operadores en distintos laboratorios, utilizando el método de prueba estandarizado) se encuentre en un margen específico de probabilidad (típicamente 95 %);  $R = 2,8 \cdot s_p$ .

$s_p =$  Desviación estándar, calculada a partir de los resultados obtenidos en condiciones de reproducibilidad.

$RSD_R =$  Desviación estándar relativa calculada a partir de los resultados obtenidos en condiciones de reproducibilidad  $[(s_p / \bar{x}) \cdot 100]$ .

#### 4.2. Requisitos generales

Los métodos de análisis utilizados para el control de los alimentos se ajustarán a lo dispuesto en los puntos 1 y 2 del anexo III de la Directiva 88/200/CEE.

#### 4.3. Requisitos específicos

##### 4.3.1. Criterios de funcionamiento

En tanto la legislación comunitaria no exija ningún método específico para la determinación del contenido de micotoxinas en los productos alimenticios, los laboratorios podrán aplicar cualquier método de su elección, siempre que se ajuste a los siguientes criterios:

a) criterios de funcionamiento para las aflatoxinas:

Criterio	Intervalo de concentración	Valor recomendado	Valor máximo autorizado
Blancos	Todos	Descendable	—
Recuperación — Aflatoxina M1	0,01-0,05 µg/kg	de 60 a 120 %	
	> 0,05 µg/kg	de 70 a 110 %	
Recuperación — Aflatoxinas B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> , G <sub>2</sub>	< 1,0 µg/kg	de 50 a 120 %	
	1-10 µg/kg	de 70 a 110 %	
	> 10 µg/kg	de 80 a 110 %	
Precisión RSD <sub>R</sub>	Todos	Derivada de la ecuación de Horwitz	2 veces el valor derivado de la ecuación de Horwitz

La precisión puede calcularse como 0,66 veces la precisión RSD<sub>r</sub> a la concentración que interesa.

Nota:

— valores aplicables tanto a B<sub>1</sub> como a la suma de  $B_1 + B_2 + G_1 + G_2$ .

— si debe notificarse la suma de cada aflatoxina B<sub>1</sub> + B<sub>2</sub> + G<sub>1</sub> + G<sub>2</sub> la respuesta de cada una al sistema analítico tiene que ser conocida o equivalente.

by criterios de funcionamiento para la ocratoxina A:

Contenido $\mu\text{g}/\text{kg}$	Ocratoxina A		
	RSD <sub>r</sub> %	RSD <sub>p</sub> %	% de recuperación
< 1	$\leq 40$	$\leq 60$	de 50 a 120
1-10	$\leq 20$	$\leq 30$	de 70 a 110