

Implementación de una metodología por HPLC para la determinación de Ocratoxina A en café tostado

Carmen García Calzadilla¹

Grettel García Díaz²

Eyda Otero Fernández-Trevejo³

¹ Instituto Nacional de Higiene Epidemiología y Microbiología (INHEM)/Departamento de Laboratorios, Laboratorio de Aditivos Alimentarios, La Habana, Cuba, carmengcalzadilla@infomed.sld.cu

² Instituto Nacional de Higiene Epidemiología y Microbiología (INHEM)/Departamento de Laboratorios, Laboratorio de Aditivos Alimentarios, La Habana, Cuba

³ Instituto Nacional de Higiene Epidemiología y Microbiología (INHEM)/Departamento de Laboratorios, Laboratorio de Micotoxinas, La Habana, Cuba

Resumen: La Ocratoxina A (OTA) es una micotoxina con propiedades cancerígenas que se puede encontrar en el café, desde el fruto verde hasta la bebida elaborada, por lo que el consumo de este producto puede representar riesgo a la salud de los consumidores. Debido a la elevada toxicidad demostrada de la OTA existen regulaciones sanitarias para su presencia en los alimentos. Teniendo en cuenta que en Cuba no se tienen datos actualizados acerca de la presencia de OTA en los alimentos, en el presente trabajo, desarrollado en el Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología (INHEM) se ha implementado un método por HPLC, con detección por fluorescencia y purificación del compuesto con columnas de inmunoafinidad (IACs), para la determinación de OTA en café tostado, con el objetivo de poder asegurar la calidad sanitaria del producto cubano que se consume y se exporta y obtener datos que puedan servir como base para los estudios de estimación de riesgos. Se analizaron 62 muestras de café tostado molido puro y mezclado, encontrándose que el 61,3% de estas contenían la toxina, en niveles de 0,02-3,24 µg/kg, con concentración promedio de 0,37 µg/kg y porcentajes de recobrado promedio de 80,5%. La implementación y verificación de la metodología analítica permitió cuantificar los niveles de esta micotoxina en el producto y a pesar de que más del 50% de las muestras analizadas estaban contaminadas con la toxina, en todas los niveles se encontraron por debajo del nivel máximo regulado.

Palabras clave: Ocratoxina A, HPLC, café tostado

I. INTRODUCCIÓN

La Ocratoxina A (OTA) es un metabolito tóxico, producido por hongos de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*. Esta micotoxina es la principal representante del grupo de las Ocratoxinas, debido a que es la que se encuentra con mayor frecuencia y la de mayor toxicidad. Su estructura molecular se muestra en la *Figura 1* y consiste en un núcleo de isocumarina unido a una molécula de L-fenilalanina mediante un enlace amida ($C_2OH_{18}ClNO_6$).

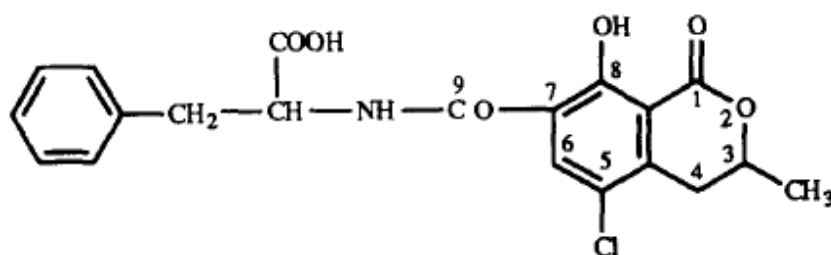


Fig. 1. Estructura química de la OTA

Es químicamente estable y no se afecta por las temperaturas de los procedimientos normales de preparación de los alimentos. Se puede encontrar en cereales, granos, algunas frutas y alimentos derivados, como maíz, cacao, café, uvas, vinos, cerveza; aunque también se ha determinado su presencia en menores concentraciones en carnes y leche de animales que hayan consumido alimentos contaminados (Milicevic, 2009, 2011, 2012). La ocurrencia de la OTA en café desde el fruto verde hasta la bebida de café ha sido ampliamente descrita en la literatura y existe diversidad de criterios sobre el posible efecto reductor que puede tener el tostado de café sobre el contenido de la toxina.

La Agencia Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (IARC) ha clasificado la OTA como posible carcinógeno en humanos, habiéndose encontrado evidencias de sus efectos tóxicos en ratas, ratones y otros animales de experimentación (IARC, 2001), así como también se han descrito efectos teratogénicos y mutagénicos en algunos animales.

La principal fuente de exposición en humanos a esta toxina está dada por el consumo de alimentos contaminados. En los últimos años se han publicado muchos artículos sobre la presencia de OTA en café, siendo este uno de los principales productos susceptibles a contaminación con la micotoxina. Se han encontrado muestras muy contaminadas de café verde de Costa Rica y de La India con concentraciones de OTA de 13 y 11 $\mu\text{g/kg}$ respectivamente, y en cafés de Etiopía concentraciones de 3.8 $\mu\text{g/kg}$ de OTA

(Napolitano y cols., 2007). De Almeida y cols. determinaron la presencia de OTA en el 98.8% de 82 muestras de café instantáneo en Brasil en concentraciones de 0.17-6.29 ng/g (de Almeida y cols., 2007). Vartolomei encontró en muestras de café en granos y tostado, un 83.33% de muestras con OTA en concentraciones 1.96-4.98 µg/kg (Vartolomei, 2013). En café puro Arabica, Robusta y mezclado Arabica/Robusta se ha encontrado OTA en niveles de 0.3-4.9 µg/kg, 0.6-18 µg/kg y 0.3-7.4 µg/kg respectivamente y una mayor concentración de OTA en bebidas elaboradas de café (Mounjouenpou y cols., 2013). Aunque existe una amplia literatura sobre la presencia de OTA en café, en Cuba no se han reportado datos sobre este tema. Las Autoridades de Seguridad Alimentaria de Europa (EFSA) establecen un nivel máximo permisible para la presencia de OTA en café tostado en granos y molido de 5 µg/kg y para café soluble de 10 µg/kg (Commission Regulation (EU) No. 594/2012).

El objetivo del presente trabajo es implementar una metodología por HPLC para la determinación de Ocratoxina A en café tostado, con lo cual se podrá conocer la ocurrencia de este contaminante en el café y se podrá contar con datos acerca de los niveles de OTA en este producto, que puedan servir como base para los estudios de estimación de riesgos.

II. MATERIALES Y METODOS

Las muestras se obtuvieron de café tostado puro y mezclado, destinadas a exportación y consumo por la población cubana. De 62 muestras analizadas, 12 correspondían a café tostado puro y 50 a café tostado mezclado.

La metodología analítica aplicada para la determinación se basó en el método oficial de la AOAC (AOAC 2000.09, 2000). La OTA se extrajo de 15 g de muestra mediante el empleo de una mezcla de Metanol/Hidrógeno Carbonato de Sodio 3% 1:1, que se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de filtrada la solución, se tomaron 10 mL del extracto, que se diluyeron con 30 mL de PBS a pH 7.4 y los 40 mL de la mezcla se pasaron directamente por las IACs donde se produjo el aislamiento selectivo de la OTA por los antígenos inmovilizados. Las columnas se lavaron con 10 mL de agua para eliminar los compuestos interferentes y posteriormente se eluyó la OTA con 4 mL de Metanol. La mezcla se evaporó a sequedad con corriente de nitrógeno y se redisolvió en solución de inyección consistente en Metanol/Agua/Ácido Acético 2:8:1, para ser analizada por HPLC. Para el análisis se empleó un equipo HPLC de Shimadzu con bomba LC-20AT, desgasificador DGU-20A3, autoinyector SIL-20A, columna C18 para cromatografía en fase reversa con precolumna, detector de fluorescencia RF-10A_{XL}, a longitudes de onda de emisión 460 nm y de excitación 333 nm y horno CTO-20A a temperatura de 35°C. El volumen de inyección fue de 100 µL y la velocidad de flujo de 1 mL/min. Se trabajó en régimen isocrático, con una fase móvil consistente en Acetonitrilo/Agua/Ácido Acético 102:96:2 y el pH se ajustó entre 3.17 y 3.21.

Las soluciones de calibración se prepararon de acuerdo a AOAC 2000.09, 2000 y las concentraciones se rectificaron por espectrofotometría. Cada análisis de muestra se realizó por duplicado y el control de calidad analítica se realizó mediante el recobrado en cada serie de muestras a un nivel de 2.47 ng/g. Los resultados de las concentraciones se rectificaron por el recobrado de cada serie.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el rango de calibración de la curva de OTA preparada, la respuesta del HPLC dada por el área bajo la curva resultó correlacionada positivamente con la concentración de OTA, dando un coeficiente de correlación R^2 de 0.99980. En la Figura 2 se muestran los cromatogramas obtenidos para las 5 disoluciones de calibración, así como el gráfico de la curva de calibración, cuya repetibilidad fue satisfactoria, con DS de 0.005 para 10 repeticiones de los 5 puntos de la curva.

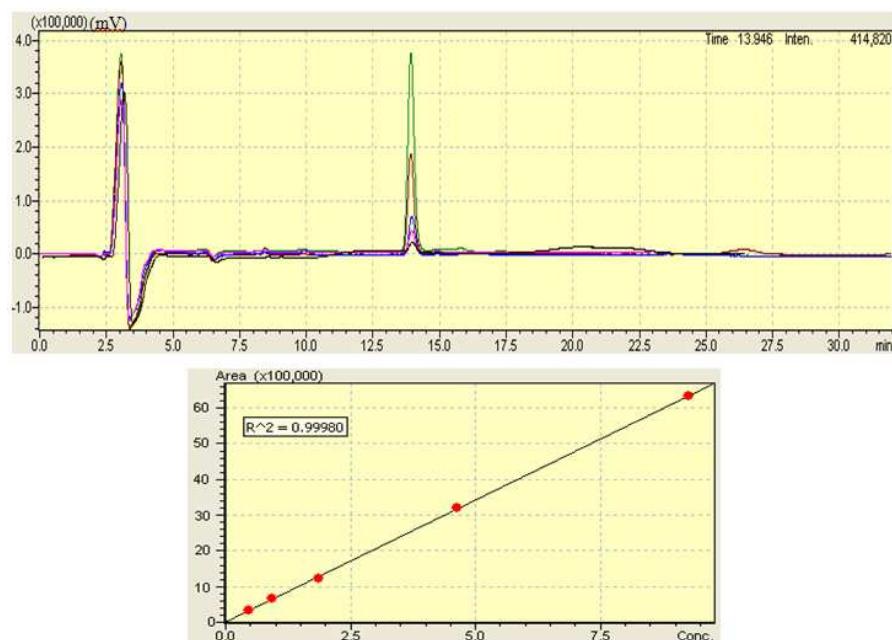


Fig. 2. Cromatogramas obtenidos para las 5 disoluciones de calibración y gráfico de la curva de calibración

En la Figura 3 se expone el cromatograma típico de una muestra con OTA, que carece de interferencias en el tiempo de retención de la misma, como se esperaría con el empleo de IACs. A pesar de que algunos autores plantea que las IACs se pueden reusar manteniendo hasta un 80% de su capacidad de retención del analito (Studer-Rohr, 1995), las IACs se emplearon una sola vez para el análisis debido a que el proceso que ocurre para la elución de la OTA retenida en la columna provoca la desnaturalización de los anticuerpos inmovilizados en la columna por lo que solo tendrán un rendimiento de un solo uso.



Fig. 3. Cromatograma de una muestra con concentración 3.24 ng/g.

En la Figura 4 se muestran los cromatogramas de una muestra con ausencia de OTA, el recobrado de la misma y su comparación con los puntos 3 y 4 de la curva de calibración. De acuerdo a la línea negra, que corresponde a la muestra sin contaminar, no se observa ningún pico de señal al tiempo de retención de la OTA, lo que demuestra ausencia del compuesto en la muestra o una cantidad inferior al límite de detección, sin embargo la línea rosada muestra el pico de la señal al tiempo de retención de la OTA correspondiente al recobrado de la misma muestra, con respuesta analítica proporcional a la concentración, que se ubica entre las concentraciones 1.85 y 4.64 ng/mL, correspondientes a los puntos 3 y 4 de la curva de calibración, respectivamente.

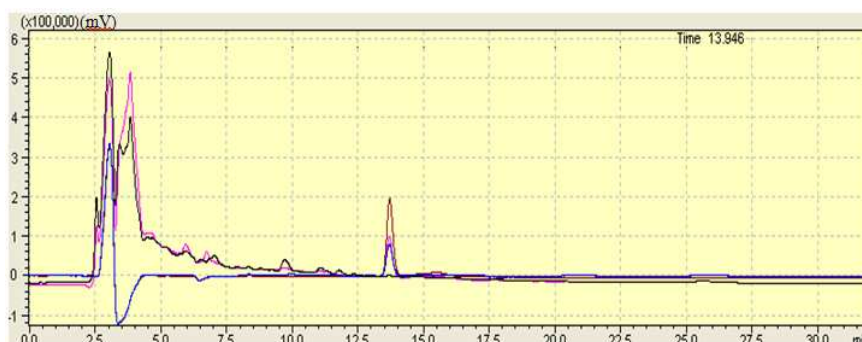


Fig. 4. Cromatogramas de una muestra con ausencia de OTA, recobrado de la misma y los puntos 3 y 4 de la curva de calibración. La línea negra corresponde a la muestra; la rosada al recobrado; la azul al punto 3; la carmelita al punto 4 de la curva de calibración.

En las condiciones de análisis aplicadas el tiempo de retención de la OTA estuvo alrededor de 14 min. Los recobrados obtenidos se encontraron entre 64.2-96.8%, que se consideran adecuados de acuerdo a lo planteado por FAO/WHO, 2014, que para un analito que se encuentra a nivel de trazas en una concentración menor de 10 ng/g se considera adecuado un porcentaje de recuperación de 60-115%.

Se detectó la presencia de OTA en 38 muestras (61.3%), en concentraciones entre 0.02-3.24 ng/g, con concentración promedio de 0.37 ± 0.59 ng/g. Se encontraron 36 valores de concentración entre 0.1-0.8 ng/g (8 valores de concentración mayor o igual de 0.1 ng/g, 13 menor de 0.2 ng/g, 8 por debajo de 0.3 ng/g, 7 entre 0.3 y 0.8 ng/g), mientras que dos muestras tuvieron concentraciones de 1.93 y 3.24 ng/g que provocaron la obtención de un valor de desviación standard elevado. Debido a las condiciones de temperatura y humedad existentes en Cuba se pudiera pensar que los niveles de OTA en el café resultarían elevados, sin embargo las concentraciones determinadas en todas las muestras se encontraron bajas dentro del límite máximo establecido por la EFSA y aunque se pudiera esperar que las muestras de café puro contuvieran mayor concentración de la toxina que la que pudiera encontrarse en el café mezclado con otro producto, no existieron diferencias significativas entre los niveles en ambos productos.

Al comparar los niveles de contaminación obtenidos en ese trabajo con los reportados por diversos autores, se percibe que puede variar en función de la región geográfica, clima, entre otros factores, donde también pueden influir los procesos de cultivo, cosecha, almacenamiento y transportación, existiendo gran variabilidad y no un valor preciso con el cual se deba comparar, pero siempre cumpliendo con la

regulación sanitaria de 5 µg/kg de la Unión Europea. Los resultados de las concentraciones de OTA en café obtenidas en este trabajo son consistentes con los reportados por Lin y colaboradores, en 2005 que encontraron la micotoxina en concentraciones de 0.1-0.5 µg/kg en café tostado y soluble, rango dentro del cual se ubican la mayoría (60.5%) de los valores determinados en este trabajo y también son similares los del café puro (0.51 µg/kg) a los reportados por Raad y colaboradores en 2014 en muestras de café libanes tradicional y tipo Nescafé, donde la concentración promedio fue de 0.508 µg/kg (Raad y cols., 2014). A pesar de que en el presente trabajo no se analizaron las muestras de café especificadas por variedades del producto, los resultados fueron semejantes a las concentraciones obtenidas por Monjouenpou y colaboradores, en 2013 para el café Arabica, que fueron de 0.3-4.9 µg/kg. Teniendo en cuenta que las muestras de café analizadas por los autores corresponden a café tostado puro de una variedad específica, mientras que en este trabajo se analizaron muestras de café puro y mezclado, estos resultados sugieren que pudiera ser importante ampliar el estudio para especificar las concentraciones de OTA presentes en café por variedades del producto.

Sin embargo, las concentraciones obtenidas en el presente trabajo son inferiores a las reportadas por Vartolomei en 2013 en muestras de café tostado en granos y molido de la región de Iasi, en un intervalo de concentraciones de 1.96-4.98 µg/kg (Vartolomei, 2013) y también resultaron inferiores a las determinadas por Dundray y colaboradores en 2013, donde 21 de 24 muestras de café presentaron OTA en concentraciones de 0.98-4.64 µg/kg (Dundray y cols., 2013). Debido a que las condiciones climáticas de Cuba resultan muy propicias para el desarrollo de hongos productores de OTA y para su producción, era de esperar que las muestras de café analizadas presentaran el contaminante, incluso en concentraciones superiores a las encontradas en este trabajo. Sin embargo, estas fueron bajas lo cual es importante y beneficioso, en lo que puede haber incidido el desarrollo de estrategias eficientes de manejo de los cultivos, buenas prácticas agrícolas y de producción, almacenamiento adecuado del producto u otras que hayan evitado que el alimento se contaminara con hongos productores de micotoxinas y hayan dado lugar a la OTA, ya que una vez que la toxina se presenta en el alimento esta no puede eliminarse (CAC/RCP 51-2003; Napolitano y cols., 2007; CAC/RCP 69-2009; Abrunhosa y cols., 2010).

IV. CONCLUSIONES

- La metodología analítica por HPLC implementada en el presente trabajo para la determinación de Ocratoxina A en café tostado permitió cuantificar de manera confiable los niveles de esta micotoxina en el producto, a partir de lo cual se pudo contar con datos acerca de la contaminación del café con esta toxina.
- La cuantificación de Ocratoxina A en las muestras de café tostado analizadas permitió establecer que el 60.3% de las mismas estaban contaminadas, aunque en todas la micotoxina se encontró en un nivel bajo dentro del Nivel Máximo regulado. Estos resultados resultan satisfactorios, ya que teniendo en cuenta que es inevitable la aparición de OTA en los alimentos y que las condiciones climáticas de Cuba son muy apropiadas para ello, pudiera esperarse niveles de contaminación más elevados que los determinados en este trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRUNHOSA, L.; PATERSON, R. R. M.; VENÂNCIO, A. Biodegradation of Ochratoxin A for Food and Feed Decontamination. *Toxins*, 2010, 2, 1078-1099.
- AOAC, 2000.09. Official Method 2000.09 Ochratoxin A in roasted coffee. Immunoaffinity Column HPLC Method, First Action 2000. Association of Official Analytical Chemist (AOAC), 2000.
- AOAC, 1998. Peer-Verified Methods Program. Manual on policies and procedures, Arlington VA 22201-3301, USA. Association of Official Analytical Chemist (AOAC), 1998.
- CAC/RCP 51-2003. Anteproyecto de Anexo para prevenir y reducir la contaminación del sorgo por las aflatoxinas y la ochratoxina A (Código de Prácticas para prevenir y reducir la contaminación de los cereales por micotoxinas).
- CAC/RCP 69-2009. Code of Practice for the prevention and reduction of Ochratoxin A contamination in coffee.
- Commission Regulation (EC) No 123/2005, 26 January 2005 amending Regulation (EC) No 466/2001 as regards ochratoxin A. *Official Journal of the European Union*, 2005.
- Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of the European Union*, 2006.
- Commission Regulation (EU) No 594/2012 of 5 July 2012 amending Regulation (EC) 1881/2006 as regards the maximum levels of the contaminants ochratoxin A, non dioxin-like PCBs and melamine in foodstuffs. *Official Journal of the European Union*, 2012.
- DE ALMEIDA, A. P.; ALABURDA, J.; SHUNDO, L.; RUVIERI, V.; NAVAS, S. A.; LAMARDO, L.; SABINO, M. Ochratoxin A in Brazilian Instant Coffee. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2007, 38: 300-303.
- DUNDRAY, V.; PACIN, A. Occurrence of Ochratoxin A in coffee beans, ground roasted coffee and soluble coffee and method validation. *Food Control*, 2013, 30, 2, 675-678.
- IARC, 2001. World Health Organization International Agency for Research on Cancer, IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Volume 56, Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins, Summary of Data Reported and Evaluation.
- LIN, L-CH.; CHEN, P-C.; FU, Y-M.; SHIH, D. Y-C. Ochratoxin A Contamination in Coffees, Cereals, Red Wines and Beers in Taiwan. *Journal of Food and Drug Analysis*, Vol. 13, No. 1, 2005, 84-92.
- MILIČEVIĆ, D. R.; JOVANOVIĆ, M.; MATEKALO-SVERAK, V. F.; RADIČEVIĆ, T.; PETROVIĆ, M. M.; VUKOVIĆ, D. Ž. Residue of ochratoxin A in chicken tissues-risk assessment. *Arch Oncol*, 2011, 19, 1-2, 23-7.
- MILIČEVIĆ, D. R.; JURIĆ, V. B.; STEFANOVIĆ, S. M.; VESKOVIĆ-MORAČANIN, S. M.; JANKOVIĆ, S. I. Analysis of Ochratoxin A in pig tissues using High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) and Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC/MS/MS) as confirmative methods. *Zbornik Matice srpske za prirodne nauke / Proc. Nat. Sci, Matica Srpska Novi Sad*, 2009, 117, 51-61.
- MILIČEVIĆ, D. R.; STEFANOVIĆ, S. M.; JANKOVIĆ, S. I.; RADIČEVIĆ, T. Risk analysis and exposure assessment of Ochratoxin A in Serbia. *Vet. World*, 2012, Vol. 5 (7), 412-416.
- MOUNJOUENPOU, P.; DURAND, N.; GUIRAUD, J-P.; MABOUNE TETMOUN, A. S.; GUEULE, D.; GUYOT, B. Assessment of Exposure to Ochratoxin A (OTA) through Ground Roasted Coffee in two Cameroonian Cities: Yaounde and Douala. *International Journal of Food Science and Nutrition Engineering*, 2013, 3(3), 35-39.
- NAPOLITANO, A.; FOGLIANO, V.; TAFURI, A.; RITIENI, A. Natural Occurrence of Ochratoxin A and Antioxidant Activities of Green and Roasted Coffees and Corresponding Byproducts, septiembre 2007.
- RAAD, F.; NASREDDINE, L.; HILAN, C. BARTOSIK, M.; PARENT-MASSIN, D. Dietary exposure to aflatoxins, ochratoxin A and deoxynivalenol from a total diet study in an adult urban Lebanese population. *Food and Chemical Toxicology*, 2014, 73, 35-43.
- STUDER-ROHR, I.; DIETRICH, D. R.; SCHLATTER, J.; SCHLATTER, C. Ochratoxin A and Coffee. *Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene*, 1994, 85, 719-727.
- STUDER-ROHR, I.; DIETRICH, D. R.; SCHLATTER, J.; SCHLATTER, C. The Occurrence of Ochratoxin A in Coffee. *Food and Chemical Toxicology*, 1995, 33, 5, 341-355.
- VARTOLOMEI, A. Assessment of dietary intake of Ochratoxin A. effects on human and animal pathology. Abstract of Doctoral Dissertation. University of Medicine and Pharmacy "Grigore T. Popa" IAȘI, Faculty of Pharmacy.