



**Fecha de Presentación** Marzo del 2010

**Estación Experimental** Santa Catalina

**Programa / Departamento** Departamento de Nutrición y Calidad

**Proyecto** Código 2100527033  
Proyecto de Fortalecimiento: Agroindustria, Energía y Nutrición.

**Componente 1** 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.

**Título:** Evaluación de Ocratoxina A como contaminante del Cacao Ecuatoriano de Exportación por Cromatografía Líquida de alta Resolución.

**Ubicación:** Estación Experimental Santa Catalina  
Cutuclagua-Pichincha.

**Autor:** Egda. Amanda Sofía Cevallos Vallejo

**Co- Autores:** Dr. Iván Samaniego  
Quím. MS. Susana Espín

**Colaboradores:** Asociación Nacional de Exportadores de Cacao  
ANECACAO

**Fecha de Inicio:** Enero de 2010

**Fecha de Terminación:** Diciembre de 2010

**Presupuesto:** \$ 13354,12

**Fuente de Financiamiento:** INIAP :70,9%  
Aporte de Estudiante: 29,1%

## 1. ANTECEDENTES

El cacao se cultiva principalmente en África del Oeste, América Central, América del Sur y Asia, según la ICCO<sup>1</sup> los principales países productores son los siguientes: Costa de Marfil, Ghana, Indonesia, Nigeria, Camerún, Brasil, Ecuador y Malasia: la producción de estos países alcanza el 90% del total, que para el 2008/09 se estima en 3.5 millones de TM, el Ecuador aporta con el 3% de este gran total. Existen dos clases de cacao: el básico y el fino o de aroma, más del 90% del cacao producido cada año puede considerarse como cacao básico, el mismo que procede en su mayoría de África y Brasil. El cacao fino o de aroma tiene características distintivas de aroma y sabor, buscadas por los fabricantes de chocolate, cuyo volumen anual se estima en 150.000 TM, de lo cual el Ecuador produce el 50% (Vera, 2008).

La cadena de valor del cacao en el Ecuador es actualmente la tercera más relevante después del banano y las flores, genera empleo para cerca de 100.000 familias de pequeños productores y otras 20.000 familias en el resto de la cadena de valor, lo que equivale a una influencia directa sobre 600.000 personas (Pérez, 2009). La producción de cacao aporta alrededor del 7% al PIB agropecuario y representa el 0.40% del PIB total, según el INIAP y otros organismos vinculados con la investigación, producción y comercialización del cacao en el país, la superficie cosechada en el período 2003 al 2008, muestra un crecimiento del 40%, al pasar de 285.000 a 400.000 hectáreas, situación que ha tenido un impacto positivo en el volumen de producción por la ampliación de la superficie, pasando de 100,000 TM en el 2003 a un promedio de 125,000 TM en el 2008 (Vera, 2008).

Hoy en día uno de los problemas más difundidos en los países de tecnología avanzada es la cantidad de alimentos y su seguridad, la inocuidad de estos se puede ver afectada por una multitud de factores, entre los más importantes están los contaminantes, los cuales se refieren, entre otros, a sustancias que aparecen de manera natural, como las micotoxinas (IICA, 2009).

Las Micotoxinas son metabolitos secundarios fúngicos y constituyen un importante problema económico y de peligro para la salud. Entre las micotoxinas, la Ocratoxina A (OTA) representa una de las sustancias más difundidas y peligrosas. Químicamente la OTA es una isocumarina clorada, [7-(L-β-fenilalanilcarbonil)-carboxil-5-cloro-8-hidroxi-3,4-dihidro-3R-metilisocumarina], y se produce en forma natural en alimentos como: cereales, vino, especias, café, mostos, jugo de uva, productos lácteos, cacao, cerveza, frutos secos, entre otros (Burdaspal, 2003; Drusch, 2003).

La OTA es cancerígena<sup>2</sup>, nefrotóxica potente, teratogénica e inmunotóxica, es producida por algunas especies fúngicas del género *Aspergillus* y *Penicillium*, principalmente en el grano de cacao es producida por *Aspergillus carbonarius* y *Penicillium viridicatum*, a una actividad mínima de agua ( $a_w$ ) de 0,85 (Aydin G., 2003; Moss, 1996; Serra J., 2004; Brera C., 2003).

La Ocratoxina A fue estudiada por primera vez en el Cacao en 1987, encontrándose que el 17.6% de 56 muestras de granos de cacao presentaban contaminación por OTA en niveles que van desde los 100 a los 500 µg/kg (Krogh, 1987), otro estudio realizado en el año 2002 en 1220 muestras de cacao en grano en Alemania, reportó que el 14,01% de las muestras presentaron contaminación por OTA en niveles que bordean los 2µg/kg (Miraglia M., 2002). En el año 2004 se realizó una investigación de la

---

<sup>1</sup> ICCO, siglas en inglés utilizadas para “*International Cocoa Organization*”, u Organización Internacional del Cacao

<sup>2</sup> La Agencia Internacional para Investigaciones en Cáncer (IARC), clasifica a esta como un posible carcinógeno humano (grupo 2B). (IARC, 1993)

contaminación por Ocratoxina A en granos de cacao por región de origen, el mismo que demostró que el 13,05% de 46 muestras de cacao analizadas presentan contaminación por OTA en niveles superiores a 2 µg/kg, estas muestras fueron importadas principalmente desde Costa de Marfil y otras regiones en las cuales no se incluyó al Ecuador (Amésqueta, et al., 2005), el mismo año se reportó que 74 de 80 muestras de licores de cacao analizadas estaban contaminadas por OTA en un rango de 0,1 a 9 µg/kg por el método de Cromatografía Líquida de Alta Resolución, entre estas muestras se incluyen 3 muestras provenientes del Ecuador (Serra J., 2004).

El *Codex Alimentarius*, establece criterios para evitar que se comercialicen productos que puedan ocasionar daño a la salud. Dentro de estas medidas existen los Límites Máximos de Residuos (LRM) que son permitidos y hay que cumplirlos, para el caso de OTA en el cacao, estos niveles están en discusión con una propuesta establecida por los EEUU y la Unión Europea de 2 µg/kg (FAO, 2008; UE, 2010).

## **2. JUSTIFICACIÓN**

En la actualidad en nuestro país no existen estudios correspondientes a la presencia de ocratoxina A en el cacao, y se ha evidenciado la potencial presencia de este contaminante debido a la susceptibilidad del cacao al ataque de hongos en los procesos de producción y comercialización, los mismos que incluyen la fermentación, el secado, transporte, almacenamiento etc., por esta razón se hace urgente la necesidad de realizar un sondeo de la situación actual de la presencia de este contaminante en el cacao ecuatoriano de exportación.

Por otro lado, los desafíos externos en materia de exigencias analíticas obligan a trabajar con excelencia y calidad mediante el cumplimiento de normas internacionales, las mismas que demandan que los laboratorios de análisis de alimentos deben cumplir con requisitos tanto de gestión de la calidad como técnicos especificados en la norma ISO/IEC/17025, razón por la cual es necesario en primera instancia validar la metodología de análisis a fin de garantizar que los ensayos realizados en el laboratorio cumplan los requisitos que avalen su calidad, aseguren las exigencias del cliente y sea demostrativo de la competencia técnica del laboratorio.

Con lo anteriormente expuesto la presente investigación pretende demostrar la aplicabilidad de un método analítico para la cuantificación de Ocratoxina A en cacao en grano por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), así como el sondeo de la contaminación por OTA en el cacao ecuatoriano de exportación.

## **3. OBJETIVOS**

### **3.1 OBJETIVO GENERAL**

Evaluar cuantitativamente el contenido de Ocratoxina A en el cacao ecuatoriano de exportación, utilizando el método de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).

### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Validar el método de análisis para la determinación de Ocratoxina A en Cacao en grano, utilizando columnas de inmunoafinidad y Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) con detector de Fluorescencia.

- Analizar los niveles de contaminación por OTA en las muestras mediante el método desarrollado y validado previamente en el laboratorio y realizar un análisis de los resultados obtenidos para establecer niveles de contaminación en el cacao nacional de exportación.

## 4. HIPÓTESIS

### 4.1 HIPÓTESIS DE TRABAJO FASE I: VALIDACIÓN DEL MÉTODO

*Ho:* 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 TRABAJO FASE II: DETERMINACIÓN DE LA CONTAMINACIÓN POR OTA.

*Ho:* Los niveles de contaminación por Ocratoxina A en el cacao ecuatoriano de exportación no cumplen los valores referenciales obtenidos en estudios internacionales 2 µg/kg.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 MATERIALES Y EQUIPOS

*Véase: ANEXO I página 17.*

### 5.2 MUESTRAS Y MATERIALES DE REFERENCIA

- Muestras de cacao en grano tomadas de las principales exportadoras del país.
- Material de referencia certificado (FAPAS)<sup>3</sup>.
- Estándares certificados de OTA.

### 5.3 METODOLOGÍA

#### 5.3.1 CARACTERÍSTICAS DEL SITIO EXPERIMENTAL

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

*Ubicación*

*Provincia:* Pichincha

*Cantón:* Mejía

*Parroquia:* Cutuclagua

*Lugar:* Estación Experimental Santa Catalina

*Dirección:* Panamericana Sur Km 1

---

<sup>3</sup> FAPAS abreviatura usada para Food Analysis Performance Assessment Scheme.

#### Situación Geográfica<sup>4</sup>

Altitud:	3058m
Latitud:	00°22'S.
Longitud:	78°23'O
Temperatura promedio:	11.6 °C
Clima :	Templado Húmedo

### 5.3.2 MÉTODOS DE ANÁLISIS

Los análisis de laboratorio se realizarán tomando como referencia el método propuesto por *Josep Serra Bonvehí* (Serra J., 2004). Véase: ANEXO III página 19.

### 5.3.3 PROCEDIMIENTO

La presente investigación se llevara a cabo en dos fases: en la primera fase se realizará la validación de la metodología analítica y en la segunda fase se evaluará los niveles de contaminación por OTA en el cacao ecuatoriano de exportación.

#### FASE I: Validación del método de análisis para la determinación de OTA en cacao por Cromatografía Líquida de alta resolución utilizando columnas de inmunofinidad con detector de fluorescencia

Para la validación del método de análisis de Ocratoxina A en almendras de cacao mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución HPLC, utilizando detector fluorescencia, se trabajará con estándares certificados de Ocratoxina A y muestras de referencia de cacao 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) Linealidad y rango lineal:

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

Rango Lineal es como su nombre lo indica 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 (límite de linealidad, LOL) (Sookg, et al., 2001).

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):

---

<sup>4</sup> Fuente: Documento de difusión del Instituto Nacional 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.

Tabla 1. Esquema de evaluación de la función respuesta del equipo vs. concentración.

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):

- *Coficiente 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 (b):*

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

- *Intercepto (L):*

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

- *Desviación de la pendiente (Sm):*

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

- *Desviación del intercepto (SL):*

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

- *Error Típico ( $S_{y, x}$ ):*

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

- *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:

$$LD = \frac{3L}{m}$$

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:

$$LC = \frac{6L}{m}$$

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 y materiales de referencia certificados de cacao, mediante el siguiente esquema:

Tabla 2. Estudio de la repetibilidad y reproducibilidad del método

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>	...	...	...	...	...

\*Además se medirá todos los días un material de referencia certificado (MRC)

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):

Tabla 3. Análisis de varianza

ANÁLISIS SIMPLE DE LA VARIANZA			
ORIGEN DE LA VARIANZA	GRADOS DE LIBERTAD (v)	SUMAS DE DIFERENCIAS CUADRÁTICAS (SDC)	DIFERENCIAS CUADRÁTICAS MEDIAS* (DCM = SDC/v)
<i>Entre niveles (Between)</i>	$v_1 = k - 1$	$SDC_B = \sum_{i=1}^k p(\bar{x}_i - \bar{x})^2$	$DCM_B = \frac{SDC_B}{k - 1}$
<i>Dentro de niveles (Within)</i>	$v_2 = n - k$	$SDC_W = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^p (x_{ij} - \bar{x}_i)^2$	$DCM_W = \frac{SDC_W}{n - k}$
<i>Total</i>	$v = n - 1 = (v_1 + v_2)$	$SDC_T = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^p (x_{ij} - \bar{x})^2 = (SDC_B + SDC_W)$	$DCM_T = \frac{SDC_T}{n - 1}$

\*Las diferencias cuadráticas medias (DCM) 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  $RSD_R$ :

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

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

$$RSD_R = 2^{(1-0,5 \log C)}$$

Donde  $C$  es la tasa de concentración (es decir,  $1 = \frac{100g}{100g}$ ,  $0,001 = 1000 \frac{mg}{Kg}$ ).

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 le adiciona cantidades conocidas del compuesto en estudio, y que después de aplicado el método permiten presentar resultados que comparen (ASECAL, 2008):

*La cantidad encontrada vs. La cantidad adicionada*

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 (ASECAL, 2008):

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

Donde:

- $C_{\text{obtenido}}$  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 cacao 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).

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

*Estimación de Entrada + Estimación de Magnitud de Influencia (si entera)*

*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 factor de cobertura  $k$ . También se calculará el N° de grados efectivos de libertad como sigue:

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

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 aceptará valores de incertidumbre inferiores al 40% del límite de cuantificación.

#### h) Variables en estudio:

Corresponden a los parámetros de validación del método analítico para Ocratoxina A en cacao:

- *Selectividad*
- *Exactitud*
- *Precisión: Repetibilidad y Reproducibilidad*
- *Límite de detección*
- *Límite de cuantificación*
- *Linealidad y Rango lineal*
- *Incertidumbre*

**FASE II: Estudio de los niveles de Ocratoxina A como contaminante del Cacao Ecuatoriano de Exportación**

a) Procedimiento:

En coordinación con la Asociación Nacional de Exportadores de cacao (ANECACAO), se establecerá un plan de muestreo, seleccionando a 15 empresas exportadoras del listado de asociados de ANECACAO (*Véase: ANEXO V página 23*), en cada empresa exportadora se tomará 3 muestras para llevar un total de 45 muestras al laboratorio.

**Tabla 4. Socios de ANECACAO de donde se tomaran las muestras**

Número	Empresa Exportadora
1	<i>Exportadora 1</i>
2	<i>Exportadora 2</i>
3	<i>Exportadora 3</i>
4	<i>Exportadora 4</i>
5	<i>Exportadora 5</i>
6	<i>Exportadora 6</i>
7	<i>Exportadora 7</i>
8	<i>Exportadora 8</i>
9	<i>Exportadora 9</i>
10	<i>Exportadora 10</i>
11	<i>Exportadora 11</i>
12	<i>Exportadora 12</i>
13	<i>Exportadora 13</i>
14	<i>Exportadora 14</i>
15	<i>Exportadora 15</i>

b) Análisis Estadístico.

Se establecerá el porcentaje de incidencia de OTA en las muestras contaminadas con la siguiente expresión:

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

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

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

Se aplicará la prueba t-students para comparar la cantidad de contaminación obtenida del análisis en cada exportadora con el valor encontrado en países de la Unión Europea (2µg/kg) con un  $\alpha = 0.05$ , mediante la siguiente expresión:

$$t_{ob} = \frac{(X_o - X_a)}{S} \sqrt{n}$$

Donde:

$X_o$  → Valor contaminación de OTA en µg/kg en la muestra cacao analizadas.

$X_a$  → Valor de contaminación referencial en µg/kg.

$S$  → Desviación estándar.

$n$  → número de repeticiones.

Se aplicará los siguientes criterios:

- Si  $t_{ob} < t_{\text{tabla}}$  no existe diferencia estadística significativa entre el promedio de contaminación y el valor referencial para exportación con un  $\alpha = 0.05$ .
- Si  $t_{ob} > t_{\text{tabla}}$  existe diferencia estadística significativa entre el promedio de contaminación y el valor referencial para exportación con un  $\alpha = 0.05$ .

#### c) Unidad Experimental.

La unidad experimental ésta constituida por 1,5 kg de cacao en grano, las mismas que serán obtenidas de acuerdo al proceso de muestreo en cada una de las exportadoras.

#### d) Variables en estudio

El contenido de ocratoxina A expresado en µg OTA /kg de cacao en grano, corresponde a la variable en estudio, las mismas que serán evaluadas en cada una de las quince muestras por triplicado.

## 6. MANEJO ESPECÍFICO DEL EXPERIMENTO

### 6.1 MUESTREO

Para la toma de muestras, se contará con el apoyo de la Asociación Nacional de Exportadores de Cacao ANECACAO, a través de 15 de sus asociados, el mismo que está previsto a ejecutarse partir del mes de junio 2010. La muestra será tomada de acuerdo a los procedimientos de toma de muestras establecidas para análisis de calidad de cacao en grano según la norma técnica ecuatoriana NTE INEN 177:95. Véase: ANEXO VI página 24.

### 6.2 LUGAR DEL ENSAYO

La determinación de los niveles de contaminación de Ocratoxina A se desarrollarán en el LSAIA del Departamento de Nutrición y Calidad de la Estación Experimental Santa Catalina.

## 6.3 ANÁLISIS DE LABORATORIO

### 6.3.1 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Las muestras de cacao para el análisis de OTA y los materiales de referencia se ingresarán al laboratorio, se codificará y se procederá a la molienda utilizando un Molino Thomas Wiley hasta obtener un tamaño de partículas de 2 mm, éstas 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 está basado en la utilización de columnas de inmunoafinidad que poseen anticuerpos monoclonales específicos para OTA, tecnología que es altamente específica, sensible, rápida en relación a las tecnologías tradicionales de purificación. En éste 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

ACTIVIDADES	MESES 2010												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
1) Revisión bibliográfica y elaboración del anteproyecto	x	x											
2) Aprobación del anteproyecto en el INIAP y la Universidad			x										
3) Fase experimental 1: Validación del Método			x	x	x	x							
4) Fase experimental 2: Determinación de los niveles de OTA						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	\$/UNIDAD	\$/TOTAL
Tesista	mes	12	323,85	3886,2
<b>INSUMOS Y MATERIALES</b>				
Membrana HV (Durapore) EM PVDF, 0,45 µm de	Caja x 100	1	98,9	98,9

poro, 47mm de diámetro, blanca lisa				
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	Caja 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>MOVILIZACIÓN</b>				
Viáticos y subsistencias	v/s	12	135	1620
<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

Subtotal				12718,21
Imprevistos (5%)				635,91
Total				13354,12

## 9. FUENTES DE FINANCIAMIENTO: PROYECTO FORTALECIMIENTO INSTITUCIONAL 2100527133

Organización	Porcentaje aporte (%)
INIAP	70,9%
Tesista	29,1%
<b>TOTAL</b>	<b>100%</b>

## 10. BIBLIOGRAFÍA

1. Amésqueta, S.; Gonzales-Peñas, E.; Murillo, M. y Lopéz de Cerain, A. 2005. *Occurrence of ochratoxin A in cocoa beans: Effect of shelling*. Pamplona, ES. Food Additives and Contaminants 22 (6): 590–596.
2. ASECAL. 2008. *Memorias del Curso de Validación de Métodos Analíticos (FQ)*. Quito-EC. p.1-36
3. ASECAL. 2008. *Calculo de Incertidumbre de Medida*. Quito-EC. p.14-19
4. Aydin G., Ozeelik N., Ciocek E., Soyos M. 2003. *Histopathologic changes in liver and renal tissues by ochratoxin A and melatonin in rats*. s.l. Human Expositions of Toxicology n°. 22: 383-391.
5. Brera C.; Grossi S., De Santis B. y Miraglia M. 2003. High Performance Liquid Chromatographic. *Method for the Determination of Ochratoxin A in Cocoa Powder*. Rome, IT. Journal Of Liquid Chromatography & Related Technologies 26 (4):585–598.
6. Burdaspal, PA. y Legarda, TM. 2003. *Ochratoxin A in samples of different types of chocolate and cacao powder, marketed in Spain and fifteen foreing countries*. Madrid, ES. Alimentaria Octubre 40:143-153.
7. CE, Comision de las Comunidades Europeas. 2006. *REGLAMENTO (CE) N° 401/2006 DE LA COMISIÓN de 23 de febrero de 2006*. Bruselas, BE. Diario Oficial de la Union Europea.
8. Drusch, S. y Ragab, W. 2003. *Mycotoxins in fruits, fruit juices, and dried fruits*. s.l. Journal of Food Prototypes 66:1514-1527.
9. FAO (Food and Agriculture Organization). 2006. *Taller Subregional sobre metodología de muestreo analítico, principios de metrología científica y cálculos de incertidumbre*. Quito, EC. Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación. TCP/RLA/3013 A
10. FAO (Food and Agriculture Organization), Comisión del CODEX Alimentarius. 2008. *Discussion paper on ochratoxin A in cocoa*. The Hague, NL. World Health Organization. CX/CF08/2/15.



11. **IARC (International Agency for Research on Cancer). 1993.** *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans:some naturally occurring substances, food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins.* Lyon, FR. IARC Working group, World Health Organisation. 56: 489-521.
12. **IICA; INIAP y Agrocalidad. 2010.** *Programa Nacional de monitoreo y Manejo Integrado de contaminantes (Plaguicidas y Micotoxinas) para productos de Exortación.* Quito, EC. Proyecto IICA-INIAP-Agrocalidad. [Documento]
13. **Krogh, P. 1987.** *Ochratoxins in Food.*, *Mycotoxins in Food. Ochratoxins in Food.* s.l. Academic Press. 1987: 97-121.
14. **Miraglia, M., y Brera, C. 2002.** *Assessment of dietary intake of ochratoxin A by population of EU members states.* s.l. Reports on tasks for Scientific Cooperation. Task 3.2.7. [En línea]. Disponible en: [http://www.europa.eu.int/comm/food/fs/scoop/3.2.7\\_en.pdf](http://www.europa.eu.int/comm/food/fs/scoop/3.2.7_en.pdf).
15. **Moss, MO. 1996.** *Mode of formation of ochratoxin A.* s.l. Food Additives and Contaminantes 13 (suplemento):5-9.
16. **Pérez, R. 2009.** *La Calidad del Cacao.* Quito, EC. CAMAREN-INIAP.
17. **Purifluidos y Waters. 2008.** *Memorias del Curso de Validación de Metodologías Análíticas.* Quito, EC.
18. **Serra J. 2004.** *Occurrence of Ochratoxin A in Cocoa Products an Chocolate.* Barcelona, ES. American Chemical Society 52(20): 6347-6352.
19. **Sookg, L., Holler, JM. y Nieman, TA. 2001.** *Principios de analisis instrumental.* Ed. 5ta. Madrid, ES. McGraw-Hill/Interamericana de España p.14
20. **UE, Comisión de las Comunidades Europeas. 2010.** *REGLAMENTO (UE) N°105/2010 DE LA COMISIÓN de 5 de febrero de 2010.* Bruselas, BE. Diario Oficial de la Union Europea.
21. **Vera, E. 2008.** *Historia e Importancia del Sector Cacaotero Ecuatoriano.* Quito, EC. MAGAP. [Documento]

## 11. ANEXOS

### ANEXO I.

#### MATERIALES Y EQUIPOS

- Molino Thomas Wiley , Modelo
- Probetas de borosilicato de 100, 50, 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 12,5 cm de diámetro

- Tubos de ensayo de vidrio borosilicato con tapa rosca de 15, 25mL de capacidad
- 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 12,5cm de diámetro Whatman 4 o equivalente
- Membrana HV (Durapore) EM PVDF, 0,45  $\mu$ m de poro, 47mm de diámetro, blanca lisa
- Membrana HV (Durapore) EM PVDF, 0,22  $\mu$ m de poro, 25mm de diámetro, blanca lisa
- Membrana de fibra de vidrio tipo APFB
- Jeringuillas de polipropileno de 10mL y 60mL
- 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 $\mu$ S/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**

##### **a) Preparación de la muestra:**

- Moler 2kg de granos de cacao en grano 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 la muestra dentro de la funda plástica.
- Pesar 10 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:**

- Para la operación de pesado de la muestra se debe tomar en consideración dos cifras decimales.
- Si en caso existe dificultad con la molienda de los granos, se recomienda utilizar nitrógeno líquido para congelar la muestra y facilitar el proceso.

##### **b) Extracción de la Muestra.**

- Adicionar al frasco con la muestra 200mL de solución de Metanol: bicarbonato de sodio 3% (1:1, v/v).
- Colocar la tapa con las cuchillas, asegurar en la base de la licuadora y licuar durante 3 minutos a alta velocidad.
- Filtrar la muestra usando papel filtro y membrana de fibra de vidrio.

- Tomar 20mL del filtrado en un erlenmeyer de 125mL, adicionar 20mL de la solución tampón PBS 1% y homogeneizar.
- El extracto restante taparlo y almacenar en refrigeración.

**c) Purificación de la Muestra.**

- Adaptar una jeringa de polipropileno de 60mL a una columna de inmunoafinidad y conectar al sistema de filtración al vacío.
- Pasar cuantitativamente la muestra diluida con el tampón PBS por la columna, dejar pasar a través de la columna de inmunoafinidad utilizando vacío.
- Lavar la columna con 20mL de agua y dejar secar la columna.
- Desconectar la columna del sistema de vacío y aplicar presión positiva.
- Sustituir la jeringa de plástico de 60mL por una jeringa de plástico de 10mL.
- Transferir 1,5mL 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).
- A continuación transferir nuevamente 1,5 mL de metanol grado HPLC en la columna de inmunoafinidad, conectar una jeringa de plástico de 10 ml, realizar un efecto de contraflujo en 3 a 4 tiempos y dejar en contacto por 3 minutos (aproximadamente), eluir la ocratoxina A controlando el flujo por medio del embolo de la jeringa.

**d) Cuantificación por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).**

- Colocar en un vial 2mL del extracto eluido.
- Inyectar 50µL en el HPLC (Agilent 1100) bajo las siguientes condiciones:

<b>Condiciones del HPLC</b>	<b>Columna:</b>	Zorbax SB - C18 (150 x 4,6 mm), tamaño de partícula de 5 µm
	<b>Temperatura de Columna:</b>	30°C
	<b>Detector de Fluorescencia:</b>	Longitud de Onda de Excitación 330nm, Emisión. 475nm
	<b>Fase móvil:</b>	Acetonitrilo: Metanol: Ac. Acético 0.2% en agua (40:30:30 ) (v/v/v)
	<b>Flujo:</b>	1mL /minuto
	<b>Volumen de Inyección:</b>	50µL
	<b>Tiempo de Cromatografía:</b>	7 minutos
	<b>Tiempo de retención de la toxina:</b>	4,125 minutos

## CÁLCULOS Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS:

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

$$OTA \left( \frac{\mu g}{Kg} \right) = \frac{(ABC)}{(DE)}$$

- 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.

### REGULACIÓN (CE) N° 401/2006 DE LA COMISIÓN

#### 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  $r = 2.8 \times s_r$ .

$s_r$  = 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  $[(s_r / \bar{x}) \times 100]$ .

$R$  = 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 %):  $R = 2.8 \times s_R$ .

$s_R$  = 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  $[(s_R / \bar{x}) \times 100]$ .

#### 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 882/2004/CE.

#### 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	Desdenable	
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.

b) criterios de funcionamiento para la ocratoxina A:

Contenido µg/kg	Ocratoxina A		
	RSD, %	RSD <sub>R</sub> %	% de recuperación
< 1	≤ 40	≤ 60	de 50 a 120
1-10	≤ 20	≤ 30	de 70 a 110

## ANEXO V.

Nomina de socios de **ANECACAO**

Nº	NOMBRE DEL SOCIO	COMPAÑÍA
1	Sr. Alberto Nacer	<i>Transmar Ecuador</i>
2	Sr. Manuel López	<i>Ecuadoriana C. Ltda.</i>
3	Sr. Daniel Manobanda	<i>Quevexport</i>
4	Eco. Vincent Zeller	<i>Inmobiliaria Guangala</i>
5	Eco. Cesar Marcos	<i>Fund. Maquita Cushunchic</i>
6	Sra. María Elena Loaiza	<i>Adelpro S.A</i>
7	Ing. Julio Zambrano	<i>Cofina S.A.</i>
8	Ing. Edwin Acosta	<i>Acmansa C.A.</i>
9	Sr. Alejandro Orellana	<i>Eximore Cía. Ltda.</i>
10	Ing. Jorge Manobanda	<i>Agro Manobanda Hnos. S. A.</i>
11	Ing. Rafael Sanchez	<i>Agroxven S. A.</i>
12	Eco. Juan Loaiza	<i>Casa Luker del Ecuador</i>
13	Ing. Juan Pablo Zuñiga	<i>Exp. E Imp. "A&amp;J" S.A.</i>
14	Sr. Jacinto Andrade	<i>Osella S. A.</i>
15	Sra. Guadalupe Macias	<i>Guadalupe Macias Zambrano</i>
16	Eco. Angel Kam Mendoza	<i>Exikam</i>
17	Ing. Askley Delgado	<i>Askley Delgado</i>
18	Sr. Eduardo Heredia	<i>Santa Fe Java</i>
19	Sr. Francisco Riskey	<i>Nestlé Ecuador</i>
20	Sr. Vitaliano Sarabia	<i>Unocace</i>
21	Sr. Ivan Ontaneda	<i>Ecocafé S. A.</i>
22	MBA Pedro Martinetti	<i>Pedro A. Martinetti M.</i>
23	Ing. Manuel López	<i>Exporcafé Cia. Ltda.</i>
24	Arq. Mercy González	<i>Expigo</i>
25	Ing. Franco Pastorelli	<i>Natecua S. A.</i>
26	Sra. Martha Mora	<i>Ecuacoffe S.A./ Infelersa</i>
27	Ing. Armando Manobanda	<i>Exp. A. Manobanda</i>
28	Ing. Alejandro Taramelli	<i>Novolli S.A.</i>
29	Ing. Johan Zeller	<i>Aromex ia. Ltda</i>
30	Ing. Victor Orellana Ortega	<i>Cafeica C. Ltda</i>
31	Ing. Gonzalo Martinetti	<i>Gonzalo Martinetti Saltos</i>
32	Sr. Jose Carvajal	<i>Triairi S.A.</i>
33	Ing. Horacio Sánchez	<i>Horsa</i>
34	Ing. José Vera Vera	<i>Jose Vera Vera</i>
35	Ing. Lourdes Delgado	<i>María Delgado de Pandzic</i>
36	Ing. Alberto Nacer	<i>Colonial Cocoa S.A.</i>

## ANEXO VI.

### NORMA TÉCNICA ECUATORIANA NTE INEN 177:95.

#### Cacao en grano. Muestreo.

#### 1 OBJETO.

1.1 Esta norma establece el procedimiento para la toma de muestra del cacao en grano.

#### 2 ALCANCE.

2.1 **Lote.** Es la cantidad específica de cacao en grano con características similares, que se somete a inspección como un conjunto unitario.

2.2 **Muestra.** Es un grupo de granos extraído de un lote, que sirve para obtener la información necesaria que permite apreciar una o más características de ese lote, lo cual servirá de base para tomar una decisión sobre dicho lote.

2.3 **Muestra elemental.** Es la cantidad de granos tomada de una sola vez y de un solo punto del lote determinado.

2.4 **Muestra global o total.** Es el conjunto de muestras elementales.

2.5 **Muestra reducida (porción).** Es la cantidad de cacao en grano que se obtiene al reducir de tamaño la muestra global.

2.6 **Muestra de laboratorio.** Es la cantidad de cacao en grano obtenida de la muestra reducida, que está en condiciones de ser enviada al laboratorio, para en ella efectuar los ensayos correspondientes.

2.7 **Muestra de ensayo.** Es la parte de la muestra de laboratorio destinada a un análisis o ensayo.

2.8 **Nivel de calidad aceptable (AQL).** Es el máximo porcentaje defectuoso, o el mayor número de defectos en 100 unidades, que debe tener el producto para que el plan de muestreo de por resultado la aceptación de la mayoría de los lotes sometidos a inspección.

2.9 **Nivel de inspección.** Es el número que identifica la relación entre el tamaño del lote y el tamaño de la muestra.

2.10 **Envase (saco).** Es el recipiente que contiene cacao en grano y que está destinado a protegerlo del deterioro, contaminación y a facilitar su manipulación.

2.11 **Sacamuestras.** Instrumento que se utiliza para extraer el producto de un embalaje.

2.12 **Producto granel.** El que no está envasado.

#### 3 DISPOSICIONES GENERALES.

3.1 Se deberá tomar todo tipo de precauciones para evitar la contaminación del cacao en grano durante el muestreo.

3.2 Las muestras serán identificadas consecutivamente según hayan sido tomadas.

3.3 Las muestras se protegerán contra los cambios en su composición, pérdidas y contaminación por impurezas, etc.

#### 4 MUESTREO.

##### 4.1 Toma de muestras.

4.1.1 Si el cacao en grano que se va a muestrear se presenta en envases de distintos tamaños se deberá



agrupar en lotes de acuerdo con la capacidad de los envases, es decir, en cada lote deberá haber envases de una misma capacidad.

**4.1.2** El número de muestras elementales extraídas completamente al azar, estarán en función de lo indicado en la tabla 1, y serán tomadas en gramos.

**4.1.3** Las muestras elementales que en conjunto forman la muestra global, podrán ser de aproximadamente de 100 a 1.000 gramos, las mismas que serán divididas de acuerdo a lo indicado en el numeral 4.4.1., hasta obtener una muestra reducida de 1.500 gramos.

**4.1.4** Las muestras en los lotes para producto envasado o empacado se obtendrán realizando un muestreo al azar, para lo cual se enumerarán las unidades del lote, se utilizarán los números aleatorios, y el número de muestras según lo establecido en la tabla 1. En los envases la muestra se obtendrá introduciendo el calador (ejemplo Fig. 1) en un solo punto, este deberá penetrar por lo menos hasta la mitad diagonal el saco, y por lo menos en tres puntos seleccionados al azar, cuando se utilice uno de los caladores que se indican como ejemplo en las figuras 2, 3 y 4.

Cuando por condiciones del sitio de almacenamiento no sea posible movilizar el producto, se podrá muestrear las caras visibles del lote.

Cuando las partes interesadas consideren conveniente se hará un corte longitudinal el mismo que deberá llegar hasta el fondo del lote, con lo cual se tendrá dos caras adicionales para muestrear.

Siempre se utilizará un sistema de muestreo aleatorio, para lo cual el número de muestras elementales establecidos en la tabla 1, serán divididas para el número de caras visibles del lote.

**4.1.5** Para muestreo de productos a granel y para obtener una muestra verdaderamente representativa, este deberá efectuarse en el lugar y momento adecuado, que será de preferencia en el momento de la carga, descarga o empaque del producto; cuando no se puedan aplicar los criterios anteriormente indicados, las muestras elementales serán tomadas en forma aleatoria o completamente al azar y a diferentes profundidades, y con uno de los caladores que se indican como ejemplo en las figuras 1 y 5.

El lote de productos a granel se reducirá matemáticamente a sacos de (n) kilogramos y se aplicará la tabla 1.

**4.1.6** Cuando el producto esté en movimiento, durante las operaciones de carga y descarga, la toma de unidades de muestreo se hará a base del tiempo que va a durar el producto en movimiento, y se dividirá dicho tiempo para el número de muestras elementales que se deben tomar de acuerdo a lo establecido en la tabla 1. El resultado indica la frecuencia de la extracción. En la figura 6 se indica un ejemplo de muestreador para productos en movimiento.

El lote de productos a granel se reducirán matemáticamente a sacos de (n) kilogramos y se aplicará la tabla 1.

**Tabla 1. Número de muestras elementales de cacao.**

Tamaño del lote (número de sacos)	Número mínimo de muestras elementales
2 - 8	2
9 - 15	3
16 - 25	5
26 - 50	8
51 - 90	13
91 - 150	20
151 - 280	32
281 - 500	50
501 - 1.200	80
1.201 - 3.200	125
3.201 - 10.000	200
10.001 - 35.000	315
35.001 - 150.000	500
150.001 - 500.000	800

\*el tamaño de la muestra puede cambiar, dependiendo del nivel de inspección acordado entre el comprador y vendedor. Muestreo por atributos.

#### 4.2. *Sacamuestras.*

Dependiendo de la forma de presentación se podrá utilizar:

Calador sacamuestras de compartimiento de doble tubo. Compuesto de dos tubos metálicos concéntricos, ambos con aberturas que coincidan entre sí. El diámetro del tubo interior es ligeramente menor al del tubo exterior, lo cual hace posible la rotación mediante el uso de la manivela. La forma y dimensiones del calador sacamuestras de compartimiento se indican en el ejemplo de la figura 1.

Sacamuestras de los ejemplos de las figuras 2 a 5, y para productos en movimiento ejemplo figura 6.

#### 4.3. *Divisores.*

Divisor tipo Boerner. Aparato constituido por un alimentador (a) una serie de tubos distribuidores (b) y un recipiente (c). Sirve para distribuir el producto, dividiendo las muestras en dos porciones representativas, y también para homogenizar la muestra haciéndola pasar varias veces por el aparato cuarteador que consta en el ejemplo de la figura 8.

#### 4.4. *Reducción por cuarteo.*

4.4.1. Tanto para el cuarteo que se efectúe en forma manual o mecánicamente, la cantidad del producto de la recolección de las muestras elementales se mezclará muy bien para tomar la muestra global, para luego dividirla en 4 partes iguales; se eliminarán dos porciones diagonalmente opuestas, las otras dos se mezclarán de nuevo y se repetirá sucesivamente la operación hasta obtener el tamaño requerido de muestra reducida (1.500 gramos) según lo establecido en el numeral 4.1.3.

#### 4.5. *Condiciones posteriores al muestreo.*

4.5.1. La muestra reducida (1.500 gramos) se dividirá en tres muestras iguales, destinadas: una al vendedor, otra al comprador para destinarla al laboratorio de análisis y la tercera a la entidad que debe actuar en casos de discrepancia.

4.5.2. La muestra reducida y dividida según se indica en el numeral anterior (4.5.1.) Se distribuirá en recipientes adecuados (envases plásticos, etc.), limpios y secos, que se cerrarán herméticamente, se les pondrá los sellos o firmas de las partes interesadas.

4.5.3. Se deberá suscribir un acta de muestreo que incluya la siguiente información.

- a) Número de la norma INEN de referencia: NTE INEN 177.
- b) Dirección donde se realizó el muestreo.
- c) Lugar y fecha donde se realizó el muestreo (establecimiento, bodega, etc.).
- d) Nombre de la compañía comercializadora del cacao en grano y nombre del comprador.
- e) Nombre comercial del cacao en grano (clasificación-tipo, nombre científico).
- f) Número de lote.
- g) Capacidad de los envases del lote, o cantidad a granel.
- h) Número de envases y/o empaques muestreados.
- i) Tamaño de la muestra en gramos del cacao en grano muestreado.
- j) Observaciones sobre condiciones en que se encuentra el cacao en grano.
- k) Nombre y firma de la persona que realizó el muestreo.
- l) Nombre y dirección de las partes interesadas.

4.5.4. La muestra (500 gramos) destinada al análisis deberá enviarse al laboratorio tan pronto como se haya tomado, si no es posible hacer esto, se deberá guardar de tal modo que no se altere la calidad del cacao en grano, el tiempo que dure guardado no deberá ser mayor de 15 días. Las dos muestras restantes se almacenarán por el término de 30 días para efectos de discrepancia entre los interesados, y en condiciones que no afecte la calidad del cacao en grano.

- Figuras de sacamuestras y divisores. (*omitidas*)
- Figura 1. Sacamuestras con compartimientos.
- Figura 2. Sacamuestras abierto.
- Figura 3. Sacamuestras abierto.
- Figura 4. Calador tipo saco
- Figura 5. Pala de mano.
- Figura 6. Muestreador para producto en movimiento.
- Figura 7. Divisor de muestras tipo Boerner.
- Figura 8. Cuarteador.

## **Apéndice Z.**

### **Z.1. Documentos normativos a consultar.**

No requiere de otros documentos normativos para su aplicación.

### **Z.2. Bases de estudio.**

Norma Colombiana ICONTEC 1252. Industrias alimentarias. Cacao. Bogotá. 1988.

Norma Cubana NC 87-05.1987. Cacao beneficiado. Especificaciones de calidad. La Habana, 1982.

Norma Ecuatoriana INEN 255: 1976. Control de calidad. Procedimientos de muestreo y tablas para la inspección por atributos. Quito, 1976.

International Standard ISO 950. Cocoa beans sampling. Geneva, 1973.

Datos proporcionados por varias empresas en la fase de estudio al nivel de campo.