



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Unidad de Posgrado

**Evaluación de nivel contaminante de Ocratoxina A por  
columnas de inmunoafinidad y Cromatografía Líquida  
de Alta Afinidad (HPLC), en *Coffea arabica* L. (café  
verde y tostado) del distrito Perené, provincia  
Chanchamayo**

**TESIS**

Para optar el Grado Académico de Doctor en Farmacia y

Bioquímica

**AUTOR**

Felix Hugo MILLA FLORES

**ASESOR**

Dr. Américo Jorge CASTRO LUNA

Lima, Perú

2022



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

## Referencia bibliográfica

---

Milla F. Evaluación de nivel contaminante de Ocratoxina A por columnas de inmunoafinidad y Cromatografía Líquida de Alta Afinidad (HPLC), en *Coffea arabica* L. (café verde y tostado) del distrito Perené, provincia Chanchamayo [Tesis de doctorado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Unidad de Posgrado; 2022.

---

## Metadatos complementarios

| <b>Datos de autor</b>            |   |
|----------------------------------|---|
| Nombres y apellidos              | Felix Hugo Milla Flores   |
| Tipo de documento de identidad   | DNI   |
| Número de documento de identidad | 08070390  |
| URL de ORCID                     | <a href="https://orcid.org/0000-0002-6384-4302">https://orcid.org/0000-0002-6384-4302</a> |
| <b>Datos de asesor</b>           |   |
| Nombres y apellidos              | Dr. Américo Jorge Castro Luna   |
| Tipo de documento de identidad   | DNI   |
| Número de documento de identidad | 25455526  |
| URL de ORCID                     | <a href="https://orcid.org/0000-0001-8012-967X">https://orcid.org/0000-0001-8012-967X</a> |
| <b>Datos del jurado</b>          |   |
| <b>Presidente del jurado</b>     |   |
| Nombres y apellidos              | Dra. Luisa Pacífica Negrón Ballarte   |
| Tipo de documento                | DNI   |
| Número de documento de identidad | 07237298  |
| <b>Miembro del jurado 1</b>      |   |
| Nombres y apellidos              | Dr. Américo Jorge Castro Luna   |
| Tipo de documento                | DNI   |
| Número de documento de identidad | 25455526  |
| <b>Miembro del jurado 2</b>      |   |
| Nombres y apellidos              | Dra. Norma Julia Ramos Cevallos   |
| Tipo de documento                | DNI   |
| Número de documento de identidad | 25469870  |
| <b>Miembro del jurado 3</b>      |   |
| Nombres y apellidos              | Dr. José Alfonso Apesteagua Infantes  |

|  |   |
|--|---|
| Tipo de documento                                      | DNI   |
| Número de documento de identidad                       | 09359857  |
| <b>Datos de investigación</b>                          |   |
| Línea de investigación                                 | B.2.1.1. Plantas medicinales con potencial Farmacéutico y Productos Naturales: estudios Fitoquímicos, estudios Toxicológicos, estudios Farmacológico, proceso de su industrialización                                     |
| Grupo de investigación                                 | RENATU – Recursos Naturales   |
| Agencia de financiamiento                              | Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Vicerrectorado de Investigación y Posgrado. Programa de Promoción de Tesis de Postgrado. A17040126b-PTPDOCTO.   |
| Ubicación geográfica de la investigación               | Edificio: Química Orgánica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica-UNMSM País: Perú<br>Departamento: Lima Provincia: Lima<br>Distrito:<br>Cercado de Lima Latitud: -<br>12.054562191590417<br>Longitud: -77.0233067570757 |
| Año o rango de años en que se realizó la investigación | Marzo 2018 - diciembre 2021   |
| URL de disciplinas OCDE                                | Otras ciencias médicas.<br><a href="https://purl.org/perepo/ocde/ford#3.05.00">https://purl.org/perepo/ocde/ford#3.05.00</a>  |



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**  
Universidad del Perú. Decana de América  
**Facultad de Farmacia y Bioquímica**  
**Unidad de Posgrado**



**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR**  
**AL GRADO ACADÉMICO DE DOCTOR EN FARMACIA Y BIOQUÍMICA**

Siendo las **16:00 horas del 13 de abril de 2022** se reunieron mediante la plataforma de Google Meet de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, el Jurado Evaluador de Tesis, presidido por la Dra. Luisa Pacífica Negrón Ballarte e integrado por los siguientes miembros: Dr. Américo Jorge Castro Luna (Asesor), Dra. Norma Julia Ramos Cevallos y Dr. José Alfonso Apesteagua Infantes; para la sustentación oral y pública de la tesis intitulada: **“EVALUACIÓN DE NIVEL CONTAMINANTE DE OCRATOXINA A POR COLUMNAS DE INMUNOAFINIDAD Y CROMATOGRFÍA LIQUIDA DE ALTA AFINIDAD (HPLC), EN *Coffea arabica* L. (CAFÉ VERDE Y TOSTADO) DEL DISTRITO PERENÉ, PROVINCIA CHANCHAMAYO”**, presentado por el Magíster en Docencia e Investigación Universitaria **Felix Hugo Milla Flores**.

Acto seguido se procedió a la exposición de la tesis, con el fin de optar al Grado Académico de **Doctor en Farmacia y Bioquímica**. Formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por el graduando.

A continuación, el Jurado Evaluador de Tesis procedió a la calificación, la que dio como resultado el siguiente calificativo:

..... **DIECINUEVE (19) EXCELENTE** .....

Luego, la Presidenta del Jurado recomienda que la Facultad proponga que se le otorgue al Magíster en Docencia e Investigación Universitaria **Felix Hugo Milla Flores** el Grado Académico de **Doctor en Farmacia y Bioquímica**.

Siendo las **05:25** hrs. se levanta la sesión.

Se extiende el acta en Lima, a las **05:35** hrs. del 13 de abril de 2022.

.....  
Dra. Luisa Pacífica Negrón Ballarte (P.P., D.E.)  
Presidente

.....  
Dr. Américo Jorge Castro Luna (P. P., D.E.)  
Miembro - Asesor

.....  
Dra. Norma Julia Ramos Cevallos (P. P., T.C.)  
Miembro

.....  
Dr. José Alfonso Apesteagua Infantes (P. P., T.C.)  
Miembro

Observaciones: Ninguno

## **DEDICATORIA**

A mis queridos padres Pablo y Hortencia que me siguen guiando desde el cielo.

A mis hermanos Santiago, Wilfredo, Javier y muy especialmente para Adolfo por su apoyo incondicional y moral.

A mis queridas hijas Katy y Paola por su amor y cariño.

A mi querida esposa Gloria por su amor y apoyo permanente en cada una de las etapas de este proyecto.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi asesor de tesis Dr. Américo Castro Luna por haberme involucrado en el mundo de las Micotoxinas y supervisado el desarrollo de este trabajo científico.

A la Ingeniera Nadia Rodríguez integrante del equipo LABICER- UNI, por el apoyo técnico.

Al Vicerrectorado de Investigación y Posgrado UNMSM por haber brindado el financiamiento del presente trabajo de investigación



## RESUMEN

La Ocratoxina A (OTA) es una micotoxina cancerígena y presenta una fuerte estabilidad térmica difícil de eliminar de los piensos y alimentos. Se encuentra en muchos alimentos de primera necesidad y elevado consumo, por lo cual, la presente investigación planteó evaluar el nivel contaminante de OTA en *Coffea arabica* L. de tipo tostado y verde. La colecta de las muestras de café se realizó en la zona cafetalera de Chanchamayo, Departamento de Junín. El proceso de purificación se llevó a cabo mediante columnas de inmunoafinidad (IAC) y la cuantificación por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC), con detector de fluorescencia. Asimismo, se realizaron pruebas de recuperación a los niveles contaminantes de 5 µg/kg y 10 µg/kg, para café tostado y verde, respectivamente. El porcentaje de recuperación al nivel 5 µg/kg fue de 76,2% para el café tostado y al nivel de 10 µg/kg fue de 74,94 % para el café verde. Las muestras de café tostado presentaron concentraciones de 0,216 y 0,444 ppb de OTA, mientras que, de las dos muestras de café verde, una muestra presentó un valor de 0.057 ppb y la otra no superó el límite de detección de 0,019 µg/L. Se concluye que los solventes utilizados son útiles para extraer ocratoxina A en muestras de café, corroboradas por las pruebas de recuperación para los dos tipos de café al encontrarse en rangos aceptables, evidenciando que las muestras de café verde y tostado no superan los límites máximos permitidos por la regulación nacional e internacional.

**Palabras clave:** Ocratoxina A, Columna de Inmunoafinidad, Cromatografía Líquida de Alta Afinidad, fluorescencia.

## **ABSTRACT.**

Ochratoxine A (OTA) is a cancer mycotoxine presenting a strong stabilized thermic and difficult to eliminate food for animals and food. On the trouve of names of basic foodstuffs and strong consommation, therefore, the present request to assess the level of contaminant of the OTA in the *Coffea arabica* L. The collecte d'échantillons de café a été réalisée dans the Chanchamayo coffee culture zone, Junín department. The process of purification is carried out in the process of colonnes d'immunoaffinité (IAC) and quantification by liquid chromatography with high efficacy (HPLC). avec detecteur de fluorescence. From time to time, the recovery tests are carried out at the level of pollutants of 5 g / kg and 10 g / kg, respectively for the coffee torréfié et vert. Pourcentage of recovery at 5 µg / kg level of 76.2% for roasted coffee and at 10 µg / kg level of 74.94% for vertical coffee. Exchanging coffee beans with concentrations of 0.216 and 0.444 ppb of OTA, so that, with respect to the deux echantillons of vertical coffee, an exchanging coffee has a value of 0.057 ppb and the other dépassait passes the detection limit of 0.019 µg/L. It is concluded that the solutions used are useful for extraire the ochratoxine in the coffee shops, I corroborated by the recovery tests for the deux types of coffee that they are located in the acceptable plages, montrant that the coffee shops are available vert et Tower and dépassent past the maximum limits authorized par regulation nationale et internationale.

**Keys Words:** Ochratoxin A, Immunoaffinity Columns, High Efficiency Liquid Chromatography, fluorescence.

## RÉSUMÉ.

L'ochratoxine A (OTA) est une mycotoxine cancérigène présentant une forte stabilité thermique et difficile à éliminer des aliments pour animaux et des denrées alimentaires. On le trouve dans de nombreux aliments de base et à forte consommation, par conséquent, la présente enquête a proposé d'évaluer le niveau de contaminant de l'OTA dans le *Coffea arabica* L. La collecte d'échantillons de café a été réalisée dans la zone de culture du café de Chanchamayo, département de Junín. Le processus de purification a été réalisé à l'aide de colonnes d'immunoaffinité (IAC) et de quantification par chromatographie liquide à haute efficacité (HPLC). Avec détecteur de fluorescence. De même, des tests de récupération ont été réalisés à des niveaux de contaminants de 5 g/kg et 10 g/kg, respectivement pour le café torréfié et vert. Le pourcentage de récupération au niveau de 5 µg/kg était de 76,2 % pour le café torréfié et au niveau de 10 µg/kg il était de 74,94 % pour le café vert. Les échantillons de café torréfié présentaient des concentrations de 0,216 et 0,444 ppb d'OTA, tandis que, sur les deux échantillons de café vert, un échantillon présentait une valeur de 0,057 ppb et l'autre ne dépassait pas la limite de détection de 0,019 µg/L. Il est conclu que les solvants utilisés sont utiles pour extraire l'ochratoxine A dans les échantillons de café, corroboré par les tests de récupération pour les deux types de café car ils se situent dans des plages acceptables, montrant que les échantillons de café vert et torréfié ne dépassent pas les limites maximales autorisées par réglementation nationale et internationale.

**Clés :** Ochratoxine A, Colonne d'immunoaffinité, Chromatographie en Phase Liquide élevée, fluorescence.

## ÍNDICE GENERAL

|   |      |
|---|------|
| Dedicatoria.....  | ii   |
| Agradecimiento.....   | iii  |
| <b>RESUMEN</b> .....  | iv   |
| <b>ABSTRACT</b> .....   | v    |
| <b>RÉSUMÉ</b> .....   | vi   |
| Índice de tablas.....   | ix   |
| Índice de figuras.....  | xi   |
| Índice de abreviaturas.....                                   | xiii |
| <b>CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN</b> .....                         | 1    |
| 1.1 Objetivo general.....                                     | 2    |
| 1.2 Objetivos específicos.....                                | 2    |
| <b>CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO</b> .....                       | 3    |
| 2.1 Antecedentes.....   | 3    |
| 2.2 Aspectos teóricos.....                                    | 6    |
| 2.2.1 Clasificación Taxonómica.....                           | 6    |
| 2.2.2 Aspectos Botánicos.....                                 | 7    |
| 2.2.3 Distribución Geográfica.....                            | 8    |
| 2.2.4 Distribución Geográfica e Importancia para el Perú..... | 9    |
| 2.2.5 Valor nutricional.....                                  | 10   |
| 2.2.6 Variedades de café.....                                 | 11   |
| 2.2.7 Importancia del cultivo del café.....                   | 16   |
| 2.2.8 Limitaciones de los cultivos de café.....               | 19   |
| 2.2.9 Impacto de la Ocratoxina A en café.....                 | 27   |
| 2.2.10 Impacto de la Ocratoxina A en animales .....           | 27   |
| 2.2.11 Métodos de cuantificación.....                         | 30   |
| <b>CAPÍTULO III. METODOLOGÍA</b> .....                        | 33   |
| 3.1 Instrumentos de Laboratorio.....                          | 33   |
| 3.1.1 Materiales.....   | 33   |
| 3.1.2 Equipos.....  | 33   |
| 3.1.3 Insumos o químicos .....                                | 34   |
| 3.2 Parte experimental.....                                   | 34   |

|   |           |
|---|-----------|
| 3.2.1 Colecta de los granos de café.....                        | 34        |
| 3.2.2 Lugar de ejecución de la investigación.....               | 35        |
| 3.2.3 Tratamiento de los granos de café.....                    | 35        |
| 3.2.4 Extracción de OTA con columnas insumo afinidad.....       | 35        |
| 3.2.5 Preparación de los estándares y curva de calibración..... | 35        |
| 3.2.6 Elección de OTA por MPLE.....                             | 36        |
| 3.2.7 Pruebas de recuperación.....                              | 36        |
| 3.2.8 Cuantificación por HPLC.....                              | 36        |
| 3.2.9 Cálculo del límite de detección.....                      | 37        |
| 3.2.10 Límite de Cuantificación (LDC/LQ).....                   | 38        |
| <b>CAPÍTULO IV. RESULTADOS .....</b>                            | <b>39</b> |
| 4.1 Curva de calibración.....                                   | 39        |
| 4.2 Cromatogramas de los estándares de OTA.....                 | 41        |
| 4.3 Cromatogramas de las muestras.....                          | 51        |
| 4.3.1 Café verde.....   | 51        |
| 4.3.2 Café tostado.....   | 55        |
| 4.4 Pruebas de recuperación.....                                | 59        |
| 4.5 Límite de detección.....                                    | 63        |
| <b>CAPÍTULO V. DISCUSIÓN.....</b>                               | <b>65</b> |
| <b>CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES .....</b>                          | <b>68</b> |
| <b>CAPÍTULO VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>            | <b>69</b> |
| <b>CAPÍTULO VIII. ANEXOS.....</b>                               | <b>79</b> |

## ÍNDICE DE TABLAS

|   |    |
|---|----|
| Tabla 1. Ejemplos relevantes de variedades comerciales de Café y principales características.....             | 15 |
| Tabla 2. Datos de los estándares de ocratoxina A.....   | 39 |
| Tabla 3. Cuadro estadístico de la curva de calibración.....   | 39 |
| Tabla 4. Datos cromatográficos del primer estándar de ocratoxina A (1 <sup>ra</sup> inyección).....           | 41 |
| Tabla 5. Datos cromatográficos del primer estándar de ocratoxina A (2 <sup>da</sup> inyección).....           | 42 |
| Tabla 6. Datos cromatográficos del primer estándar de ocratoxina A (1 <sup>ra</sup> inyección).....           | 43 |
| Tabla 7. Datos cromatográficos del segundo estándar de ocratoxina A (2 <sup>da</sup> inyección).....          | 44 |
| Tabla 8. Datos cromatográficos del tercer estándar de ocratoxina A (1 <sup>ra</sup> inyección).....           | 45 |
| Tabla 9. Datos cromatográficos del tercer estándar de ocratoxina A (2 <sup>da</sup> inyección).....           | 46 |
| Tabla 10. Datos cromatográficos del cuarto estándar de ocratoxina A (1 <sup>ra</sup> inyección).....          | 47 |
| Tabla 11. Datos cromatográficos del cuarto estándar de ocratoxina A (2 <sup>da</sup> inyección).....          | 48 |
| Tabla 12. Datos cromatográficos del quinto estándar de ocratoxina A (1 <sup>ra</sup> inyección).....          | 49 |
| Tabla 13. Datos cromatográficos del quinto estándar de ocratoxina A (2 <sup>da</sup> inyección).....          | 50 |
| Tabla 14. Datos cromatográficos de la primera muestra problema de café verde (1 <sup>ra</sup> inyección)..... | 51 |
| Tabla 15. Datos cromatográficos de la primera muestra problema de   |    |

|  |    |
|--|----|
| café verde (2 <sup>ra</sup> inyección).....  | 52 |
| Tabla 16. Datos cromatográficos de la segunda muestra problema de<br>café verde (1 <sup>ra</sup> inyección).....   | 53 |
| Tabla 17. Datos cromatográficos de la segunda muestra problema de<br>café verde (2 <sup>ra</sup> inyección).....   | 54 |
| Tabla 18. Datos cromatográficos de la primera muestra problema de<br>café tostado (1 <sup>ra</sup> inyección)..... | 55 |
| Tabla 19. Datos cromatográficos de la primera muestra problema de<br>café tostado (2 <sup>ra</sup> inyección)..... | 56 |
| Tabla 20. Datos cromatográficos de la segunda muestra problema de<br>café tostado (1 <sup>ra</sup> inyección)..... | 57 |
| Tabla 21. Datos cromatográficos de la segunda muestra problema de<br>café tostado (2 <sup>ra</sup> inyección)..... | 58 |
| Tabla 22. Datos cromatográficos contaminación de café verde<br>(1 <sup>ra</sup> inyección).....                    | 59 |
| Tabla 23. Datos cromatográficos contaminación de café verde<br>(2 <sup>ra</sup> inyección).....                    | 60 |
| Tabla 24. Datos cromatográficos contaminación de café tostado<br>(1 <sup>ra</sup> inyección).....                  | 61 |
| Tabla 25. Datos cromatográficos contaminación de café tostado<br>(2 <sup>da</sup> inyección).....                  | 62 |
| Tabla 26. Parámetros necesarios para determinar el LDT Y QL.....   | 63 |
| Tabla 27. Interpretación de los niveles contaminantes de OTA en<br>muestras de Café verde y Café tostado.....      | 64 |
| Tabla 28. Porcentaje de recuperación de OTA en muestras de<br>Café verde y Café tostado.....                       | 64 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Figura 1. Fotografía del cultivo de <i>Coffea arabica</i> L.....                                      | 6  |
| Figura 2. Representación gráfica de <i>Coffea arabica</i> L.....                                      | 8  |
| Figura 3. Distribución geográfica de los cultivos de <i>Coffea</i> ,.....                             | 9  |
| Figura 4. Hojas y frutos de <i>Coffea arabica</i> L.....  | 13 |
| Figura 5. Granos de <i>Coffea canephora</i> .....   | 14 |
| Figura 6. Estructura química de algunas micotoxinas presentes en alimentos.....                       | 21 |
| Figura 7. Tipos de ocratoxinas.....   | 26 |
| Figura 8. Variantes de Ocratoxina.....  | 26 |
| Figura 9. Gráfico de dispersión del área de los picos vs concentración de OTA...                      | 40 |
| Figura 10. Cromatograma HPLC del primer estándar de ocratoxina A<br>(1 <sup>ra</sup> inyección).....  | 41 |
| Figura 11. Cromatograma HPLC del primer estándar de ocratoxina A<br>(2 <sup>da</sup> inyección).....  | 42 |
| Figura 12. Cromatograma HPLC del primer estándar de ocratoxina A<br>(1 <sup>ra</sup> inyección).....  | 43 |
| Figura 13. Cromatograma HPLC del segundo estándar de ocratoxina A<br>(2 <sup>da</sup> inyección)..... | 44 |
| Figura 14. Cromatograma HPLC del tercer estándar de ocratoxina A<br>(1 <sup>ra</sup> inyección).....  | 45 |
| Figura 15. Cromatograma HPLC del tercer estándar de ocratoxina A<br>(2 <sup>ra</sup> inyección) ..... | 46 |
| Figura 16. Cromatograma HPLC del cuarto estándar de ocratoxina A<br>(1 <sup>ra</sup> inyección).....  | 47 |



|   |    |
|---|----|
| Figura 17. Cromatograma HPLC del cuarto estándar de ocratoxina A<br>(2 <sup>da</sup> inyección).....            | 48 |
| Figura 18. Cromatograma HPLC del quinto estándar de ocratoxina A<br>(1 <sup>ra</sup> inyección).....            | 49 |
| Figura 19. Cromatograma HPLC del quinto estándar de ocratoxina A<br>(2 <sup>da</sup> inyección...)              | 50 |
| Figura 20. Cromatograma HPLC de la primera muestra problema de<br>café verde (1 <sup>ra</sup> inyección) .....  | 51 |
| Figura 21. Cromatograma HPLC de la primera muestra problema de<br>café verde (2 <sup>da</sup> inyección).....   | 52 |
| Figura 22. Cromatograma HPLC de la segunda muestra problema de<br>café verde (2 <sup>ra</sup> inyección).....   | 53 |
| Figura 23. Cromatograma HPLC de la primera muestra problema de<br>café tostado (1 <sup>ra</sup> inyección)..... | 54 |
| Figura 24. Cromatograma HPLC de la primera muestra problema de<br>café tostado (2 <sup>da</sup> inyección)..... | 56 |
| Figura 25. Cromatograma HPLC de la segunda muestra problema de<br>café tostado (1 <sup>ra</sup> inyección)..... | 57 |
| Figura 26. Cromatograma HPLC de la segunda muestra problema de<br>café tostado (2 <sup>ra</sup> inyección)..... | 58 |
| Figura 27. Cromatograma del porcentaje de recuperación inyección 1.....   | 59 |
| Figura 28. Cromatograma del porcentaje de recuperación inyección 2.....   | 60 |
| Figura 29. Cromatograma del porcentaje de recuperación al.. ct iny 1.....                                       | 61 |
| Figura 30. Cromatograma del porcentaje de recuperación al.. ct iny 2.....                                       | 62 |

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

|         |  |
|---------|--|
| OTA     | Ocratoxina A   |
| IAC     | Columna de Inmunofinidad   |
| HPLC    | Cromatografía Líquida de Alta Afinidad   |
| nm      | nanometros   |
| µg      | microgramo   |
| ppb     | partes por billón  |
| µg/mL   | microgramos por mililitro  |
| HPLC-FD | Cromatografía de Alta Afinidad-Detector de Fluorescencia   |
| ng/g    | nano gramo por gramo   |
| FAO/OMS | Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y<br>La Alimentación/ Organización Mundial de la Salud |
| RASFF   | Alerta rápida para alimentos y piensos en UE   |
| EFSA    | Autoridad europea de seguridad alimentaria   |
| HACCP   | Análisis de peligros y puntos críticos de control  |
| IARC    | International Agency for Research on Cancer  |
| BEN     | Nefropatía endémica de los Balcanes  |
| JECFA   | Comité mixto FAO/OMS expertos en aditivos alimentarios   |
| OTB     | Ocratoxina B   |
| OTC     | Ocratoxina C   |
| ZEA     | Zearalenona  |
| AF      | Aflatoxinas  |
| FB      | Fumonisinias   |
| DON     | Desoxinivalenol  |
| CIT     | Citrinina  |
| NIV     | Nivalenol  |
| PA      | Ácido penicílico   |
| TLC     | Cromatografía de capa delgada  |
| ELISA   | Enzyme-linked Immuno Sorbent Assay   |
| LDD     | Límite de detección  |
| QL      | Limite de cuantificación   |

## CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

El café es una de las bebidas de mayor consumo en el mundo, y también su incremento es notorio en nuestro país, por lo que debe estar sujeto al control de las autoridades sanitarias para prevenir, minimizar o eliminar riesgos de contaminación. Los hongos filamentosos *Aspergillus ochraceus* y *Penicillium viridicatum*; están presentes en el café verde y tostado, cereales, entre otros<sup>1</sup>.

Dichos hongos generan diversas micotoxinas, destacando la ocratoxina A, con características nefrotóxica, hepatotóxica, teratogénica e inmunotóxica para varias especies de animales y causa tumores de riñón e hígado en ratones y ratas<sup>2</sup>.

La OTA es la toxina más común, contaminando varios alimentos y piensos en todo el mundo, se encuentra en diversos alimentos y piensos, además de los indicados anteriormente también se encuentra en cacao, frutos secos, vino, pescados, aves, leche, productos cárnicos, arroz, trigo, nueces y especias<sup>3,4</sup>.

Actualmente el consumo de café es alrededor de nueve millones de toneladas al año a nivel mundial, en nuestra región Brasil es primer productor con 1,3 toneladas y el Perú con 253 toneladas ocupa el noveno lugar en el mundo.

La regulación sobre el control de ocratoxina A en productos destinados al consumo humano o animal sugiere que los niveles entre 10 a 20 partes por mil millones (ppb) pueden causar problemas de salud. La comunidad europea ha regulado la presencia de ocratoxina A en 5 ppb en las muestras de café<sup>5</sup>.

En nuestro país, pocos estudios se han realizado en la detección de micotoxinas en el café, por lo cual, el presente estudio pretende establecer el nivel de contaminación de OTA y para ello utilizamos metodología sensibles y modernas, como columnas de inmunoafinidad, cromatografía líquida de alta eficiencia asociada a un detector de fluorescencia.

## **1.1 OBJETIVO GENERAL.**

Detectar por HPLC el nivel de contaminación de Ocratoxina A en el café verde y tostado del distrito de Perené, provincia de Chanchamayo.

## **1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

- Determinar por HPLC la presencia de Ocratoxina A en el café verde del distrito de Perené, provincia de Chanchamayo.
- Determinar por HPLC la presencia de Ocratoxina A en el café tostado del distrito de Perené, provincia de Chanchamayo.
- Comparar los valores detectados de Ocratoxina A en el café verde y tostado con las normas internacionales para establecer el nivel de contaminación.

## CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

### 2.1 ANTECEDENTES

Benites Ana, *et al.*, 2017 realizaron un estudio sobre café tostado molido, arábica y robusta que se comercializan en Portugal y otros países, el objetivo fue evaluar la presencia de ocratoxina A, mediante cromatografía líquida de alta resolución con detección de fluorescencia (HPLC-FD). Las recuperaciones de OTA presentaron valores entre un 95,5 y 109,8 %. Los límites de detección y cuantificación en café fueron 0,266 y 0,5 µg/Kg para las variedades arábica y robusta. La media de contaminación por ocratoxina A detectada en el café del mercado portugués fue de 1,84 y 1,45 µg/kg para el café tostado y molido, respectivamente<sup>6</sup>.

Geremew T, *et al.*, en el año 2016 realizaron un estudio, sobre hongos toxigénicos y ocratoxina A en el café etíope, el objetivo del estudio fue describir los niveles de contaminación en el café consumido por la comunidad local. La zona de recolección fue Jimma de Oromiya en Etiopia. La incidencia del total de hongos del tipo *Aspergillus* (79%), *Fusarium* (8%) y *Penicillium* (5%), fueron los géneros toxigénicos predominantes. El nivel medio de OTA en el café etíope vendido localmente fue de 1,53 µg / kg.<sup>7</sup>

Drunday V, *et al.*, en el año 2013, planteo el objetivo de determinar ocratoxina A en granos de café verde, tostado molido y café soluble y validación del método. Las muestras enriquecidas con niveles de 1,98 a 10,18 µg / kg para café soluble tuvieron una tasa de recuperación promedio de 79,4%. Los límites de detección y cuantificación en el café fueron 0,02 µg / kg y 0,05 µg / kg respectivamente. Los resultados mostraron que un alto porcentaje (69%) del café estaba contaminado con OTA a diferentes niveles. La mediana obtenida para el café verde fue de 2,7 µg / kg, para el café tostado molido fue de 0,24 µg / kg y de 0,43 µg / kg para el café soluble<sup>8</sup>.

Taniwaki M, *et al.*, en el año 2013 propusieron investigar la presencia de hongos ocratoxigénicos y ocratoxina A en granos de café defectuoso, en los estados de Minas Gerais y São Paulo, y la cuantificación se realizó utilizando un equipo de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). Los granos defectuosos agrios y negros tuvieron la mayor concentración de OTA siendo 11,3 µg/kg y 25,7 µg/kg, respectivamente. En los granos verdes (inmaduros) defectuosos, la presencia de hongos ocratoxigénicos y OTA fue baja<sup>9</sup>.

Vecchio A, *et al.*, estudiaron el año 2012 en Italia, la presencia de “Ocratoxina A en café instantáneo de diferentes marcas y tipos. Los límites de detección y cuantificación fueron 0,05 y 0,2 µg/kg, respectivamente. La recuperación, a partir de muestras añadidas a niveles de 0,5, 3,0 y 6,0 µg/kg, fue 86,0 ± 7,1%, 91,0 ± 4,2% y 91,7 ± 5,9% respectivamente. Cuarenta y ocho muestras (96%) contenían OTA en niveles que van desde 0,32 a 6,40 µg/kg, siempre por debajo del límite legal europeo. La alta frecuencia de aparición de OTA en las muestras de café instantáneo demuestra la importancia de un control efectivo de este producto por parte de las autoridades gubernamentales y las industrias<sup>10</sup>.

Coronel M, *et al.*, investigó en el contenido de Ocratoxina A en granos de café (*Coffea arabica* L.) procesada por métodos secos y húmedo, en el año 2011. Se observó una mayor incidencia de hongos filamentosos en el café barrido de muestras de café molido y flotante. Las especies *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus sulphureus* y *Aspergillus sclerotiorum* fueron productoras de ocratoxina A. En 128 (44%) muestras no se detectó ocratoxina A; sin embargo, en 89 muestras (31%), se detectó ocratoxina A a niveles de 0,1–5,0 µg/Kg. Otras muestras del 25% presentaron contaminación por encima de 5,0 µg/Kg<sup>11</sup>.

Batista L, *et al.*, en el año 2010 investigaron Ocratoxina A en el café tostado-molido al por menor en doce ciudades de Cataluña España. Se extrajo OTA, se limpió mediante columnas de inmunoafinidad y se detectó mediante detección de fluorescencia por HPLC.

El contenido medio de OTA (n= 72) fue 2,17 ± 0,79 ng / g (rango 1,21–4,21 ng/g, 49% de ocurrencia). Las marcas realizaron un muestreo adicional (n = 45), la

contaminación media de OTA es  $2,07 \pm 0,61$  ng/g (rango 1,30–5,24 ng/g, 95% de ocurrencia). Los datos de consumo de café se obtuvieron mediante un cuestionario de frecuencia de alimentos<sup>12</sup>.

Quezada C., en el año 2010, realizó la validación de un método de análisis para Ocratoxina A en café verde, utilizando columnas de inmunoafinidad y cromatografía líquida de alta resolución”. (HPLC). La validación se llevó a cabo en el Laboratorio de Servicios Analíticos e Investigación en Alimentos (LSAIA) del INIAP. La materia prima fue proporcionada por la empresa “EL CAFÉ C.A.”, que estuvo constituida por 2 Kg de café verde. A 25g de muestra se le fortificó con tres niveles de concentración de Ocratoxina A: 2,66, 15,66 y 25,66  $\mu\text{g/Kg}$ , por triplicado en cada nivel, estableciéndose los parámetros de selectividad, exactitud y precisión. El método presentó selectividad, linealidad, precisión y exactitud; además, el LDD fue de 0,44  $\mu\text{g/Kg}$  de OTA y el LQ fue 1,47  $\mu\text{g/Kg}$  de OTA en café verde<sup>13</sup>.

Díaz A, et al., en el año 2018, evaluó la implicación y ejecución de las buenas prácticas de higiene y la presencia de Ocratoxina A en café (*Coffea arabica* L.) orgánico en las zonas cafetaleras del Perú. El cumplimiento de las BPH estuvo en 68,1% y el valor promedio de OTA fue de 1,46 ppb en las muestras de café, se empleó el método fluorométrico con columnas inmunoafinidad de la marca Ochratest, evidenciándose que las muestras de Junín son las de menor ocurrencia de OTA (0,67 ppb), por otro lado, las muestras de Puno (1,42 ppb), Cuzco (2,20 ppb) y San Martín (2,20ppb)<sup>14</sup>.

## 2.2 ASPECTOS TEÓRICOS

### 2.2.1 Clasificación taxonómica

**Reino:** Plantae

**División:** Magnoliophyta

**Clase:** Magnoliopsida

**Subclase:** Magnoliidae

**Orden:** Gentianales

**Familia:** Rubiaceae

**Género:** *Coffea*

**Especie:** *Coffea arabica* L.

**Nombre común:** café, coffee, cafeto.



**Figura 1.** Fotografía del cultivo de *Coffea arabica* L.

Fuente: Tomado de Kewscience



### 2.2.2 Aspectos botánicos

El cafeto es parte del subdominio de plantas conocidas científicamente como la Angiosperma, o Angiospermae, lo que significa que la planta se reproduce por semillas que están encerradas en un compartimento en forma de caja, conocido como el ovario, en la base de la flor<sup>15</sup>.

*Coffea arabica* L. “café” es un árbol pequeño, de 2 a 8 m de altura, con una ramificación horizontal característica, aunque en las plantaciones generalmente se poda para tomar la forma de un pequeño arbusto. Las hojas de *Coffea arabica* L. son perennes y generalmente brillantes. Las flores son hermafroditas y perfumadas, con una corola blanca, tubular, normalmente con 5 lóbulos. Los frutos son generalmente rojas, pero a veces amarillos o morados, característica dependiente del grado de madurez. La capa externa es suave, comestible y de sabor dulce, que contiene una 'semilla', que en realidad es una semilla encerrada en una capa externa dura, casi crujiente, que forma una estructura conocida como pireno; esta capa externa se elimina mediante fresado (proceso mecanizado para el corte del material mediante el uso de una herramienta rotativa de varios filos). Las semillas son de color beige claro o marrón (el color marrón oscuro se da solo después del proceso de tostado) y tiene un surco característico en su superficie interna, que se enrosca dentro de la semilla<sup>16</sup>.

*Coffea arabica* L. es una especie híbrida, formada por la hibridación de *Coffea eugenioides* y *Coffea canephora*. Es una de las únicas especies del género *Coffea* que es autofértil (autógama), una sola planta es capaz de producir semillas fértiles a partir de su propio polen.



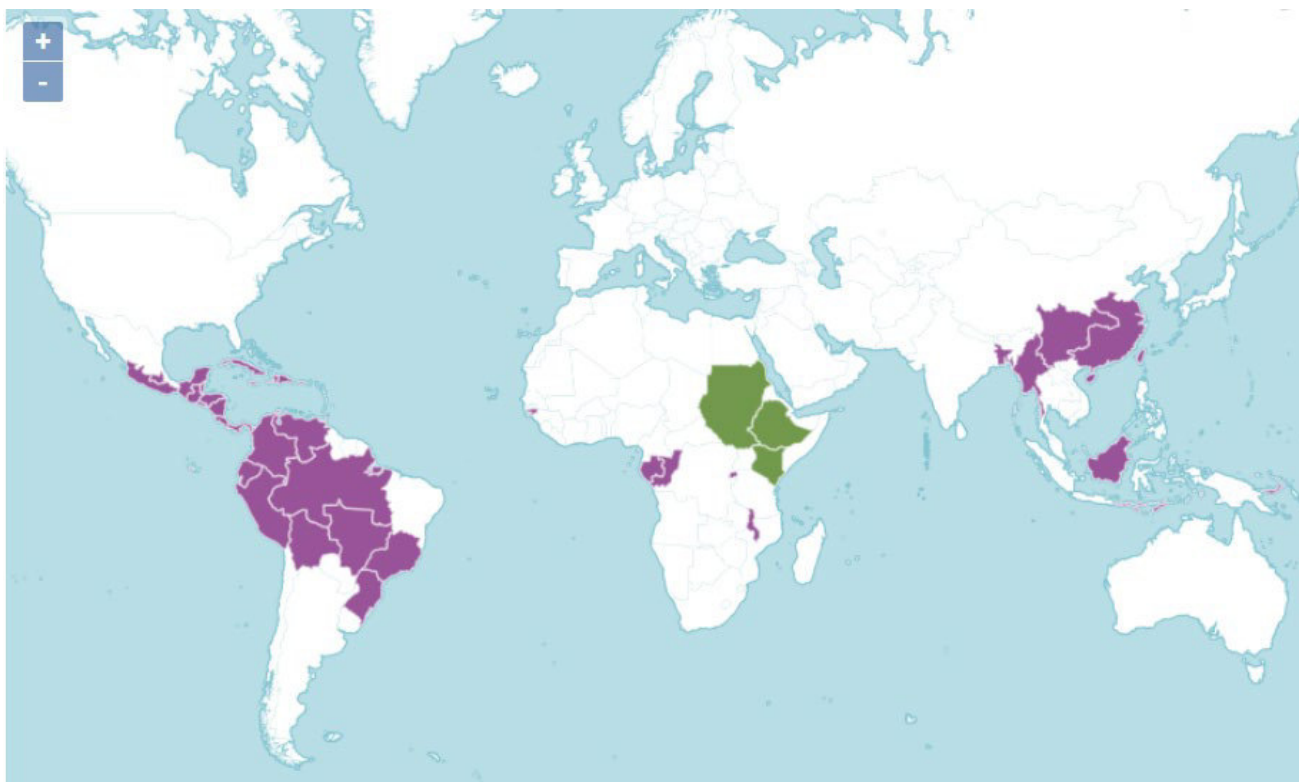
**Figura 2.** Representación gráfica de *Coffea arabica* L.

Fuente: Tomado del libro Kohler's Medicinal Plants, 1887.

### 2.2.3 Distribución Geográfica

El café es autóctono de África, y el café arábico supuestamente se origina en Etiopía y el robusta de la costa atlántica y la región de los Grandes Lagos. Hoy se cultiva ampliamente en las áreas tropicales como África ecuatorial, Java, Sumatra, Islas Indias orientales holandesas, India, Arabia, islas del Pacífico, México, América central y del sur<sup>17,19</sup>. Sin embargo, la mayor parte del café del mundo se produce en América Latina y, en particular, en Brasil, que ha dominado la producción mundial desde 1840.

Brasil es el mayor productor y vendedor de café del mundo. Vietnam, que expandió su producción rápidamente a lo largo de la década de los noventa, ahora ocupa el segundo lugar, colocando a Colombia en el tercer lugar e Indonesia en la cuarta posición.



**Figura 3.** Distribución geográfica de los cultivos de *Coffea*,  
 Leyenda: Cultivos introducidos (color purpura), cultivos nativos (color verde)  
 Fuente: Tomado de la base de datos de Kewscience

#### 2.2.4. Distribución geográfica e importancia para el Perú

El Café es el primer producto agrícola peruano de exportación y es el séptimo país exportador de café a nivel mundial. Lidera las exportaciones agrícolas y está dentro de los 10 principales productos de exportación, después de algunos minerales, petróleo, gas natural, harina de pescado, entre otros. El Perú es el segundo exportador mundial de café orgánico, después de México. Posee 425,416 hectáreas dedicadas al cultivo de café las cuales representan 6% del área agrícola nacional. El potencial de crecimiento del café en el país es alrededor de 2 millones de hectáreas<sup>20</sup>.

Las plantaciones de café están instaladas en 17 regiones, 67 provincias y 338 distritos.

En la actualidad, 223,482 familias de pequeños productores están involucrados con la producción de café a nivel nacional y el 95% de ellos son agricultores con 5 hectáreas o menos del producto. Un tercio del empleo agrícola está relacionado al mercado del café. 2 millones de peruanos dependen de esta actividad. El 30% de los productores de café pertenecen a algún tipo de organización y el 20% exporta directamente a través de sus organizaciones de productores. El 80% exporta a través de compañías exportadoras y el 5% presentan educación superior<sup>20</sup>.

El cultivo del café se desarrolla con relativa facilidad desde los 600 hasta los 1800 m.s.n.m. en varias regiones geográficas del Perú. Sin embargo, existen plantaciones que alcanzan los 2,000 m.s.n.m. y es precisamente ahí donde se producen los cafés especiales. La diversidad de combinaciones de climas, suelos, precipitación y luz solar constituye un escenario propicio para el cultivo del café. El Perú produce mayormente Café Arábica, con distintos perfiles de sabor, aroma y acidez. Las variedades que se cultivan son: Típica, Caturra y otras. El 90% del café peruano es cultivado bajo sombra, principalmente de leguminosas, con una densidad promedio de 2,000 plantas por hectárea. En concordancia con las tendencias actuales, algunas cooperativas y asociaciones se han especializado en cultivo orgánico (libres de químicos) y otros cafés especiales (de altura). Estos son reconocidos por su perfil y características peculiares como su calidad de taza, acidez y sabor balanceado<sup>21</sup>.

#### **2.2.5. Valor nutricional**

Su principal función es alimenticia, se toma regularmente en forma de infusión, preparada a través de diversos métodos y consumido de diversas formas como: café bebible (americano, expreso) dulces, helados, y hasta en algunos guisados. Sus principales usos son el alimenticio y farmacológico, por sus propiedades estimuladoras del sistema nervioso. Habitualmente se sirve caliente, pero también

se toma frío o con hielo, dependiendo de los gustos del consumidor. Algunas de las formas más populares de tomarlo son con leche (con o sin azúcar), con crema o nata, con chocolate o algún licor ya dependiendo de la receta pues hay muchas maneras de prepararlo. Algunos beneficios del consumo moderado del café son que, gracias a la cafeína, que actúa como estimulante del sistema nervioso, induce a un estado de alerta y disminuye la somnolencia. Contiene antioxidantes como los ácidos fenólicos, ácido cloro génico y melanoidinas que ayudan a la conservación y longevidad celular y orgánica. El café tiene muchas sustancias diferentes como: minerales (sodio, calcio, hierro, fósforo, y potasio), vitaminas (A, B1, B2, B3, B5, B6, B7, B9, B12, C, D, E, K), carotenos y tocoferoles como (alfa-caroteno, alfa-tocoferol, beta-caroteno, beta-tocoferol, delta-tocoferol, gamma-tocoferol y otros componentes como betacriptoxantina, folatos, niacina, retinol y cafeína<sup>22</sup>).

#### **2.2.6. Variedades de café**

El café es uno del producto más valioso comercializado a nivel mundial, con ventas globales estimadas en US \$ 90 mil millones. El café es el principal producto de exportación de algunos países como Brasil, Uganda, Burundi, Ruanda y Etiopía. Alrededor del 70% de la cosecha mundial se cultiva en pequeñas propiedades de menos de 10 *ha*, y por lo tanto, a menudo es una empresa familiar que brinda mantenimiento a más de 25 millones de personas en todo el mundo. En una escala más amplia, el comercio internacional de café involucra a aproximadamente 500 millones de personas en su gestión, desde el cultivo hasta el producto final para el consumo<sup>22</sup>.

Debido a la riqueza de las especies y variedades de café, al referirse a las principales especies de café, se ha observado cierta confusión con respecto a la nomenclatura.

El cafeto pertenece a la tribu Coffeae en la familia Rubiaceae. Cien especies están asociadas con el género *Coffea*, pero solo dos especies son agroeconómicamente importantes, *Coffea arabica* y *C. canephora*. *C. dewevrei*, *C. congensis*, *C. eugenioides*, *C. kapakata*, *C. salvatrix*, *C. stenophylla*, *C. liberica*, *C. racemosa* y otros se utilizan principalmente en cruces genéticos. Actualmente, el café arábica representa aproximadamente el 63% del café producido, y el café robusta el 37%.

#### **2.2.6.1 Coffea arabica (Café Arábica)**

*Coffea arabica* fue descrita por primera vez por Linnaeus en 1753. Las variedades más conocidas son 'Typica' y 'Bourbon', pero a partir de ellas, se han desarrollado muchos cultivares diferentes, como 'Caturra' (Brasil y Colombia), 'Mundo Novo' (Brasil), 'Tico' (América Central), el enano 'San Ramón' y la 'Montaña Azul de Jamaica'. La planta Arábica es un arbusto grande con hojas ovales de color verde oscuro. Es genéticamente diferente de otras especies de café, con cuatro conjuntos de cromosomas en lugar de dos. Los frutos son ovales y maduran en 7–9 meses; Por lo general, contienen dos semillas planas (los granos de café): cuando se desarrolla un solo grano, se llama guisante. En comparación con la robusta, los árboles de arábica son generalmente menos vigorosos y productivos con un costo de producción más alto y producen frijoles que contienen aproximadamente la mitad de la cantidad de cafeína. El café arábica produce una bebida con un sabor aromático dulce típico que se puede consumir solo o mezclado con *C. canephora*. "Catuai" y "Mundo Novo" son los cultivares más cultivados tradicionalmente de *C. arabica*, pero muchos otros también son económicamente importantes en todo el mundo. Dado que el café arábica a menudo es susceptible al ataque de plagas y enfermedades, la resistencia es un objetivo principal de los programas de fitomejoramiento. El café arábica se cultiva en toda América Latina, en África central y oriental, en India, y hasta cierto punto en Indonesia<sup>23</sup>.



**Figura 4.** Hojas y frutos de *Coffea arabica* L.

Fuente: Tomado de Antropoceno.

#### **2.2.6.2 Coffea canephora (Café Robusta)**

"Robusta" es el nombre de una variedad cultivada de esta especie. Es un arbusto robusto o árbol pequeño que crece hasta 10 m de altura, con raíces poco profundas. Los frutos son redondos y tardan hasta 11 meses en madurar; las semillas son de forma ovalada y más pequeñas que las de *C. arábica*. Se cosecha en África occidental y central, sudeste asiático y Brasil. Se utiliza para la producción de café soluble y puede ser mezclada con café arábica<sup>24</sup>.



**Figura 5.** Granos de *Coffea canephora*

Fuente: Tomado de Original Garden.

### 2.2.6.3 Coffea liberica (café de Liberia)

El café de Liberia crece como un árbol grande y fuerte, de hasta 18 m de altura, con grandes hojas coriáceas. Las frutas y semillas (frijoles) también son grandes. El café de Liberia se cultiva en Malasia y África occidental, pero solo se comercializan cantidades muy pequeñas<sup>25</sup>.

El cultivo y el tratamiento del café implican los siguientes pasos: reducción de árboles; preparación del suelo; siembra (las plantas pequeñas generalmente se cultivan en viveros en las mismas propiedades o en propiedades externas); tratamiento (corrección del suelo, fertilización, control de plagas y limpieza del terreno manualmente o con herbicidas); recolección de fruta (la fruta madura generalmente es roja y, por lo tanto, se llama baya; es tamizado para eliminar las impurezas; transporte; lavado rasgado mover pulpa y membranas; secado al sol, granos rotativos con un rastrillo, o secado mecánico mediante chorro de aire caliente; separación manual de granos; y almacenamiento en silos y embolsado<sup>25</sup>.

**Tabla 1.** Ejemplos relevantes de variedades comerciales de Café y principales características.

| Especies  | Variedades | Orígenes  | Características  |
|---|------------|-----------|--|
| <i>Coffea arabica</i>   | Típico     | Yemen     | Crecimiento: erguido, vigoroso.<br>Susceptible a la oxidación<br>Calidad: excelente  |
| <i>Coffea arabica</i>   | Javav      | Indonesia | Crecimiento: erguido, vigoroso<br>Susceptible a la oxidación<br>Calidad: excelente   |
| Híbrido natural de<br><i>Coffea arabica</i> y<br><i>Coffea liberica</i> | S 795      | India     | Crecimiento: alto, erguido y abierto<br>Susceptible a la oxidación, pero más tolerante con una selección cuidadosa<br>Calidad: excelente |
| <i>Coffea arabica</i>   | Bourbon    | Brasil    | Crecimiento: pequeño, follaje denso<br>Muy susceptible a la oxidación<br>Calidad: razonable  |



|   |                         |          |  |
|---|-------------------------|----------|--|
| Cruces de variedades “caturra” y “mundo novo”   | Catuai                  | Brasil   | Crecimiento: pequeño, follaje denso<br>Muy susceptible a la oxidación.<br>Calidad: buena; buen tamaño del grano.                         |
| Catimor (cruce entre café timor y café caturra) | Catimor                 | Colombia | Crecimiento: pequeño y compacto.<br>Resistente a la oxidación siempre que se mantenga una selección cuidadosa<br>Calidad: regular- pobre |
| Cruce entre café típico y café bourbon          | Mundo novo              | Brasil   | Crecimiento: cultivos pequeños<br>Muy susceptible a la oxidación.<br>Calidad: excelente  |
| <i>Coffea canephora</i>                         | Kouilouensis o conillon | Brasil   | Crecimiento: alto<br>Resistente y tolerante la oxidación.<br>Calidad: baja   |

## 2.2.7 Importancia del cultivo del café

### 2.2.7.1 Cosecha

La cosecha es un paso importante para producir café de buena calidad. El grado de maduración de los frutos es crítico. Mientras que las cerezas de café (frutas maduras) tienden a producir una bebida de mejor calidad, las frutas inmaduras y demasiado maduras producen granos defectuosos y de baja calidad.<sup>26</sup>

Debido a que las frutas de café en la misma planta generalmente no alcanzan la madurez al mismo tiempo, la cosecha generalmente comienza cuando la mayoría de las frutas están maduras. Este proceso puede ocurrir de forma manual o mecánica. La cosecha manual puede realizarse recogiendo cerezas una por una o despojando las ramitas y recolectando todas las frutas, incluidas las maduras, inmaduras y demasiado maduras. La recolección mecánica se realiza sacudiendo los árboles o despojando las ramas con un aparato similar a un peine flexible<sup>27</sup>.

No solo es importante el grado de maduración del fruto del café, sino que también es fundamental evitar la contaminación indeseable y el crecimiento de microorganismos, especialmente el moho, durante la cosecha, el secado y el almacenamiento de las semillas. Dicha contaminación puede ser perjudicial no solo para la calidad sensorial de la bebida final, sino también, en el caso de la producción de micotoxinas, para la salud humana. En consecuencia, el café de barrido (fruto del café que se encuentra en el suelo debajo de los arbustos de café, desprendido durante la cosecha o abscisa durante el desarrollo) también se considera de baja calidad y de menor valor de mercado debido a la contaminación y el crecimiento de microorganismos<sup>28</sup>.

#### 2.2.7.2 Tratamientos

Después de la cosecha, las frutas deben someterse a un procesamiento primario para separar las semillas del resto de la fruta; luego se clasifican según el número y los tipos de defectos, tamaño, etc., para ayudar a clasificar los lotes de café, los métodos más comunes para este propósito se conocen como métodos secos y húmedos. Existen bastantes variaciones de ambos métodos, según el país y la granja individual, pero, en general, en el método seco original, las semillas cosechadas se resecan por la exposición al sol en grandes patios durante 1 o 2 semanas o mediante secadores de aire hasta que el contenido de humedad sea de aproximadamente 10–12%, para evitar el crecimiento de la bacteria y el moho. Alternativamente, las semillas se pueden lavar y las semillas maduras se separan por flotación en tanques a menos que haya secadores de aire disponibles, es muy importante que haya poca lluvia durante el período de cosecha para garantizar un café de buena calidad<sup>29</sup>.

Después del secado, las frutas se limpian y el pericarpio seco, que consiste en el endocarpio, mesocarpio y epicarpio, se elimina mecánicamente, dejando el material mucilaginoso que involucra las semillas (piel plateada) adherido a la superficie. Algunos autores sugieren que el endocarpio no debe despegarse durante este proceso. El pericarpio seco también se conoce popularmente como

cáscara o pulpa seca de cereza, y el nombre dado al proceso de eliminación mecánica de la cáscara de las cerezas de café secas se llama (descascarado). El producto obtenido después del proceso primario seco es el café verde "natural". El método seco se usa comúnmente en Brasil y África, donde el sol y el espacio son abundantes y donde el despojo de las ramas también es más común. El procesamiento húmedo es más sofisticado y tiende a generar una bebida de mayor calidad. Hay muchas versiones diferentes de este método, pero, en general, solo se utilizan cerezas maduras. Se pueden recoger selectivamente y separar mecánicamente o en tanques de flotación. La clasificación es seguida por la (des) pulpa mecánica, remojo y fermentación en un tanque, generalmente durante 12–36 h. Durante la fermentación, que puede ocurrir naturalmente o con la adición de microorganismos o enzimas, la pulpa restante y la piel plateada se eliminan, la acidez aumenta y el pH puede disminuir a 4.5. Los granos desnudos (café pergamino) se lavan a fondo en tanques de agua limpia o en lavadoras específicas. Después de esto, los frijoles se secan en yardas o en mesas suspendidas (ventiladas); esto a veces se combina con secado con aire caliente. Después del secado, la parte restante del casco a menudo se elimina mecánicamente después del lavado<sup>29-30</sup>.

El procesamiento en húmedo con frecuencia se usa en lugares donde el café se cosecha por recolección manual, como Colombia, Asia y América Central, aunque debido al mayor valor de mercado de varias granjas en países que producen grandes volúmenes, como Brasil, también lo han adoptado. La principal diferencia entre el procesamiento seco y húmedo es que, en el procesamiento húmedo, la mayor parte del material que involucra las semillas se elimina antes del secado, además de la piel plateada, que se elimina durante y después del proceso de fermentación<sup>30</sup>.

Alternativamente, en Brasil se ha desarrollado un método llamado semi-seco (o semi-lavado), que combina métodos secos y húmedos. El método consiste en lavar y seleccionar las semillas en tanques de flotación y (des) pulpar como en el proceso húmedo, excluyendo el paso de fermentación. Semillas de café tratadas por procesos secos y semisecos, manteniendo el polisacárido rico en piel plateada,

a menudo se usa en mezclas de café expreso porque tienden a agregar más cuerpo y dulzura a la bebida que las semillas procesadas húmedas<sup>31</sup>. Después de que los granos se tratan por cualquiera de los métodos, se almacenan mecánicamente, manualmente y / o de tamaño electrónico y clasificado para separar y contar granos defectuosos. Este proceso puede ser seguido por una clasificación adicional con excitación ultravioleta para separar los defectos que pueden producirse durante el procesamiento en seco y en húmedo y que son muy difíciles de separar de los granos sanos, excepto por el hecho de que muestran una fluorescencia especial<sup>31-32</sup>.

Después de la comercialización, los granos de café verde están listos para ser tostados. También se pueden descafeinar, tratar con vapor o almacenar antes de usar.

## **2.2.8 Limitaciones de los cultivos del café**

### **2.2.8.1 Micotoxinas**

Las micotoxinas son metabolitos secundarios fúngicos y su ingestión, inhalación o absorción cutánea produce enfermedades en humanos y animales. Las patologías causadas por la exposición a estos metabolitos tóxicos se conocen como micotoxicosis. Los efectos producidos por las micotoxinas podrían dividirse en agudos, debido a la ingestión de altos niveles de micotoxinas, o crónicos, debido a la exposición a estos compuestos durante largos períodos. La intoxicación aguda generalmente se asocia a síntomas gastrointestinales, aunque, en algunos casos, se ha relacionado con afecciones cutáneas y neurológicas e incluso ha provocado la muerte por insuficiencia orgánica<sup>33</sup>.

Estas intoxicaciones agudas son un problema grave en los países en desarrollo con malas condiciones higiénicas, donde las condiciones favorables para la proliferación de hongos pueden dar lugar a altos niveles de micotoxinas en los alimentos. En los últimos años, diferentes brotes de micotoxicosis han matado a cientos de personas en África. El mayor impacto de las micotoxinas en la salud humana en los países desarrollados se debe a la exposición crónica. En este caso,

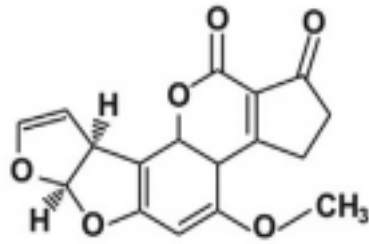
las micotoxicosis están asociadas con las propiedades cancerígenas, teratogénicas, mutagénicas e inmunosupresoras de las micotoxinas. El alto riesgo que representa la contaminación de los alimentos por las micotoxinas es reconocido por organizaciones internacionales y nacionales con competencias en seguridad alimentaria. El Comité Conjunto FAO / OMS considera las micotoxinas como las sustancias más importantes con respecto a su ingesta diaria a dosis subagudas<sup>34</sup>.

El último informe presentado por la Alerta rápida para alimentos y piensos en la Unión Europea (RASFF) indicó que las micotoxinas suponían uno de los principales grupos de notificaciones (20%) de los países miembros. Además, el Comité Científico de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) aconsejó fortalecer la vigilancia en áreas claves relacionadas con los riesgos emergentes de micotoxinas debido a la ubicuidad de las toxinas y la necesidad de aumentar el conocimiento y la competencia con respecto a estos riesgos. Las micotoxinas se encuentran comúnmente en muchos productos alimenticios como cereales, frutas, nueces y carne, entre otros. Las estrategias más efectivas para evitar la contaminación por micotoxinas de los alimentos están relacionadas con el control de la proliferación de hongos en productos crudos. Se han establecido enfoques efectivos de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (HACCP) para evitar que las micotoxinas entren en la cadena alimentaria<sup>35</sup>.

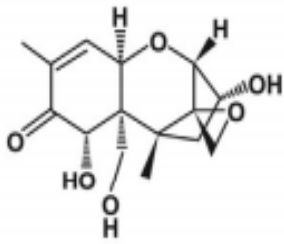
Durante mucho tiempo, los fungicidas químicos se han utilizado para reducir el crecimiento de hongos en el campo o durante el almacenamiento. Sin embargo, la legislación sobre su uso es cada vez más restrictiva porque pueden causar problemas para el medio ambiente y la salud humana. Además, se ha demostrado que el control de las condiciones de almacenamiento es útil para reducir la proliferación de hongos. Controlar tanto la temperatura como la humedad por debajo de los límites precisos puede evitar el desarrollo de hongos y la producción de micotoxinas. Se han desarrollado diversos modelos predictivos para diferentes especies de hongos y micotoxinas teniendo en cuenta estos factores. Las estrategias de control biológico también se consideran una buena alternativa a los productos químicos para reducir las micotoxinas en alimentos y bebidas, y se han descrito varios agentes de control biológico para controlar los hongos micotoxigénicos. Cuando no se puede prevenir la contaminación por micotoxinas, se deben aplicar métodos de desintoxicación para eliminar las toxinas. Los

procesos químicos disponibles hasta ahora son ineficaces y no están permitidos en muchos países, incluida la Unión Europea. Hay varios métodos físicos disponibles y se utilizan con frecuencia para eliminar la micotoxina de los alimentos. Por ejemplo, la adsorción a colestiramina o aluminosilicatos es efectiva para eliminar la ocratoxina A de la cerveza o el vino<sup>36</sup>.

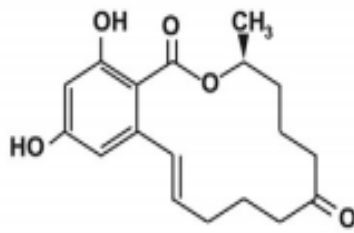
La mayoría de las micotoxinas son estables a altas temperaturas; por lo tanto, los tratamientos térmicos no son útiles para desintoxicar productos. Los métodos biológicos utilizan microorganismos no patógenos que disminuyen la disponibilidad de toxinas de los productos contaminados por transformación a compuestos no tóxicos o por adsorción a sus paredes celulares. Varios autores consideran que este tipo de desintoxicación es el mejor enfoque porque es específico, ecológico y no modifica las propiedades de los alimentos. Las principales especies productoras de micotoxinas se incluyen en cuatro géneros: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* y *Alternaria* y se discuten sus efectos agudos y crónicos, principales productores, estructura y ocurrencia. Además, debido a sus propiedades tóxicas, los niveles máximos de muchas micotoxinas están legislados en diferentes países; por lo tanto, también se indica la regulación actual en cada caso<sup>34-36</sup>.



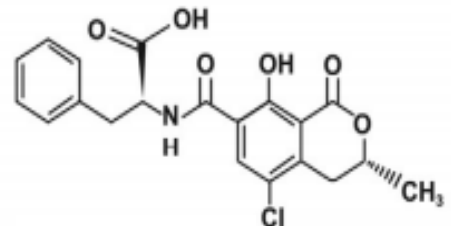
Aflatoxina B1



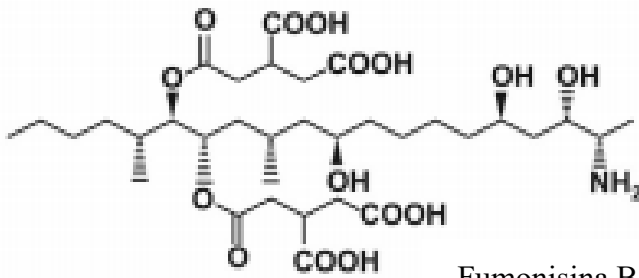
Deoxynivalenol



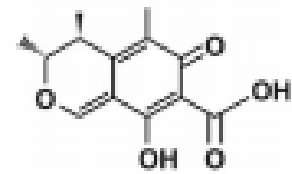
Zearalenone



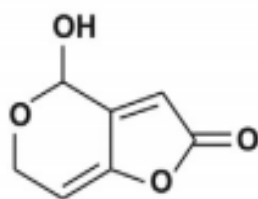
Ocratoxina A



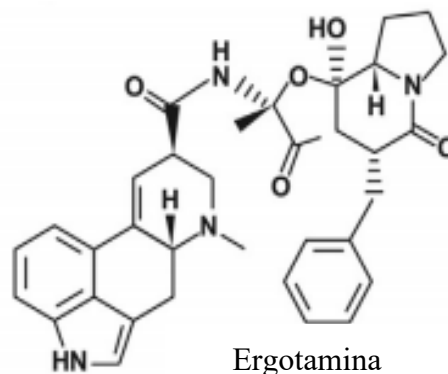
Fumonisin B1



Citrina



Patulina



Ergotamina

**Figura 6.** Estructura química de algunas micotoxinas presentes en alimentos.

Fuente: Tomado de researchgate-mycotoxins.

### 2.2.8.2 Ocratoxina

La ocratoxina A (OTA) es una micotoxina generalizada y el compuesto más tóxico incluido en el grupo de la ocratoxina. Estructuralmente, OTA es un compuesto de isocoumarina clorada. Tradicionalmente, *Aspergillus ochraceus* se había considerado la principal especie productora de OTA desde la descripción de la toxina en 1965<sup>37</sup>.

Sin embargo, actualmente se sabe que varias especies son capaces de producir OTA y están incluidas en diferentes secciones de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*. Los *Aspergilli* negros se consideran los principales productores de uvas en el área mediterránea, en particular, *A. carbonarius* y algunas especies del agregado de *A. niger* (*A. niger* y *A. welwitschiae*). Recientemente, se ha informado que diferentes especies incluidas en la sección *Aspergillus circumdati* producen OTA a niveles altos, principalmente *A. steynii* y *A. westerdijkiae*<sup>37</sup>.

En climas fríos, dos especies incluidas en el género *Penicillium*, *Penicillium verrucosum* y *Penicillium nordicum*, también son importantes productores de OTA. OTA se ha encontrado en una variedad de productos en todo el mundo. En la dieta humana, las principales fuentes de OTA son los cereales y derivados como el pan, la harina o la cerveza, seguidos de las uvas y los productos de uva (básicamente, vino y mosto). El café es otro producto alimenticio importante frecuentemente contaminado con OTA, así como frutas y nueces, especias y cacao. Recientemente, el número de estudios sobre la aparición de OTA ha aumentado notablemente y la toxina se ha detectado en otros alimentos no convencionales como hierbas medicinales, regaliz, aceitunas y aceite de oliva. La toxicidad aguda por OTA en animales de laboratorio ha sido ampliamente estudiada. La DL50 oral en ratas y ratones es de 25 mg kg<sup>-1</sup> y 53 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente, mientras que se establece entre 0.2 y 1 mg kg<sup>-1</sup> en cerdos, conejos, gatos y perros. Los síntomas relacionados con esta exposición aguda a la OTA están asociados con hemorragia multifocal en los órganos principales como el cerebro, el hígado, el corazón y los riñones, entre otros. Sin embargo, las



intoxicaciones más importantes relacionadas con la OTA se deben a la exposición crónica<sup>38</sup>

Actualmente, esta toxina ha sido clasificada como un posible carcinógeno humano (grupo 2B) por el IARC aunque, teniendo en cuenta los datos recientes sobre su genotoxicidad y su papel en el estrés oxidativo, varios autores han propuesto la actualización de su clasificación del grupo 2B al grupo 2A. La OTA a menudo se encuentra en la sangre de los humanos en todo el mundo. Aunque las patologías asociadas con la exposición a OTA en animales son bien conocidas, los datos sobre toxicidad humana son escasos. Varios autores describieron los efectos de la OTA en la salud humana como una red de mecanismos de interacción. Un proceso parece estar relacionado con la inhibición de la síntesis de proteínas debido a la competencia con la fenilalanina en la reacción mediada por la fenilalanina t-ARN sintetasa. Además, la respuesta de las células a la exposición de OTA provoca estrés oxidativo que produce disfunción mitocondrial y especies reactivas de oxígeno. Este último proceso se considera la causa principal de la necrosis celular y conduce al inicio de la cascada de apoptosis. Estudios recientes han demostrado que OTA no es un agente mutagénico como se pensaba anteriormente. La toxina promueve la inestabilidad genómica y la tumorigénesis debido a la interferencia en la división celular por disrupción mitótica. Durante mucho tiempo, el riñón se ha propuesto como el principal órgano diana para la OTA en mamíferos, pero estudios recientes han demostrado un agotamiento importante del hígado y el sistema inmunitario debido a la exposición de OTA<sup>39</sup>.

Hasta ahora, la OTA se considera el agente causal de la nefropatía endémica de los Balcanes (BEN) y varios tipos de tumores uroteliales en humanos. Estas enfermedades producen atrofia tubular y quistes corticales y culminan, en una etapa final, en necrosis epitelial e insuficiencia renal. La presencia de OTA en la alimentación animal da como resultado la contaminación de la carne y la leche destinadas al consumo humano, así como una disminución de la producción ganadera, principalmente en cerdos y aves de corral. Los rumiantes son menos susceptibles a los efectos tóxicos de OTA porque algunos microorganismos del rumen pueden realizar una degradación enzimática de la toxina a su derivado

menos tóxico OT-a. El Comité Mixto FAO / OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) estableció el promedio de ingesta de OTA en humanos en 5 ng kg<sup>-1</sup> por día y una ingesta diaria máxima de 120 ng kg<sup>-1</sup>. Debido a la gran cantidad de productos susceptibles de ser contaminados por OTA y sus propiedades tóxicas tanto para animales como para humanos, la Comisión Europea regula en 2006 (CE no 1881/2006), 2010 (UE 105/2010) y 2012 (UE 594 / 2012) los niveles máximos de OTA permitidos en una variedad de alimentos. La legislación incluía cereales y derivados, café, uvas y productos de uva, regaliz y varias especias como pimentón, pimienta y jengibre, entre otros<sup>40</sup>.

Los niveles de OTA permitidos para cada producto dependen de la frecuencia estimada de consumo y de las poblaciones objetivo de consumo, siendo los alimentos infantiles los más estrictamente regulados (0.5 mg kg<sup>-1</sup>). Varios países han establecido límites para la OTA siguiendo las instrucciones de la UE o las establecidas por el Codex Alimentarius. No se establecen límites específicos para la OTA en productos alimenticios en EE. UU. Y Australia<sup>40</sup>.

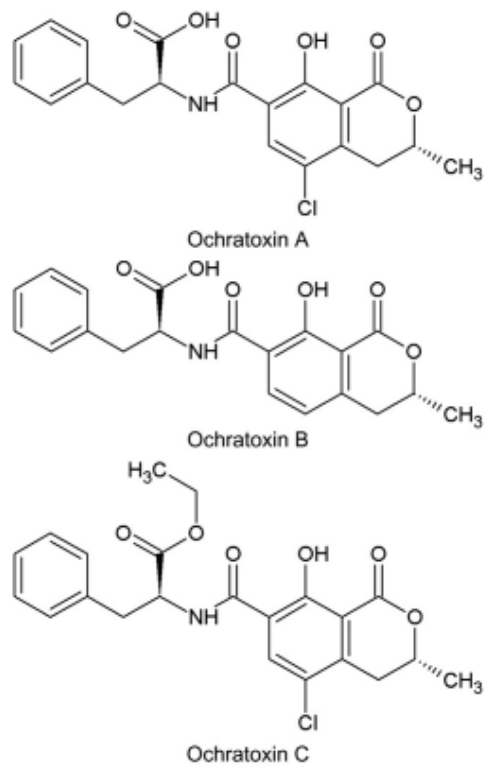
### 2.2.8.3 Tipos de Ocratoxina

Los hongos que producen ocratoxinas y citrinina se encuentran comúnmente en la alimentación animal y la alimentación humana en todo el mundo. Se encuentran con grandes frecuencias en los países balcánicos y escandinavos. Hay tres ocratoxinas principales (OTA, OTB y OTC), pero la OTA ocurre naturalmente con mayor frecuencia en una variedad de granos de cereales (cebada, trigo, avena, maíz y frijoles), maní, frutas secas, uvas / pasas, queso, café y otros productos alimenticios. La OTA se acumula en la cadena alimentaria debido a su larga vida media. La citrinina generalmente coincide con la OTA, y comúnmente contamina los granos de cereales, incluidos el trigo, la cebada, la avena, el maíz y el arroz. La *citrinina* también contamina los cacahuets y las frutas. Los niveles de OTA y *citrinina* se han encontrado mucho más bajos en la alimentación humana que en la alimentación animal cruda, porque durante el procesamiento y la cocción de los alimentos humanos, la *citrinina* se elimina casi por completo y la OTA se reduce significativamente. En comparación con OTA, OTB y OTC rara vez se encuentran

y son mucho menos tóxicos. Tanto la OTA como la *citrinina* son nefrotoxinas bien conocidas. También se sabe que la OTA posee propiedades genotóxicas, cancerígenas, reproductivas, de desarrollo y teratogénicas, inmunotóxico, neurotóxico, mutagénico<sup>41-43</sup>.

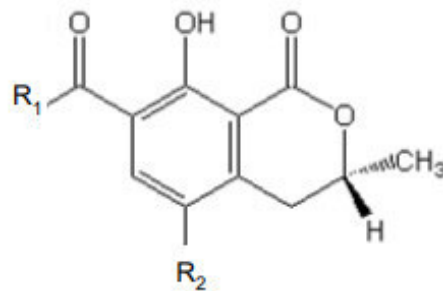
En humanos, la exposición a OTA y *citrinina* se ha relacionado con Nefropatía endémica de los Balcanes (BEN), una enfermedad renal crónica asociada con tumores del sistema renal, que puede ser fatal. Sin embargo, algunos investigadores han dudado de la OTA como factor etiológico en BEN. Un reciente estudio epidemiológico molecular proporcionó una fuerte relación entre la exposición dietética crónica al ácido aristolóquico (AA), un componente principal de *Aristolochia clematitis* que crece como hierba en los campos de trigo de la región BEN, y la nefropatía<sup>44</sup>.

La concurrencia de *citrinina* con OTA se ha implicado en la nefropatía de los cerdos en Dinamarca, Suecia, Noruega e Irlanda. La *citrinina* y la OTA también están involucradas en las nefropatías aviarias. Se han detectado residuos de OTA en los tejidos de los cerdos en los mataderos, y se ha demostrado, en condiciones experimentales, que todavía se pueden detectar residuos en los tejidos 1 mes después del final de la exposición. Debido a la larga vida media de la OTA en los sistemas biológicos y de alimentación, se han planteado serias preocupaciones sobre la salud animal y el consumo humano de carne<sup>45</sup>.



**Figura 7.** Tipos de Ocratoxina.

Fuente: Tomado de researchgate-Ochratoxin A and types.



| TIPO DE OCRATOXINA | R <sub>1</sub>           | R <sub>2</sub> |
|--------------------|--------------------------|----------------|
| Ocratoxina A       | Fenilalanina             | Cl             |
| Ocratoxina B       | Fenilalanina             | H              |
| Ocratoxina C       | Fenilalanina, etil éster | Cl             |
| Ocratoxina α       | OH                       | Cl             |
| Ocratoxina β       | OH                       | H              |

**Figura 8.** Variantes de Ocratoxina

Fuente: Tomado de researchgate- ochratoxin revision

### **2.2.9 Impacto de la Ocratoxina A en café**

La aparición de ocratoxina A en café crudo fue reportada por primera vez por Levi<sup>46</sup>. Los datos iniciales sugirieron que se produciría un alto nivel de destrucción de las micotoxinas durante el proceso de tostado. Sin embargo, la aparición de OTA en las muestras de mercado de café tostado, así como en las bebidas de café, se informó después de las mejoras en los métodos de detección<sup>47,48</sup>. Como consecuencia, el Comité Científico de Alimentos de la Comisión Europea, consideró que la OTA en el café podría ser un contaminante preocupante, debido a su potencial de genotoxicidad y carcinogenicidad, y sería prudente reducir la exposición a la OTA tanto como sea posible<sup>49</sup>. La presión de las autoridades europeas llevó a los importadores de café y a los países productores de café a estudiar OTA en productos de café e investigar el destino de la OTA durante la producción, manipulación y fabricación de café crudo. Se realizaron encuestas sobre la presencia de OTA en Europa en café crudo de diferentes orígenes y en café tostado y soluble producido y vendido en Europa<sup>50, 51</sup>. Encuestas posteriores en varios otros países han confirmado la presencia de OTA en café crudo, tostado y soluble. Un extenso muestreo de café crudo de todos los orígenes ha demostrado que la contaminación por OTA puede ser más frecuente en algunas áreas, pero que ningún país productor está completamente libre de contaminación<sup>52</sup>.

### **2.2.10 Impacto de la Ocratoxina A en animales**

Es importante para la ruta de exposición humana el traspaso de OTA del alimento a los productos derivados de animales. A pesar de que se ha detectado OTA en el aire de las granjas, como los gallineros y los establos, la inhalación de aire contaminado con OTA y conidias fúngicas representa un hecho raro<sup>53-55</sup>. En cambio, los piensos contaminados se consideran la principal fuente de exposición de OTA a los animales de granja. De hecho, la mayoría de los cereales, granos y otros derivados alimenticios son propensos al crecimiento de hongos<sup>56</sup>. De particular preocupación es la desviación hacia alimentos para animales, productos con crecimiento visible de moho o con niveles de OTA por encima de los niveles

máximos permitidos en alimentos destinados al consumo humano. Las consecuencias pueden ser un brote de ocratoxicosis, como lo describe Visconti y Bottalico en el año 1983 siendo un peligro al ser humano, por el consumo de productos derivados de animales contaminados<sup>57-58</sup>. A pesar de una serie de posibles impactos en la salud humana que podrían surgir, existen algunos datos importantes que impiden evaluaciones exhaustivas de los riesgos para la salud humana asociados con la alimentación animal<sup>59</sup>. La presencia de OTA en materias primas y piensos contaminados requiere un monitoreo periódico, como prevención de una micotoxicosis.

En la Unión Europea (UE) también se necesitan acciones de control y monitoreo, ya que se ha permitido el uso de aditivos para piensos para reducir la contaminación de los piensos por micotoxinas, incluida la OTA. En ausencia de tales acciones, es posible que el uso de estas sustancias eventualmente sirva para cubrir o enmascarar alimentos contaminados<sup>60</sup>.

Además, aunque la OTA no es permitida en la alimentación animal, solo existen valores orientativos para los productos destinados a la alimentación animal en la UE, según los resultados de las evaluaciones de exposición que indican que los alimentos de origen animal realizan una pequeña contribución a la exposición dietética humana total a OTA<sup>61</sup>. Estos valores no obligatorios establecidos por la recomendación 2006/576 / CE de la Comisión (CEC 2006) son 250 mg / kg en el caso de los cereales y derivados, piensos complementarios y completos son 50 y 100 mg/kg para cerdos y aves de corral, respectivamente. En general, los niveles de OTA que se encuentran en los feeds respetan la recomendación de la UE.<sup>61</sup>

Es importante enfatizar que la coexistencia de micotoxinas a menudo se encuentra en las muestras de alimentos. Por ejemplo, en la alimentación de aves se detectó OTA en coexistencia con zearalenona (ZEA), y AF, fumonisinas (FB), desoxinivalenol (DON) y ZEA simultáneamente<sup>62</sup>.

En los alimentos terminados destinados a las primerizas no embarazadas, OTA coocurrió con FB1. En las materias primas, OTA coexistió tanto con citrinina

(CIT), ZEA, toxina T-2 (T-2), DON, nivalenol (NIV) y ZEA, AFs y FBs. Las muestras de alimento de granjas de cerdos / pollos en Bulgaria que tienen problemas de nefropatía (aparición de riñones agrandada y moteada o pálida) en el momento del sacrificio también mostraron coocurrencia de OTA con ácido penicílico (PA), CIT, FB1, DON, penitrem A y ZEA. La contaminación de los piensos destinados al consumo animal se ha considerado tradicionalmente solo para animales de producción convencionales, como aves de corral, cerdos y vacas. Sin embargo, recientemente se ha afirmado que la contaminación por OTA también necesita atención en el caso de los alimentos destinados al consumo de pescado, dado el uso creciente de ingredientes vegetales en los alimentos para la mayoría de las especies de peces comerciales<sup>63</sup>.

También se han realizado informes de contaminación de piensos OTA para camellos. En cuanto al tipo de sistema de reproducción, los resultados son controvertidos. Algunos estudios revelaron que las muestras orgánicas de alimentos porcinos estaban significativamente más contaminadas que las muestras de alimentos convencionales, mientras que en otros los alimentos derivados de sistemas de cultivo orgánico no estaban contaminados con mayor frecuencia con OTA que los alimentos de los sistemas de cultivo convencionales<sup>64</sup>. La mayor contaminación entre las muestras de alimentos orgánicos puede originarse no necesariamente en el sistema de producción en sí, sino en las prácticas de manejo inapropiadas, que pueden ser más frecuentes en la agricultura orgánica, como las condiciones de almacenamiento que pueden conducir al desarrollo de hongos de almacenamiento<sup>65</sup>. El análisis de micotoxinas de muestras de alimentos para aves, conejos y cerdos durante 8 meses mostró que se detectó OTA en el 25% de los tres alimentos en solo ciertos meses de muestreo (noviembre, diciembre y enero), lo que sugiere una dependencia del contenido de OTA hacia las condiciones y el tiempo de almacenamiento<sup>66</sup>. De manera similar, en la alimentación porcina polaca se informó la mayor incidencia de contaminación durante la temporada de recolección de invierno, en comparación con la primavera.

### 2.2.11 Métodos de cuantificación

Con el progreso de la instrumentación y el análisis, se han desarrollado nuevos métodos que son más fáciles y rápidos de ejecutar, con mayor eficiencia y permitiendo una respuesta rápida con límites de detección más bajos. La HPLC y la TLC son técnicas utilizadas preferiblemente para el análisis y la detección de micotoxinas, o la cromografía líquida con detección de espectrometría de masas (LC-MS) para aquellos que pueden permitírselo, mientras que los ELISA representan una alternativa para el análisis cualitativo en ausencia de equipos rápidos.

#### ELISA

ELISA se ha convertido en una herramienta de detección popular y útil debido a la disponibilidad de anticuerpos policlonales y monoclonales contra varias micotoxinas, incluida la OTA. La mayoría de los ELISA comerciales para micotoxinas se basan en un formato ELISA competitivo y heterogéneo, donde la toxina de la muestra compite con una toxina marcada (como un conjugado toxina-enzima) por un número limitado de sitios de unión de anticuerpos<sup>67</sup>.

Los métodos ELISA tienen ventajas debido a su simplicidad y un elevado número de muestras que pueden analizarse al mismo tiempo, pero solo para una micotoxina. Sin embargo, ELISA es menos preciso y sensible que los ensayos cromatográficos convencionales<sup>68</sup>.

Además, se observan resultados falsos positivos o negativos debido a reacciones cruzadas entre moléculas o interferencias. Por lo tanto, los kits ELISA no deben usarse como un método cuantitativo y solo deben usarse con alimentos para los cuales han sido ampliamente probados y demostrados que funcionan sin interferencias. Aun así, ELISA representa el enfoque asequible para el control industrial interno en muchas industrias alimentarias y, en el caso particular de los productores de café, puede usarse para controlar la contaminación del café verde<sup>67-</sup>

<sup>69</sup>.



## **Cromatografía de capa fina**

La TLC ha sido la técnica de separación y detección más utilizada y establecida para las aflatoxinas desde su desarrollo en la década de 1960<sup>70</sup>. Los métodos recientes de TLC utilizados para el análisis de OTA en café. El TLC siempre debe considerarse una herramienta importante porque es rápido, simple, rentable y robusto; es versátil en el uso de diferentes sistemas de solventes; y es aplicable a diferentes sistemas de visualización usando el mismo extracto de muestra. Muchos laboratorios en los países en desarrollo tienen una considerable experiencia en esta técnica, lo que les permite evaluar la contaminación por OTA, independientemente de si el propósito de la evaluación es cualitativo o cuantitativo. Sin embargo, la cuantificación sigue siendo un factor limitante debido al alto costo comercial fluoro densitómetros, que de otro modo podrían disminuir la variabilidad asociada con la capacidad de los analistas individuales para cuantificar visualmente<sup>71</sup>.

Además, el método de TLC está limitado por la necesidad de una limpieza eficiente, y sustancias ácidas extraídas con OTA se ha informado como un factor limitante cuando la partición líquido - líquido y la extracción en fase sólida se utilizan como limpieza. Una de las desventajas de la TLC es su falta de poder de separación y, por lo tanto, su incapacidad para discriminar cualquier posible interferencia extraída conjuntamente de las toxinas de interés<sup>72</sup>.

## **Cromatografía líquida (LC) y Espectrómetro de Masas (MS)**

La técnica más utilizada para el análisis de OTA es LC, es decir, HPLC y, más recientemente, LC/MS o incluso LC/MS/MS. OTA fluorescencia natural se ha utilizado con fines de detección, con varios métodos analíticos que utilizan HPLC-FLD publicado para la determinación de OTA en café, logrando límites de detección bajos. Estos métodos incluyen generalmente un paso de purificación anterior utilizando columnas SPE o de inmunoafinidad<sup>73</sup>.

En cuanto al método de separación cromatográfica, la mayoría de los métodos de HPLC utilizan una columna de fase inversa para la separación y una solución acuosa ácida mezclada con acetonitrilo o metanol como fase móvil. Las fases móviles ácidas han sido preferibles para la separación de OTA, porque OTA es un compuesto polar, con un grupo carboxilo en la estructura y, por lo tanto, debe someterse a cromatografía en forma ionizada para interactuar con la fase estacionaria. LC-MS. La MS es una de las técnicas más avanzadas y en polvo disponibles para la detección e identificación de micotoxinas, particularmente para aquellos con absorción reducida de ultravioleta/visible (UV/VIS) o fluorescencia nativa como OTA. Sin embargo, los métodos requieren mucho tiempo y requieren conocimientos expertos. Las técnicas de extracción y limpieza deben aplicarse antes de la separación y detección para permitir picos bien separados sin interferencia de los componentes de la matriz. Se informó por primera vez de un nuevo método, en el cual la OTA en el café tostado es analizada por LC-MS / MS. Los resultados de este método proporcionan buenos resultados en términos de linealidad, especificidad, precisión, límite de detección y cuantificación para la determinación de OTA en café tostado<sup>73, 74</sup>.

## **CAPÍTULO III. METODOLOGÍA**

### **3.1 MATERIALES, EQUIPOS E INSUMOS QUÍMICOS**

#### **3.1.1. Materiales**

- Tubos de ensayo.
- Matraces de 250 mL.
- Probetas de 25, 50 y 100 mL.
- Vasos de precipitados de 50, 100, 250 y 500 mL.
- Fiolas de 10, 25, 500 y 1000 mL
- Pipetas
- Embudo
- Baguetas
- Micropipetas de 20-200uL
- Micropipetas de 100 – 1000uL
- Gradillas
- Puntas para micropipeta
- Soporte universal,
- Pinzas
- Papel Whatman N°42
- Papel de filtro rápido
- Útiles de seguridad personal (guantes de látex, mascarilla simple, lentes de protección, mandil).

#### **3.1.2 Equipos**

- Cromatógrafo Líquido de Alto Rendimiento “SHIMADZU: desgasificador DGU-20A5R, auto muestreador SIL-30AC, bomba cuaternaria LC-30AD, horno de columna: CTO-20AC, detector de fluorescencia RF-20Axs, control de sistema SBM-20A. Columna cromatográfica RP C18 de 250 mm x 4,6 mm ID x 5 µm partícula (Restek)”.

- Agitador magnético “Thermo Scientific Cimatec”
- Agitador magnético “IKA C-MAG HS7”
- Balanza analítica “GR-300 AND”
- Estufa
- Molinillo de café “Bosch”
- Baño ultrasónico “WISD”
- Ultra purificador de agua “ELGA PURELAB CLASSIC UV”
- Columnas de inmunoafinidad “NEOCOLUMN”

### **3.1.3. Insumos químicos**

- Estándar de Ocratoxina A 99,18% (Merck)
- Metanol HPLC (Merck)
- Acetonitrilo HPLC (Merck)
- Ácido acético grado analítico (Merck)
- Buffer fosfato salino pH= 7,40 (Merck)
- Tween 20 (Merck)
- Agua ultrapura
- Agua destilada

## **3.2. PARTE EXPERIMENTAL**

### **3.2.1 Colecta de los granos de café**

Los granos de café tostado y verde provinieron del departamento de Junín, provincia de Chanchamayo, distrito Perene del anexo Pampa Tigre. La recolección de la especie vegetal se realizó a las condiciones climáticas características del lugar en el periodo de noviembre del 2018. Las muestras fueron rotuladas y transportadas a la capital para el respectivo tratamiento y análisis.

### **3.2.2. Lugar de ejecución de la investigación**

La investigación se llevó a cabo en el Instituto de Investigación en Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales “Juan de Dios Guevara” de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos

(UNMSM) y en el Laboratorio de Investigación y Certificaciones (LABICER) de la Universidad Nacional de Ingeniería (UNI).

### **3.2.3. Tratamiento de los granos de café**

Los granos de café fueron secados en estufa por 24 horas a 38°C. Las muestras de café tostado y verde se molieron en un molino Bosch. Una vez trituradas se homogenizaron y se conservaron en frascos ámbar a 42°C de temperatura para su posterior análisis.

### **3.2.4. Extracción de OTA con columnas de inmunoafinidad**

Se utilizó 20 g de café tostado y 20 g verde finamente molido, se adicionó 100 ml de metanol con bicarbonato en una proporción de 7:3 de metanol y solución de bicarbonato de sodio al 1%, respectivamente. Se mezcló con un agitador magnético a alta velocidad durante 3 minutos. Dejar en reposo la muestra durante 3 minutos. Filtrar el sobrenadante líquido a través de un papel Whatman N°. 42.

A 5 ml del filtrado se diluye con 45 ml de PBS/Tween (0.01% v / v) para obtener un volumen final de 50 ml. Se filtró el extracto a través de un papel de filtro.

Con una de jeringa de 50 ml y un adaptador de columna, se pasó la muestra de 50 ml a través de la columna gota a gota. Toda la muestra pasó por gravedad. Se tomó en consideración que la columna no se seque.

Posteriormente se lavó la columna pasando 20 ml de PBS/Tween (0,01% v / v) y con 10 ml de PBS gota a gota. Se aseguró en eliminar todo el líquido de la columna utilizando presión positiva de una jeringa.

### **3.2.5. Preparación de los estándares y curva de calibración**

Para la construcción de la curva de calibración, se utilizaron concentraciones que variaron de 0,05 a 10 ppb. Además, de la solución de trabajo se prepararon las soluciones utilizadas en las pruebas de recuperación según método.

### **3.2.6 Elución de OTA para el HPLC**

Se separó lentamente la ocratoxina A unida a la columna, haciendo pasar 0,75 ml de ácido acético / metanol de grado HPLC (2:98) a través de la columna. Se enjuagó tres veces a través de la columna para asegurar la eliminación completa

de la ocratoxina A unida. Se recogió la ocratoxina A eluida en un vial de vidrio ámbar limpio. NOTA: el lavado a contracorriente se realizó con una jeringa de 5 ml o menos. Luego, se pasó 0,75 ml de metanol a través de la columna gota a gota. Y se recogió el eluyente en el mismo vial de vidrio. Finalmente se agregó 1.5 mL de agua ultrapura en la columna. Se recogió este eluyente en el mismo vial de vidrio. El volumen total de elución ahora será de 3 ml.

### **3.2.7. Pruebas de recuperación**

El método utilizado fue evaluado para determinar la eficacia en el proceso de auto contaminación. Se procedió elaborando un blanco para los granos de café tostado y verde, contaminado al nivel de 5 y 10 µg/kg con estándar de OTA, respectivamente. Las muestras auto contaminadas se trataron de igual manera que las demás.

### **3.2.8. Cuantificación por HPLC**

Los análisis se realizaron mediante cromatografía líquida de alto rendimiento con detección por fluorescencia siguiendo los parámetros recomendados por Tafuri *et al*<sup>79</sup>.

La longitud de onda de excitación fue de 333 nm y la de emisión fue de 460 nm. La temperatura del horno de la columna fue de 25 °C. La elución fue a un flujo constante de 1 mL/min y CH<sub>3</sub>CN (ácido acético 1%) – H<sub>2</sub>O (ácido acético 1%) (50:50 v/v) como el sistema de eluyentes inicial. El sistema inicial fue linealmente modificado a un CH<sub>3</sub>CN 100 % en 20 minutos. Después de 3 minutos de permanecer constante, el sistema fue restablecido linealmente a su condición inicial 10 minutos, sumando un tiempo total de 33 minutos por análisis.

Los eluyentes fueron filtrados de 0,45 µm antes de su uso. Las lecturas de las concentraciones de la curva de calibración se realizaron por triplicado, mientras que para las muestras de café (verde y tostado) se realizó por duplicado. La identificación de Ocratoxina A se realizó a través de su tiempo de retención obteniéndose al realizar diez veces la lectura del estándar a una concentración de 0,05 ppb, esta misma operación fue para obtener el límite de detección (LDD) de 0,1 ppm, con un tiempo de retención promedio de 7,964 minutos (RSD=0,129%)

### 3.2.9 Cálculo del Límite de Detección (LDD) y

El límite de detección es la cantidad mínima necesaria de un componente que puede ser reconocido como un pico en los cromatogramas LC.

Se determino a través de la relación señal –ruido (signal to noise (S/N)) concerniente al equipo instrumental. El software usa la relación S/N para determinar el LDD a partir de la ecuación siguiente:

$$\text{LDD} = K \times \text{Conc} \times N / S \quad (\text{Ec. 01})$$

LDD: Límite de detección

K= Coeficiente (3.3)

Conc= concentración del pico

N= Noise (ruido)

S: Altura del pico (señal)

Se efectuaron diez repeticiones del estándar de menor concentración de la curva de calibración 0.09918ug/L, para el cálculo del límite de detección.

El límite de cuantificación se refiere a la cantidad mínima de un componente objetivo que puede detectarse como tal con la exactitud y precisión requeridas.

### 3.2.10 Límite de Cuantificación (LDC/LQ)

Se determino a través de la relación señal –ruido (signal to noise (S/N)) concerniente al equipo instrumental. El software usa la relación S/N para determinar el LDC o LQ a partir de la ecuación siguiente:

$$\text{LDC} = \alpha \times \text{Conc} \times \text{N} / \text{S} \dots (\text{Ec. 02})$$

LDC: Límite de cuantificación

$\alpha$  Coeficiente (10)

Conc: Concentración del pico

N: Noise (Ruido)

S: Altura del pico

Se realizaron 10 repeticiones del estándar de menor concentración de la curva de calibración para el cálculo del límite de detección y cuantificación.



## CAPÍTULO IV. RESULTADOS

### 4.1 Curva de calibración

**Tabla 2.** Datos de los estándares de ocratoxina A

| # | Concentración Ajustada | Área  | Área promedio |
|---|------------------------|-------|---------------|
| 1 | 0,09918                | 474   | 483           |
|   |                        | 491   |               |
| 2 | 0.9918                 | 4183  | 4183          |
|   |                        | 4183  |               |
| 3 | 4.959                  | 20544 | 20501         |
|   |                        | 20459 |               |
| 4 | 9.918                  | 38705 | 38679         |
|   |                        | 38652 |               |
| 5 | 14.877                 | 30336 | 60321         |
|   |                        | 60306 |               |

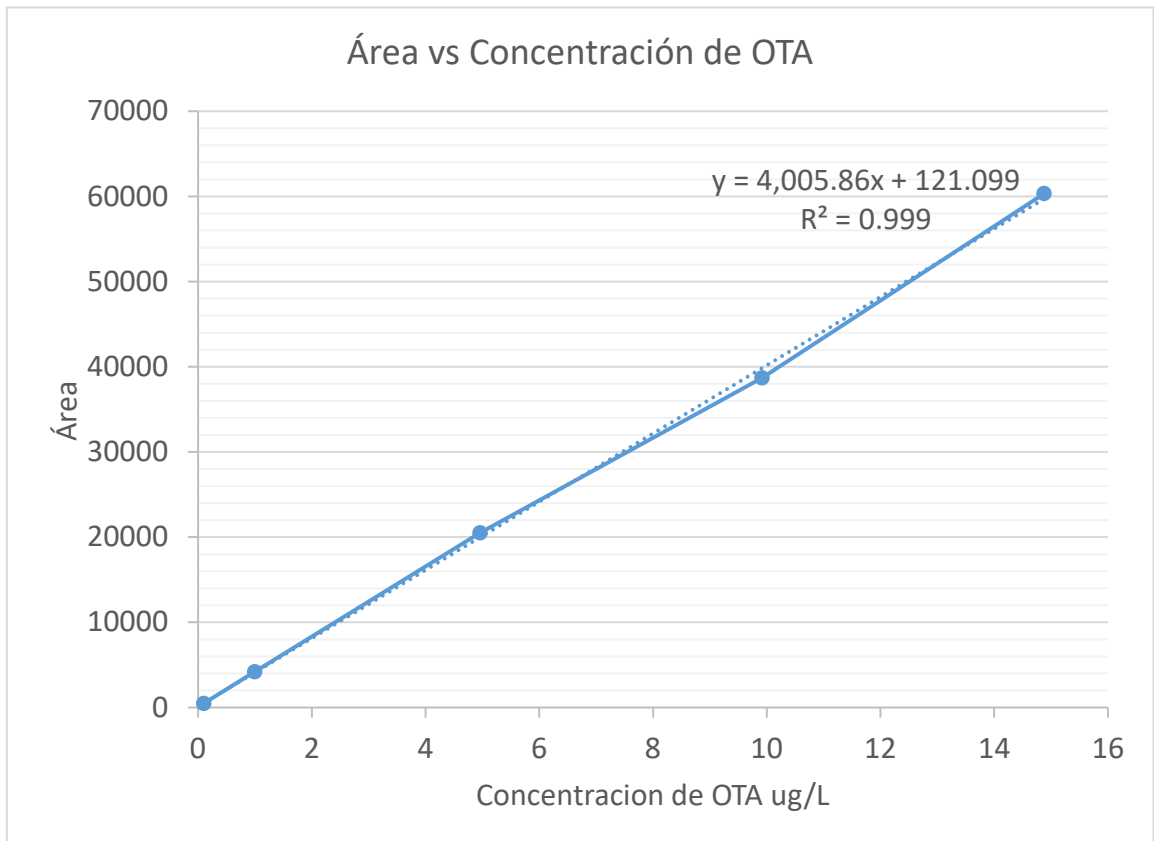
**Tabla 3.** Cuadro estadístico de la curva de calibración.

| # | Concentración ug/L | Área Inyección 1 | Área Inyección 2 | Área Promedio | Desviación estándar | Desviación estándar relativa RSD % |
|---|--------------------|------------------|------------------|---------------|---------------------|------------------------------------|
| 1 | 0.09918            | 474              | 491              | 482.5         | 1.20E+01            | 2.491                              |
| 2 | 0.99180            | 4183             | 4183             | 4183.0        | 0.00E+00            | 0.000                              |
| 3 | 4.95900            | 20544            | 20459            | 20501.5       | 6.01E+01            | 0.293                              |
| 4 | 9.91800            | 38705            | 38652            | 38678.5       | 3.75E+01            | 0.097                              |
| 5 | 14.8770            | 60336            | 60306            | 60321.0       | 2.12E+01            | 0.035                              |

Fuente: Elaboración propia

## Características de la curva de calibración

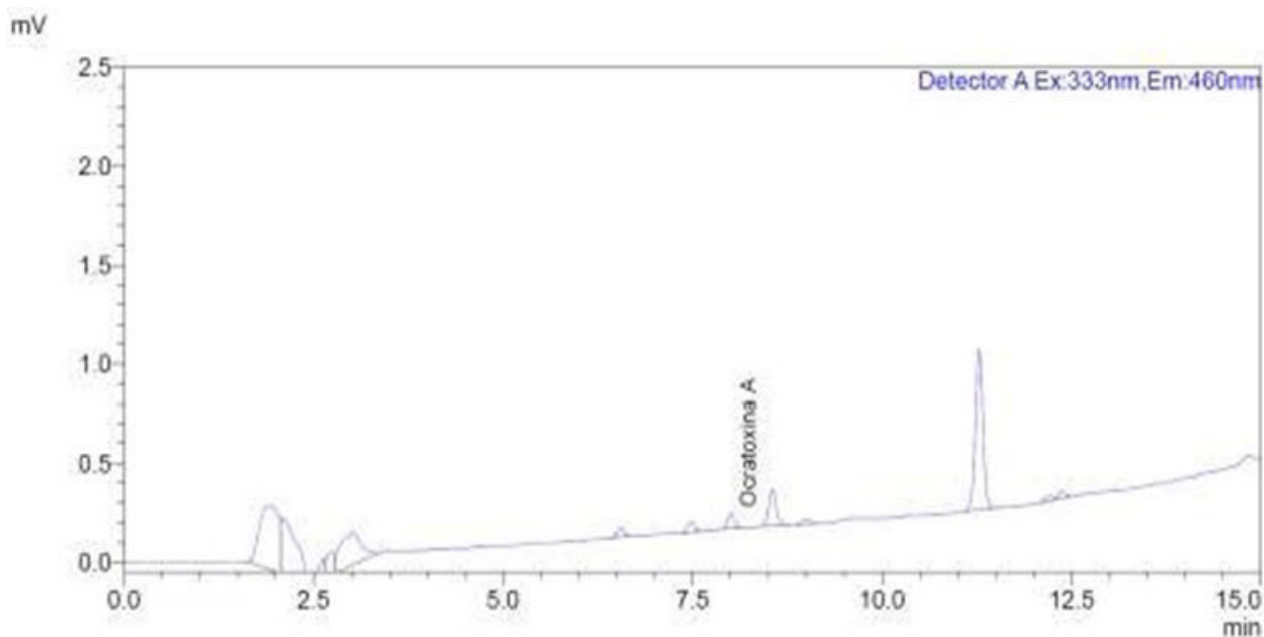
ID# : 1  
Name : Ocratoxina A  
Quantitative Method : External Standard  
Function :  $f(x)=4005.86*x+121.099$   
Rr1=0.9995952 Rr2=0.9991905 RSS=2.015048e+006  
MeanRF: 4.234357e+003 RFSD: 3.527539e+002 RFRSD: 8.330754  
FitType : Linear  
ZeroThrough : Not Through  
Weighted Regression : None  
Detector Name : Detector A



**Figura 9.** Gráfico de dispersión del área de los picos vs concentración de OTA.

Fuente: Elaboración propia

## 4.2. CROMATOGRAMAS DE LOS ESTÁNDARES DE OTA



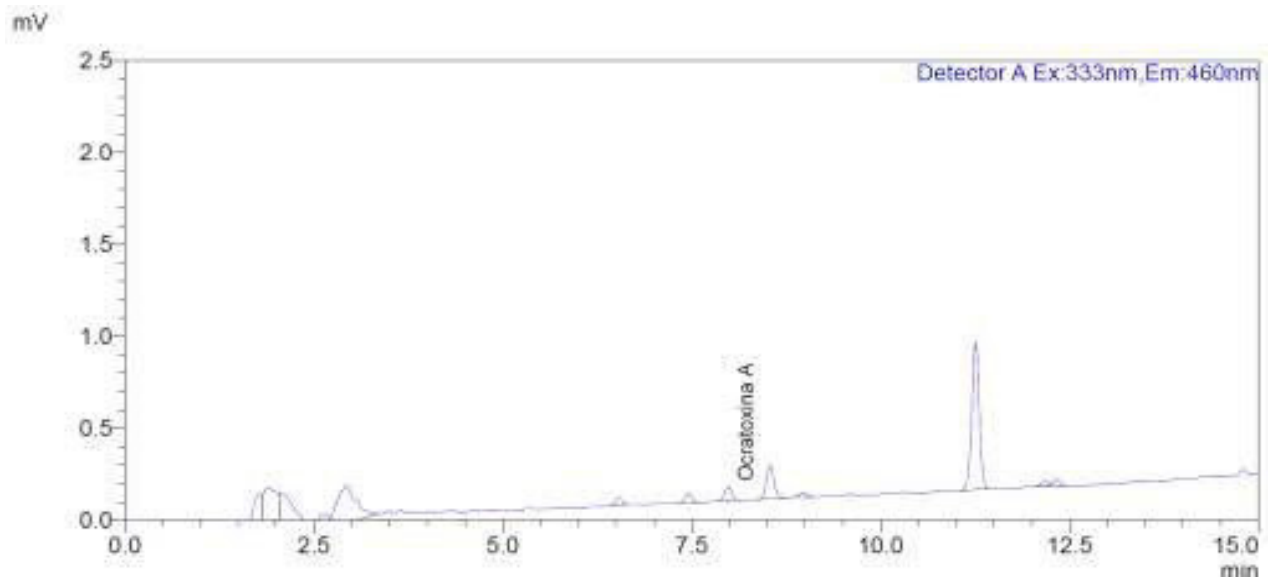
**Figura 10.** Cromatograma HPLC del primer estándar de ocratoxina A (1<sup>ra</sup> inyección)

Fuente: Elaboración propia

**Tabla 4.** Datos cromatográficos del primer estándar de ocratoxina A (1<sup>ra</sup> inyección)

| Picos | Tiempo de retención | Área | Altura | Concentración | Analito      |
|-------|---------------------|------|--------|---------------|--------------|
| 1     | 1,949               | 5690 | 327    | 0             | ----         |
| 2     | 2,107               | 4124 | 286    | 0             | ----         |
| 3     | 2,633               | 801  | 104    | 0             | ----         |
| 4     | 2,72                | 830  | 120    | 0             | ----         |
| 5     | 3,023               | 3198 | 166    | 0             | ----         |
| 6     | 6,558               | 264  | 44     | 0             | ----         |
| 7     | 7,483               | 330  | 51     | 0             | ----         |
| 8     | 8,008               | 474  | 77     | 0,088 ug/L    | Ocratoxina A |
| 9     | 8,553               | 1296 | 184    | 0             | ----         |
| 10    | 9                   | 184  | 27     | 0             | ----         |
| 11    | 11,283              | 5509 | 802    | 0             | ----         |
| 12    | 12,187              | 184  | 23     | 0             | ----         |
| 13    | 12,361              | 201  | 34     | 0             | ----         |

Fuente: Elaboración propia



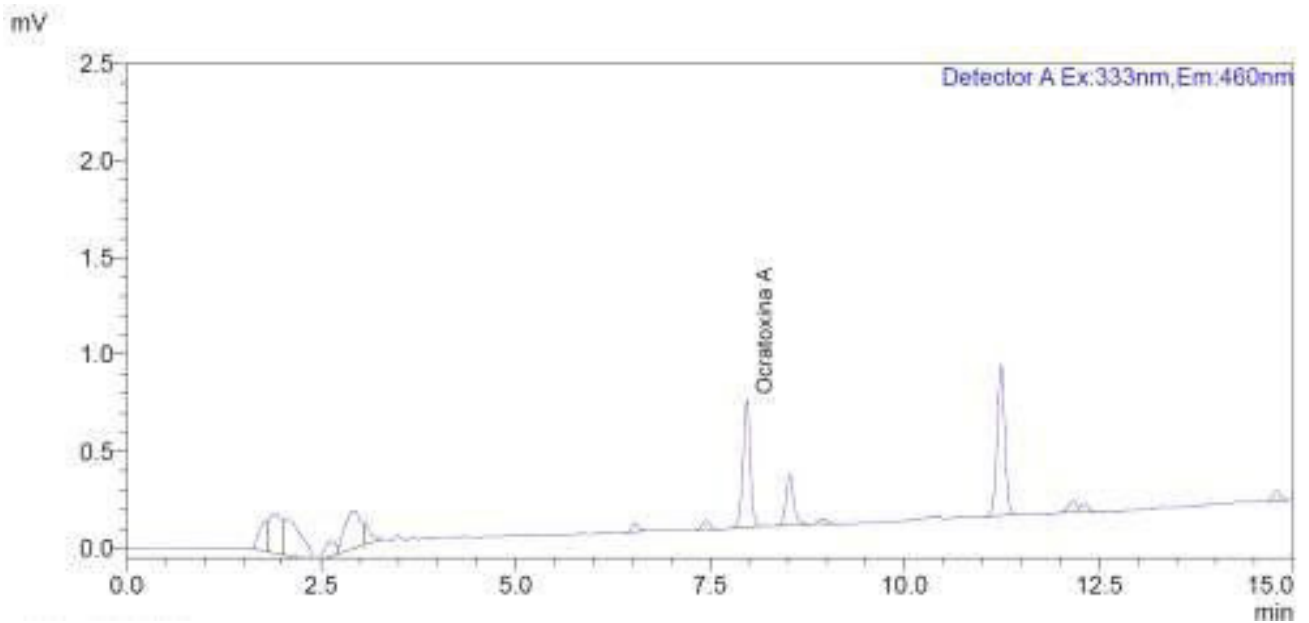
**Figura 11.** Cromatograma HPLC del primer estándar de ocratoxina A (2<sup>da</sup> inyección)

Fuente: Elaboración propia

**Tabla 5.** Datos cromatográficos del primer estándar de ocratoxina A (2<sup>da</sup> inyección)

| Pico | Tiempo de retención | Área | Altura | Concentración | Analito      |
|------|---------------------|------|--------|---------------|--------------|
| 1    | 1,767               | 1139 | 157    | 0             | ----         |
| 2    | 1,9                 | 2562 | 204    | 0             | ----         |
| 3    | 2,107               | 2654 | 186    | 0             | ----         |
| 4    | 2,612               | 923  | 87     | 0             | ----         |
| 5    | 2,936               | 3631 | 207    | 0             | ----         |
| 6    | 6,542               | 246  | 43     | 0             | ----         |
| 7    | 7,460               | 309  | 51     | 0             | ----         |
| 8    | 7,985               | 491  | 76     | 0,092 ug/L    | Ocratoxina A |
| 9    | 8,535               | 1303 | 183    | 0             | ----         |
| 10   | 8,969               | 161  | 24     | 0             | ----         |
| 11   | 11,256              | 5442 | 797    | 0             | ----         |
| 12   | 12,174              | 181  | 26     | 0             | ----         |
| 13   | 12,329              | 235  | 37     | 0             | ----         |

Fuente: Elaboración propia



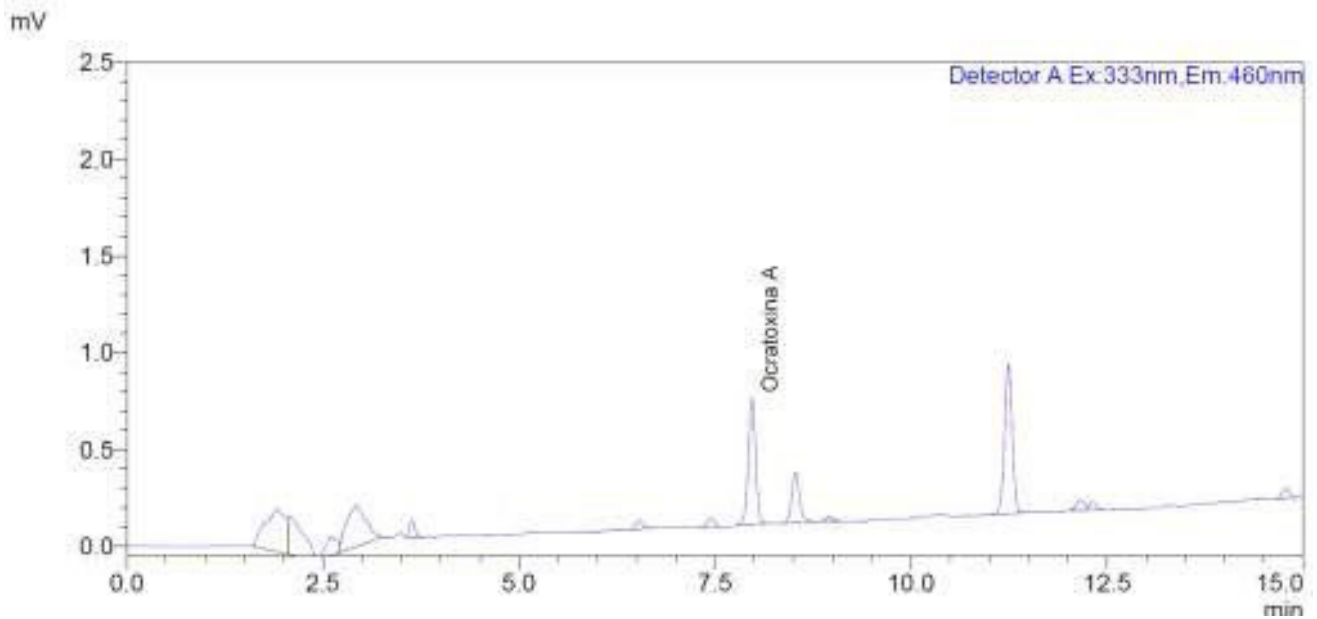
**Figura 12.** Cromatograma HPLC del primer estándar de ocratoxina A (1<sup>ra</sup> inyección)

Fuente: Elaboración propia

**Tabla 6.** Datos cromatográficos del primer estándar de ocratoxina A (1<sup>ra</sup> inyección)

| Pico | Tiempo de retención | Área | Altura | Concentración | Analito      |
|------|---------------------|------|--------|---------------|--------------|
| 1    | 1,773               | 1205 | 153    | 0             | ----         |
| 2    | 1,904               | 2327 | 204    | 0             | ----         |
| 3    | 2,113               | 2762 | 181    | 0             | ----         |
| 4    | 2,612               | 788  | 80     | 0             | ----         |
| 5    | 2,922               | 2841 | 195    | 0             | ----         |
| 6    | 3,073               | 573  | 107    | 0             | ----         |
| 7    | 6,539               | 263  | 44     | 0             | ----         |
| 8    | 7,449               | 274  | 46     | 0             | ----         |
| 9    | 7,971               | 4183 | 655    | 1,014 ug/L    | Ocratoxina A |
| 10   | 8,524               | 1839 | 262    | 0             | ----         |
| 11   | 8,964               | 158  | 25     | 0             | ----         |
| 12   | 11,242              | 5276 | 774    | 0             | ----         |
| 13   | 12,157              | 422  | 56     | 0             | ----         |
| 14   | 12,318              | 267  | 41     | 0             | ----         |
| 15   | 14,79               | 320  | 50     | 0             | ----         |

Fuente: Elaboración propia



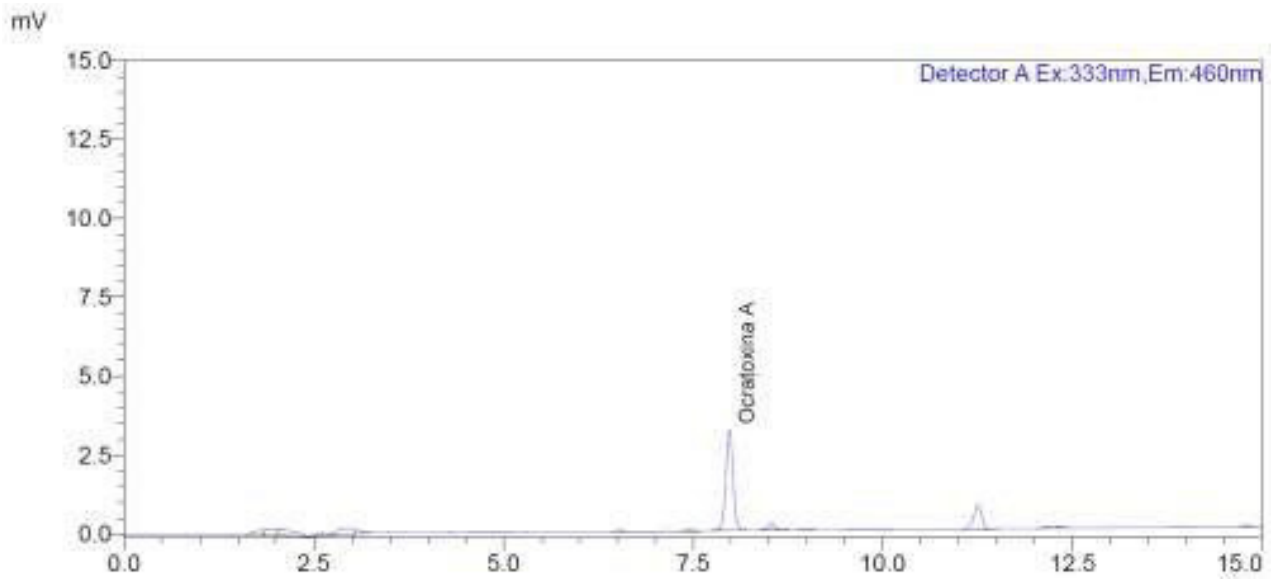
**Figura 13.** Cromatograma HPLC del segundo estándar de ocratoxina A (2<sup>da</sup> inyección)

Fuente: Elaboración propia

**Tabla 7.** Datos cromatográficos del segundo estándar de ocratoxina A (2<sup>da</sup> inyección)

| Pico | Tiempo de retención | Área | Altura | Concentración | Analito      |
|------|---------------------|------|--------|---------------|--------------|
| 1    | 1,919               | 3915 | 218    | 0             | ----         |
| 2    | 2,093               | 2715 | 193    | 0             | ----         |
| 3    | 2,608               | 1023 | 97     | 0             | ----         |
| 4    | 2,932               | 3653 | 213    | 0             | ----         |
| 5    | 3,636               | 423  | 87     | 0             | ----         |
| 6    | 6,535               | 268  | 44     | 0             | ----         |
| 7    | 7,449               | 279  | 47     | 0             | ----         |
| 8    | 7,973               | 4183 | 651    | 1,014 ug/L    | Ocratoxina A |
| 9    | 8,528               | 1809 | 262    | 0             | ----         |
| 10   | 8,962               | 162  | 25     | 0             | ----         |
| 11   | 11,244              | 5260 | 770    | 0             | ----         |
| 12   | 12,163              | 393  | 55     | 0             | ----         |
| 13   | 12,318              | 258  | 39     | 0             | ----         |
| 14   | 14,783              | 332  | 50     | 0             | ----         |

Fuente: Elaboración propia



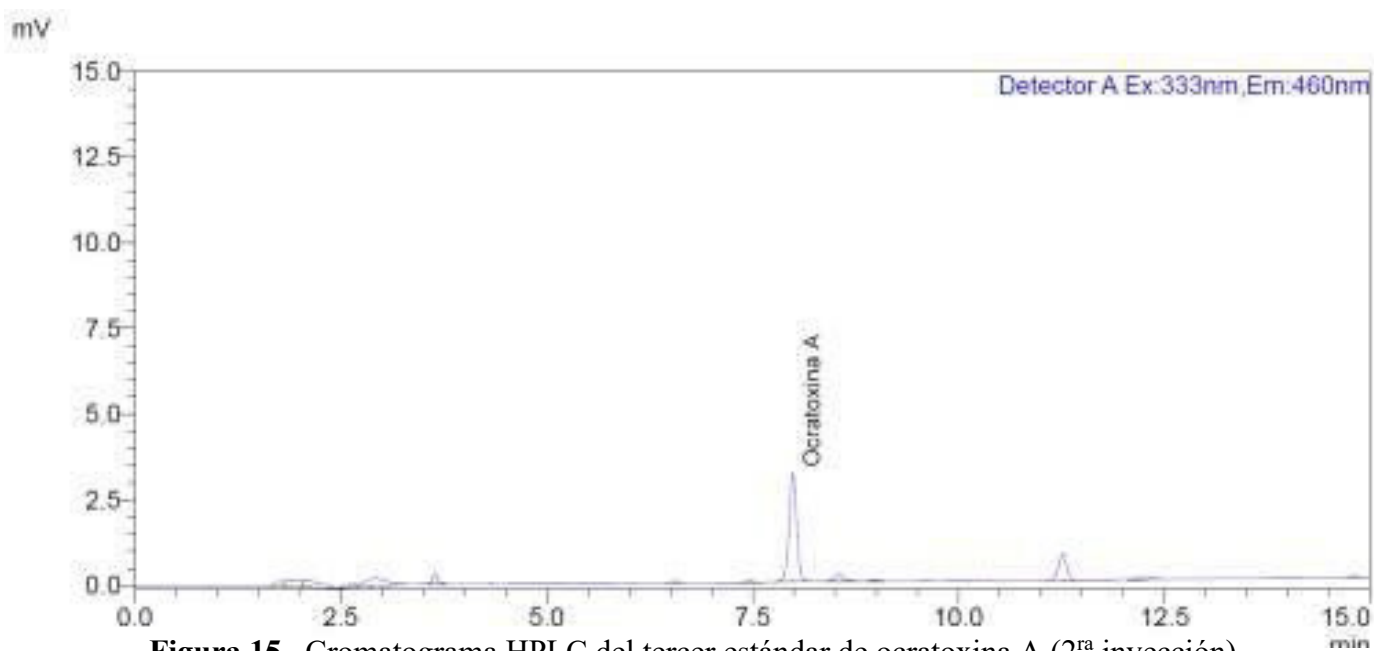
**Figura 14.** Cromatograma HPLC del tercer estándar de ocratoxina A (1<sup>ra</sup> inyección)

Fuente: Elaboración propia

**Tabla 8.** Datos cromatográficos del tercer estándar de ocratoxina A (1<sup>ra</sup> inyección)

| Pico | Tiempo de retención | Área  | Altura | Concentración | Analito      |
|------|---------------------|-------|--------|---------------|--------------|
| 1    | 1,787               | 1175  | 133    | 0             | ----         |
| 2    | 1,913               | 2704  | 194    | 0             | ----         |
| 3    | 2,1                 | 782   | 180    | 0             | ----         |
| 4    | 2,613               | 2649  | 79     | 0             | ----         |
| 5    | 2,93                | 629   | 192    | 0             | ----         |
| 6    | 3,08                | 218   | 103    | 0             | ----         |
| 7    | 6,541               | 304   | 38     | 0             | ----         |
| 8    | 7,459               | 20544 | 50     | 0             | ----         |
| 9    | 7,978               | 20544 | 3175   | 5,098 ug/L    | Ocratoxina A |
| 10   | 8,533               | 1579  | 233    | 0             | ----         |
| 11   | 8,970               | 163   | 24     | 0             | ----         |
| 12   | 11,252              | 5239  | 767    | 0             | ----         |
| 13   | 12,167              | 262   | 36     | 0             | ----         |
| 14   | 12,326              | 251   | 41     | 0             | ----         |
| 15   | 14,786              | 255   | 40     | 0             | ----         |

Fuente: Elaboración propia



**Figura 15.** Cromatograma HPLC del tercer estándar de ocratoxina A (2<sup>ra</sup> inyección)

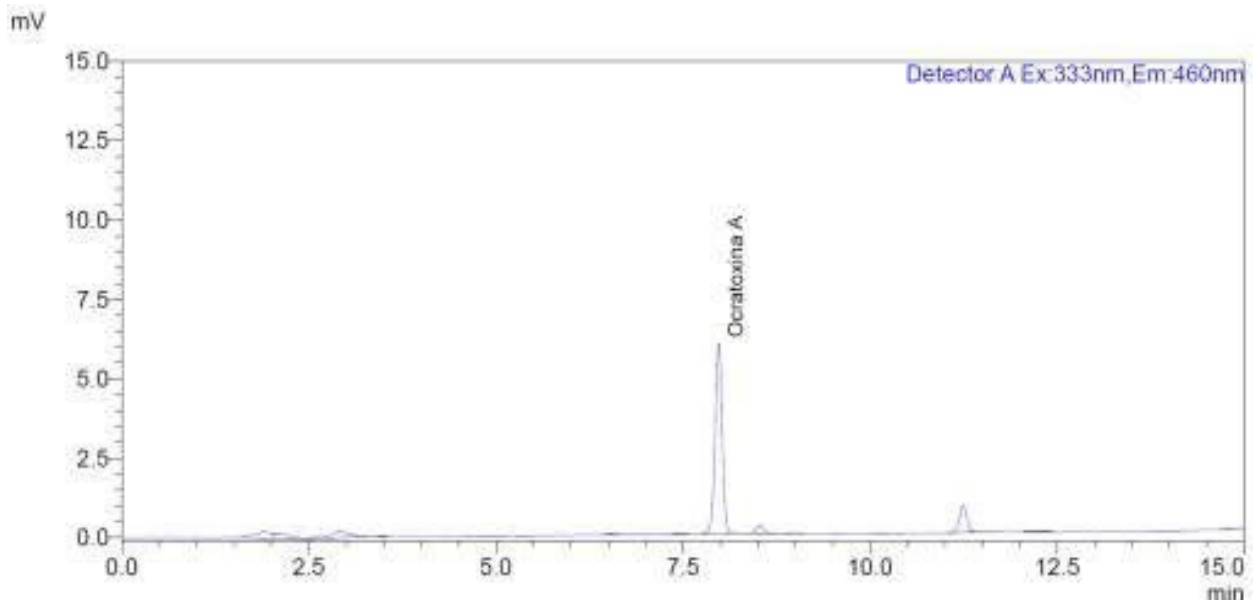
Fuente: Elaboración propia

**Tabla 9.** Datos cromatograficos del tercer estándar de ocratoxina A (2<sup>da</sup> inyección)

| Pico | Tiempo de retención | Área  | Altura | Concentración | Analito      |
|------|---------------------|-------|--------|---------------|--------------|
| 1    | 1,774               | 957   | 150    | 0             | ----         |
| 2    | 1,922               | 2532  | 201    | 0             | ----         |
| 3    | 2,107               | 2726  | 189    | 0             | ----         |
| 4    | 2,635               | 1092  | 99     | 0             | ----         |
| 5    | 2,933               | 3967  | 242    | 0             | ----         |
| 6    | 3,641               | 1340  | 291    | 0             | ----         |
| 7    | 6,551               | 222   | 38     | 0             | ----         |
| 8    | 7,466               | 296   | 49     | 0             | ----         |
| 9    | 7,989               | 20459 | 3151   | 5,077 ug/L    | Ocratoxina A |
| 10   | 8,543               | 1581  | 228    | 0             | ----         |
| 11   | 8,982               | 156   | 24     | 0             | ----         |
| 12   | 11,263              | 5254  | 771    | 0             | ----         |
| 13   | 12,176              | 272   | 36     | 0             | ----         |
| 14   | 12,340              | 272   | 43     | 0             | ----         |
| 15   | 14,799              | 284   | 43     | 0             | ----         |

Fuente: Elaboración propia





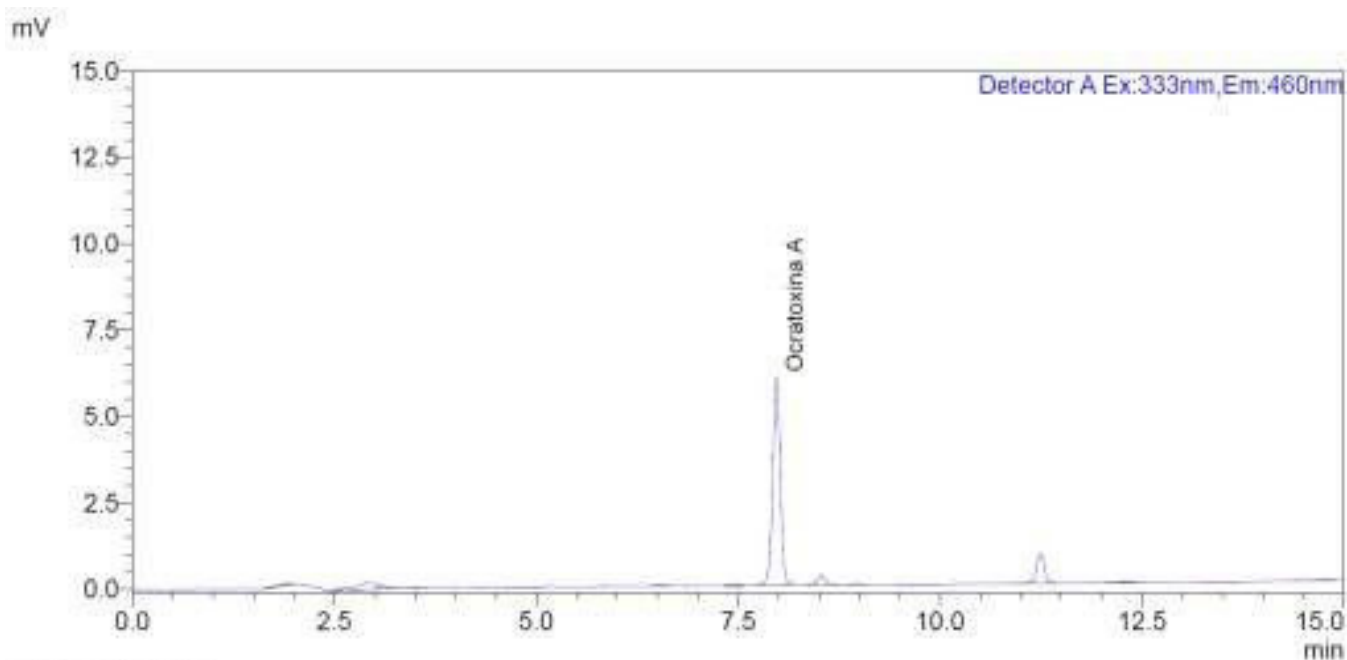
**Figura 16.** Cromatograma HPLC del cuarto estándar de ocratoxina A (1<sup>ra</sup> inyección)

Fuente: Elaboración propia

**Tabla 10.** Datos cromatográficos del cuarto estándar de ocratoxina A (1<sup>ra</sup> inyección)

| Pico | Tiempo de retención | Área  | Altura   | Concentración | Analito      |
|------|---------------------|-------|----------|---------------|--------------|
| 1    | 1,906               | 3379  | 200      | 0             | ----         |
| 2    | 2,113               | 2731  | 183      | 0             | ----         |
| 3    | 2,625               | 792   | 86       | 0             | ----         |
| 4    | 2,935               | 3407  | 205      | 0             | ----         |
| 5    | 3,491               | 120   | 28       | 0             | ----         |
| 6    | 6,540               | 311   | 51       | 0             | ----         |
| 7    | 7,455               | 339   | 56       | 0             | ----         |
| 8    | 7,976               | 38705 | 59597373 | 9,632 ug/L    | Ocratoxina A |
| 9    | 8,964               | 1793  | 268      | 0             | ----         |
| 10   | 8,964               | 176   | 28       | 0             | ----         |
| 11   | 11,244              | 5820  | 854      | 0             | ----         |
| 12   | 12,149              | 201   | 27       | 0             | ----         |
| 13   | 12,313              | 278   | 45       | 0             | ----         |
| 14   | 14,778              | 152   | 26       | 0             | ----         |

Fuente: Elaboración propia



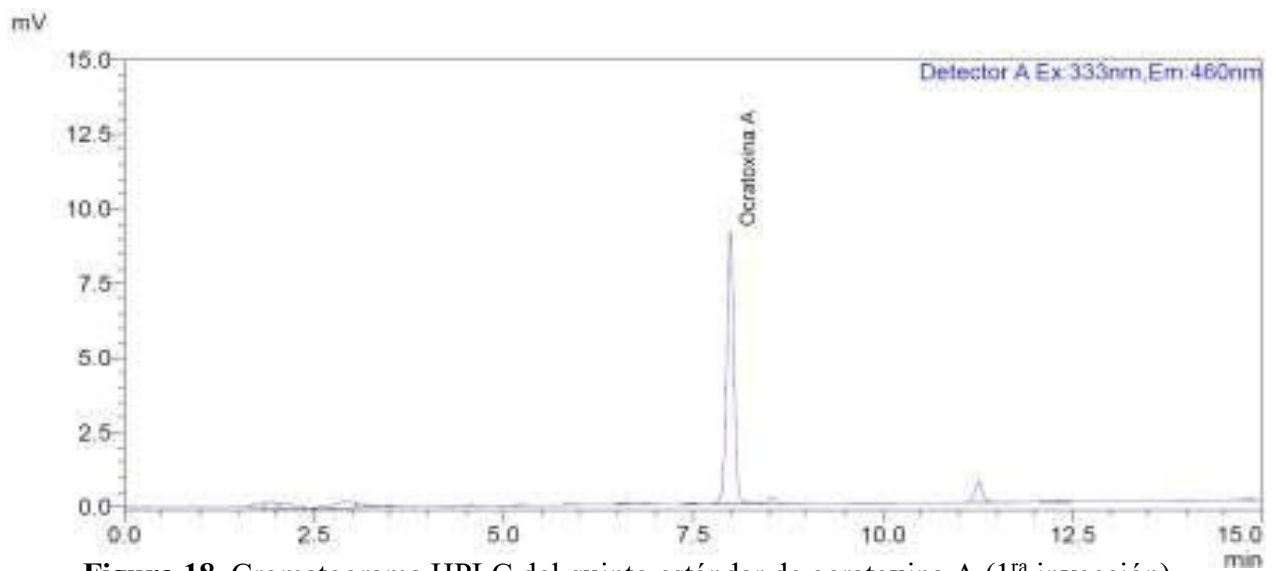
**Figura 17.** Cromatograma HPLC del cuarto estándar de ocratoxina A (2<sup>da</sup> inyección)

Fuente: Elaboración propia

**Tabla 11.** Datos cromatográficos del cuarto estándar de ocratoxina A (2<sup>da</sup> inyección)

| Pico | Tiempo de retención | Área  | Altura | Concentración | Analito      |
|------|---------------------|-------|--------|---------------|--------------|
| 1    | 1,915               | 969   | 54     | 0             | ----         |
| 2    | 2,627               | 817   | 84     | 0             | ----         |
| 3    | 2,931               | 2766  | 197    | 0             | ----         |
| 4    | 3,073               | 631   | 104    | 0             | ----         |
| 5    | 3,489               | 110   | 27     | 0             | ----         |
| 6    | 6,538               | 305   | 51     | 0             | ----         |
| 7    | 7,454               | 352   | 57     | 0             | ----         |
| 8    | 7,976               | 38652 | 5972   | 9,619 ug/L    | Ocratoxina A |
| 9    | 8,530               | 1809  | 268    | 0             | ----         |
| 10   | 8,962               | 179   | 30     | 0             | ----         |
| 11   | 11,243              | 5761  | 848    | 0             | ----         |
| 12   | 12,127              | 115   | 15     | 0             | ----         |
| 13   | 12,315              | 259   | 42     | 0             | ----         |
| 14   | 14,787              | 175   | 28     | 0             | ----         |

Fuente: Elaboración propia



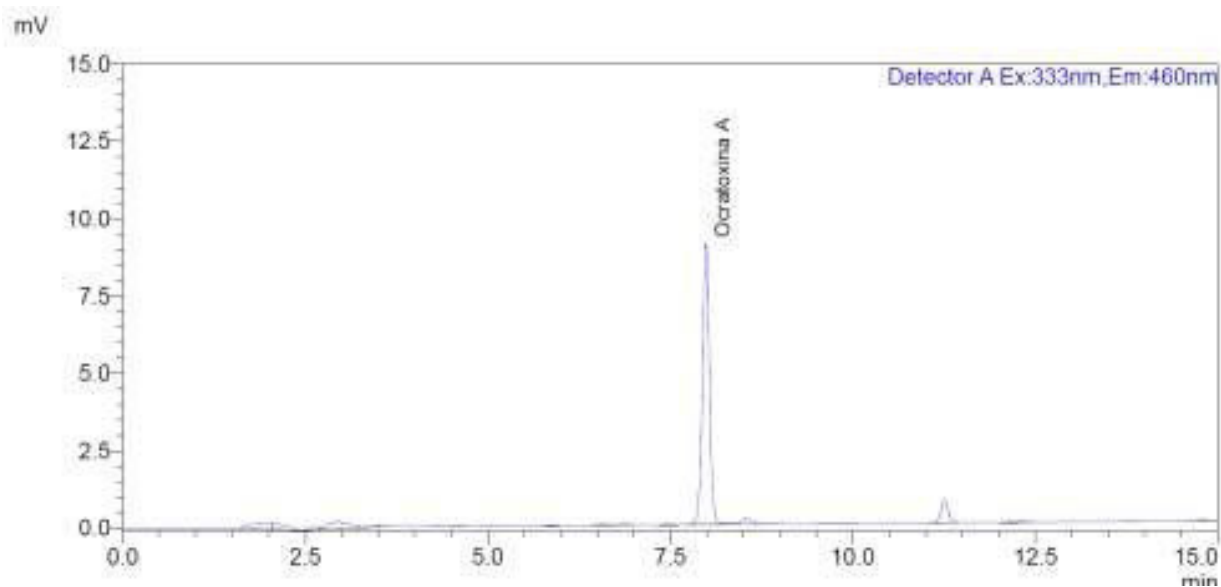
**Figura 18.** Cromatograma HPLC del quinto estándar de ocratoxina A (1<sup>ra</sup> inyección)

Fuente: Elaboración propia

**Tabla 12.** Datos cromatográficos del quinto estándar de ocratoxina A (1<sup>ra</sup> inyección)

| Pico | Tiempo de retención | Área  | Altura | Concentración | Analito      |
|------|---------------------|-------|--------|---------------|--------------|
| 1    | 1,800               | 1218  | 139    | 0             | ----         |
| 2    | 1,925               | 2081  | 200    | 0             | ----         |
| 3    | 2,120               | 2832  | 178    | 0             | ----         |
| 4    | 2,618               | 995   | 96     | 0             | ----         |
| 5    | 2,956               | 3562  | 236    | 0             | ----         |
| 6    | 3,080               | 1311  | 155    | 0             | ----         |
| 7    | 3,494               | 265   | 34     | 0             | ----         |
| 8    | 4,568               | 132   | 26     | 0             | -----        |
| 9    | 5,200               | 119   | 22     | 0             | ----         |
| 10   | 5,871               | 117   | 22     | 0             | ----         |
| 11   | 6,553               | 370   | 49     | 0             | ----         |
| 12   | 6,876               | 430   | 70     | 0             | ----         |
| 13   | 7,465               | 296   | 49     | 0             | ----         |
| 14   | 7,990               | 60336 | 9109   | 15,032 ug/L   | Ocratoxina A |
| 15   | 8,544               | 1559  | 215    | 0             | ----         |
| 16   | 11,266              | 4915  | 722    | 0             | ----         |
| 17   | 12,185              | 233   | 30     | 0             | ----         |
| 18   | 12,345              | 253   | 40     | 0             | ----         |
| 19   | 14,802              | 217   | 35     | 0             | ----         |

Fuente: Elaboración propia



**Figura 19.** Cromatograma HPLC del quinto estándar de ocratoxina A (2<sup>da</sup> inyección)

Fuente: Elaboración propia

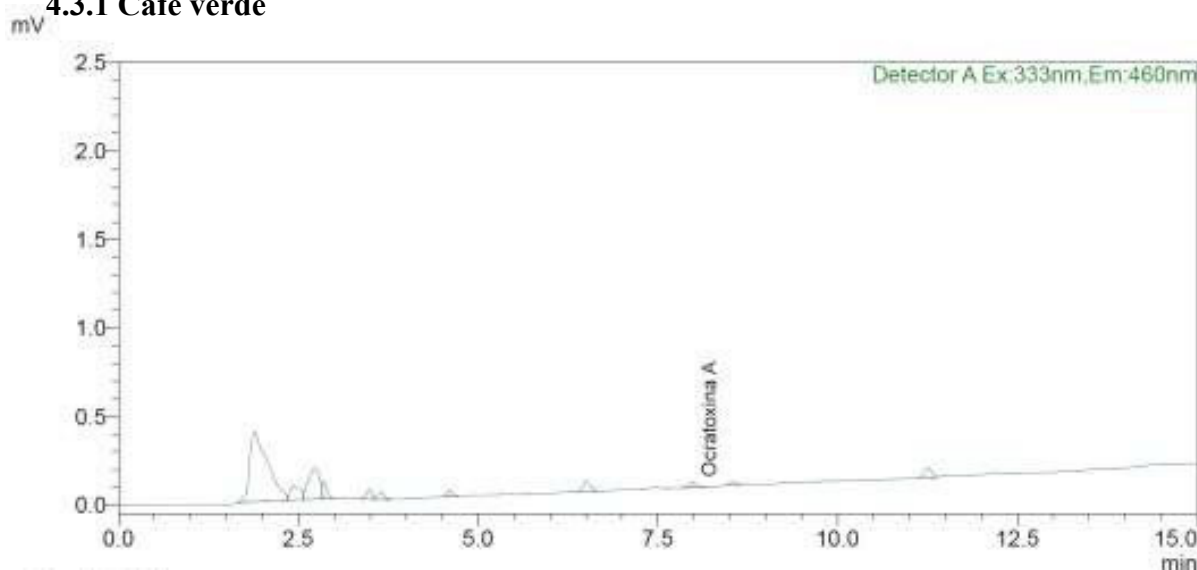
**Tabla 13.** Datos cromatográficos del quinto estándar de ocratoxina A (2<sup>da</sup> inyección)

| Pico | Tiempo de retención | Área  | Altura | Concentración | Analito      |
|------|---------------------|-------|--------|---------------|--------------|
| 1    | 1,926               | 3436  | 195    | 0             | ----         |
| 2    | 2,113               | 2668  | 180    | 0             | ----         |
| 3    | 2,617               | 909   | 94     | 0             | ----         |
| 4    | 2,954               | 4845  | 241    | 0             | ----         |
| 5    | 3,496               | 258   | 33     | 0             | ----         |
| 6    | 4,572               | 134   | 25     | 0             | ----         |
| 7    | 5,870               | 140   | 24     | 0             | ----         |
| 8    | 6,551               | 380   | 50     | 0             | ----         |
| 9    | 6,873               | 473   | 70     | 0             | ----         |
| 10   | 7,464               | 315   | 50     | 0             | ----         |
| 11   | 7,988               | 60306 | 9103   | 15,024 ug/L   | Ocratoxina A |
| 12   | 8,542               | 1559  | 216    | 0             | ----         |
| 13   | 11,258              | 4892  | 721    | 0             | ----         |
| 14   | 12,163              | 271   | 33     | 0             | ----         |
| 15   | 12,328              | 268   | 41     | 0             | ----         |
| 16   | 14,790              | 219   | 35     | 0             | ----         |

Fuente: Elaboración propia

### 4.3. CROMATOGRAMAS DE LAS MUESTRAS DE CAFÉ

#### 4.3.1 Café verde



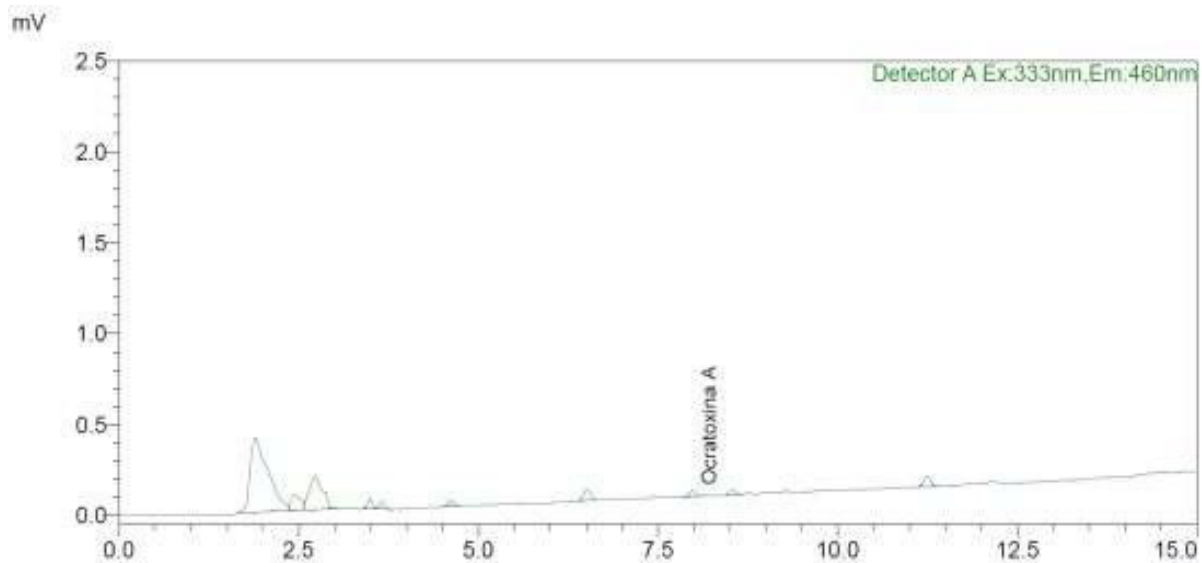
**Figura 20.** Cromatograma HPLC de la primera muestra problema de café verde (1<sup>ra</sup>

Fuente : Elaboración propia

**Tabla 14.** Datos cromatográficos de la primera muestra problema de café verde (1<sup>ra</sup> inyección)

| Pico | Tiempo de retención | Área | Altura | Concentración | Analito      |
|------|---------------------|------|--------|---------------|--------------|
| 1    | 1,902               | 6880 | 393    | 0             | ----         |
| 2    | 2,432               | 765  | 81     | 0             | ----         |
| 3    | 2,729               | 1937 | 178    | 0             | ----         |
| 4    | 2,867               | 356  | 91     | 0             | ----         |
| 5    | 3,486               | 275  | 56     | 0             | ----         |
| 6    | 3,659               | 263  | 41     | 0             | ----         |
| 7    | 4,614               | 165  | 32     | 0             | ----         |
| 8    | 6,510               | 378  | 56     | 0             | ----         |
| 9    | 7,986               | 197  | 31     | 0,019 ug/L    | Ocratoxina A |
| 10   | 8,545               | 101  | 21     | 0             | ----         |
| 11   | 11,260              | 344  | 52     | 0             | ----         |

Fuente: Elaboración propia



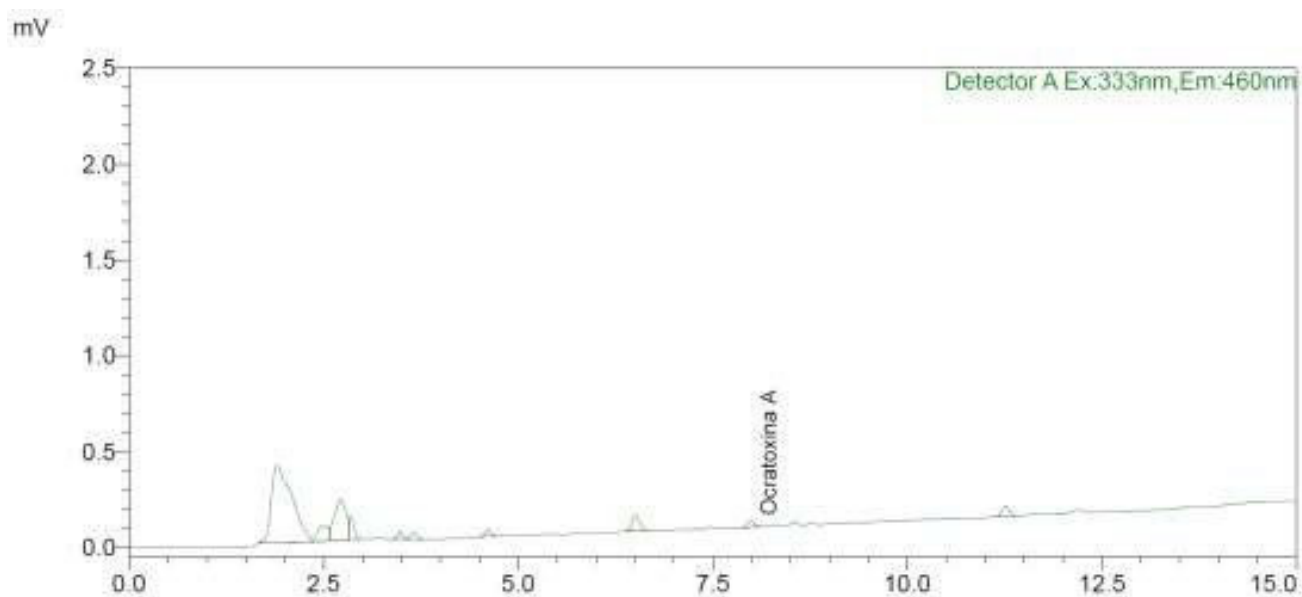
**Figura 21.** Cromatograma HPLC de la primera muestra problema de café verde (2<sup>da</sup> inyección)

Fuente: Elaboración propia

**Tabla 15.** Datos cromatográficos de la primera muestra problema de café verde (2<sup>ra</sup> inyección)

| Pico | Tiempo de retención | Área | Altura | Concentración | Analito      |
|------|---------------------|------|--------|---------------|--------------|
| 1    | 1,903               | 7145 | 411    | 0             | ----         |
| 2    | 2,438               | 800  | 84     | 0             | ----         |
| 3    | 2,728               | 2349 | 179    | 0             | ----         |
| 4    | 3,489               | 225  | 52     | 0             | ----         |
| 5    | 3,661               | 228  | 38     | 0             | ----         |
| 6    | 4,614               | 178  | 35     | 0             | ----         |
| 7    | 6,509               | 385  | 57     | 0             | ----         |
| 8    | 7,981               | 197  | 32     | 0,019 ug/L    | Ocratoxina A |
| 9    | 8,537               | 131  | 23     | 0             | ----         |
| 10   | 11,246              | 355  | 55     | 0             | ----         |

Fuente: Elaboración propia

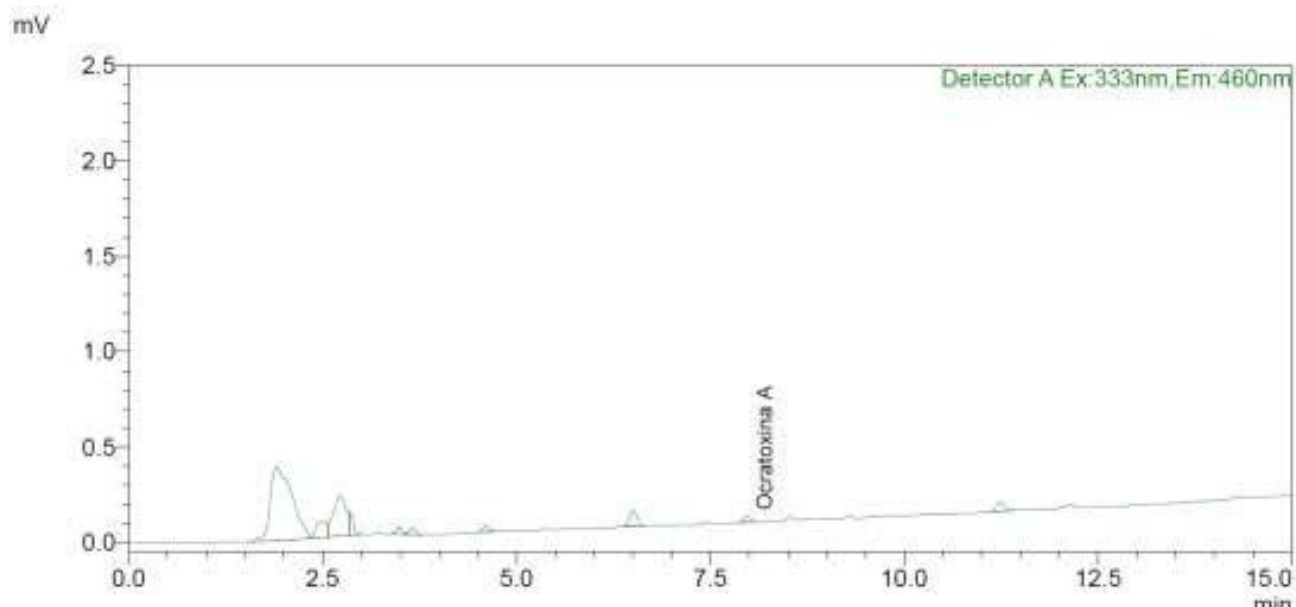


**Figura 22.** Cromatograma HPLC de la segunda muestra problema de café verde (1<sup>ra</sup> inyección) Fuente: Elaboración propia

**Tabla 16.** Datos cromatográficos de la segunda muestra problema de café verde (1<sup>ra</sup> inyección)

| Pico | Tiempo de retención | Área | Altura | Concentración | Analito      |
|------|---------------------|------|--------|---------------|--------------|
| 1    | 1,907               | 7360 | 399    | 0             | ----         |
| 2    | 2,473               | 787  | 80     | 0             | ----         |
| 3    | 2,721               | 2205 | 211    | 0             | ----         |
| 4    | 2,860               | 479  | 114    | 0             | ----         |
| 5    | 3,487               | 172  | 41     | 0             | ----         |
| 6    | 3,662               | 207  | 37     | 0             | ----         |
| 7    | 4,613               | 183  | 35     | 0             | ----         |
| 8    | 6,507               | 538  | 83     | 0             | ----         |
| 9    | 7.990               | 185  | 32     | 0,016 ug/L    | Ocratoxina A |
| 10   | 11,266              | 337  | 53     | 0             | ----         |

Fuente: Elaboración propia



**Figura 22.** Cromatograma HPLC de la segunda muestra problema de café verde (2<sup>ra</sup> inyección) Fuente: Elaboración propia

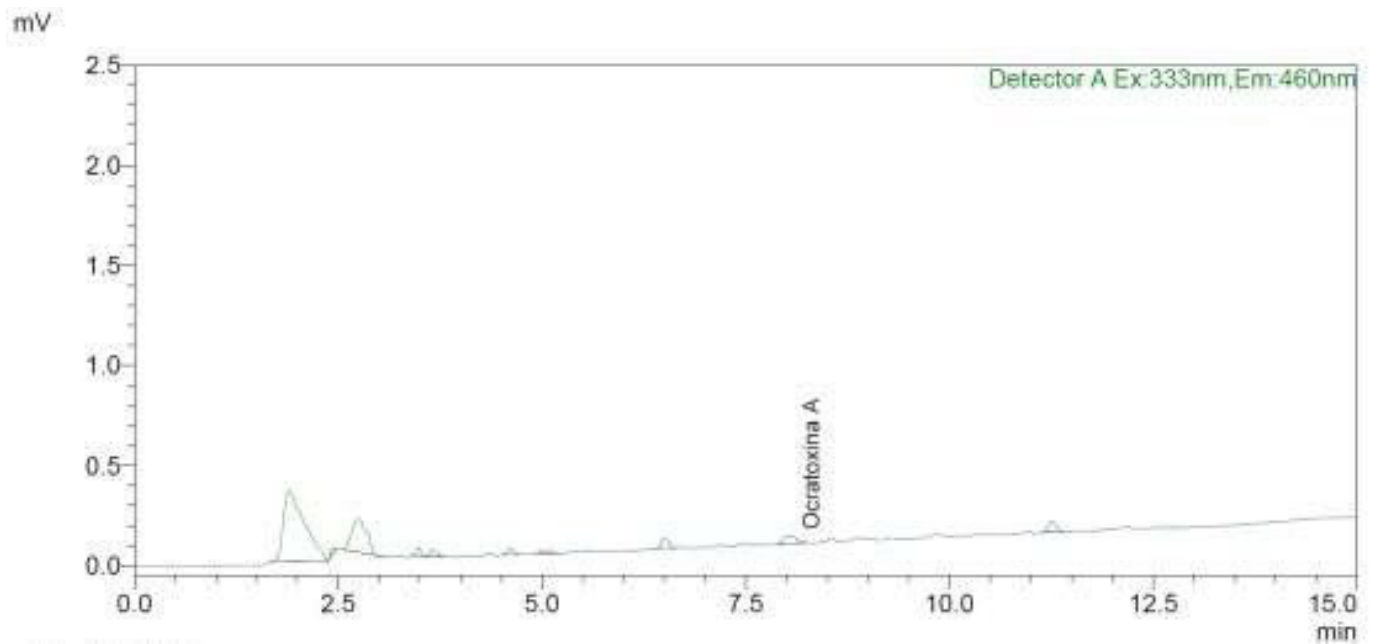
**Tabla 17.** Datos cromatográficos de la segunda muestra problema de café verde (2<sup>ra</sup> inyección)

| Pico | Tiempo de retención | Área | Altura | Concentración | Analito      |
|------|---------------------|------|--------|---------------|--------------|
| 1    | 1,909               | 7547 | 388    | 0             | ----         |
| 2    | 2,467               | 874  | 83     | 0             | ----         |
| 3    | 2,722               | 2349 | 214    | 0             | ----         |
| 4    | 2,860               | 458  | 119    | 0             | ----         |
| 5    | 3,483               | 177  | 40     | 0             | ----         |
| 6    | 3,659               | 216  | 38     | 0             | ----         |
| 7    | 4,659               | 199  | 37     | 0             | ----         |
| 8    | 6,498               | 546  | 84     | 0             | ----         |
| 9    | 7,974               | 182  | 32     | 0,015 ug/L    | Ocratoxina A |
| 10   | 11,238              | 340  | 52     | 0             | ----         |

Fuente: Elaboración propia



### 4.3.2 Café tostado

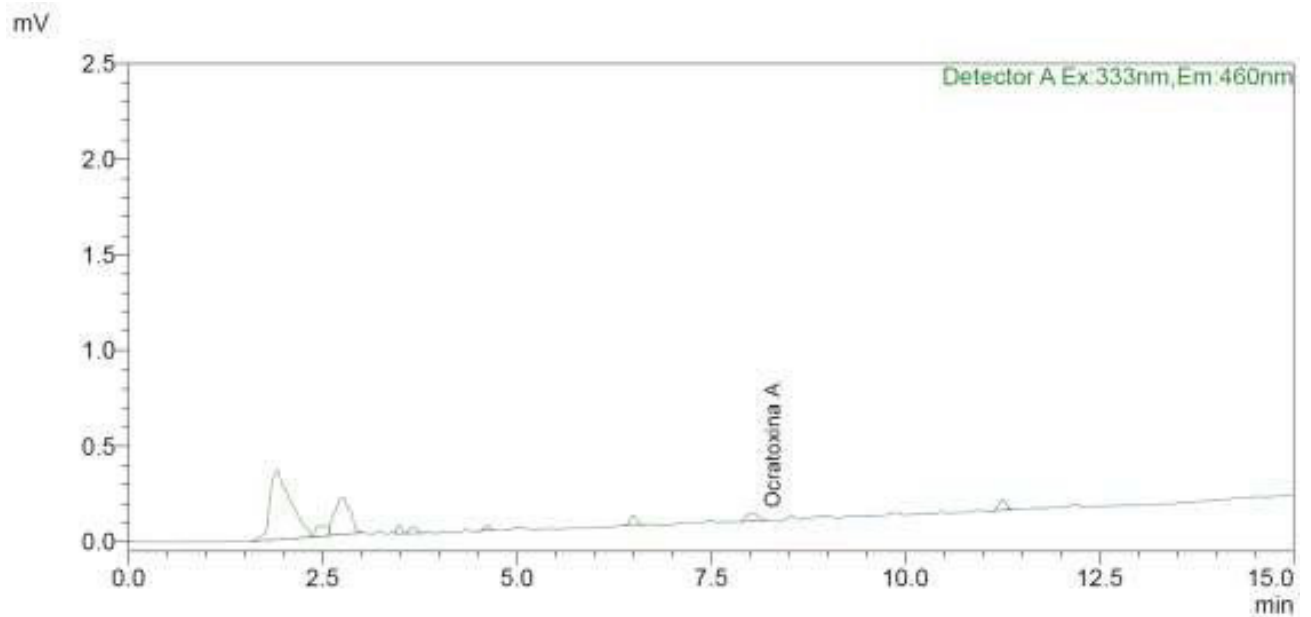


**Figura 23.** Cromatograma HPLC de la primera muestra problema de café tostado (1<sup>ra</sup> inyección) Fuente: Elaboración propia

**Tabla 18.** Datos cromatográficos de la primera muestra problema de café tostado (1<sup>ra</sup> inyección)

| Pico | Tiempo de retención | Área | Altura | Concentración | Analito      |
|------|---------------------|------|--------|---------------|--------------|
| 1    | 1,908               | 6288 | 356    | 0             | ----         |
| 2    | 2,432               | 109  | 30     | 0             | ----         |
| 3    | 2,736               | 2089 | 163    | 0             | ----         |
| 4    | 3,487               | 148  | 39     | 0             | ----         |
| 5    | 3,652               | 231  | 35     | 0             | ----         |
| 6    | 4,616               | 149  | 31     | 0             | ----         |
| 7    | 5,083               | 132  | 16     | 0             | ----         |
| 8    | 6,510               | 298  | 49     | 0             | ----         |
| 9    | 8,077               | 407  | 37     | 0,071 ug/L    | Ocratoxina A |
| 10   | 11,259              | 377  | 57     | 0             | ----         |

Fuente: Elaboración propia

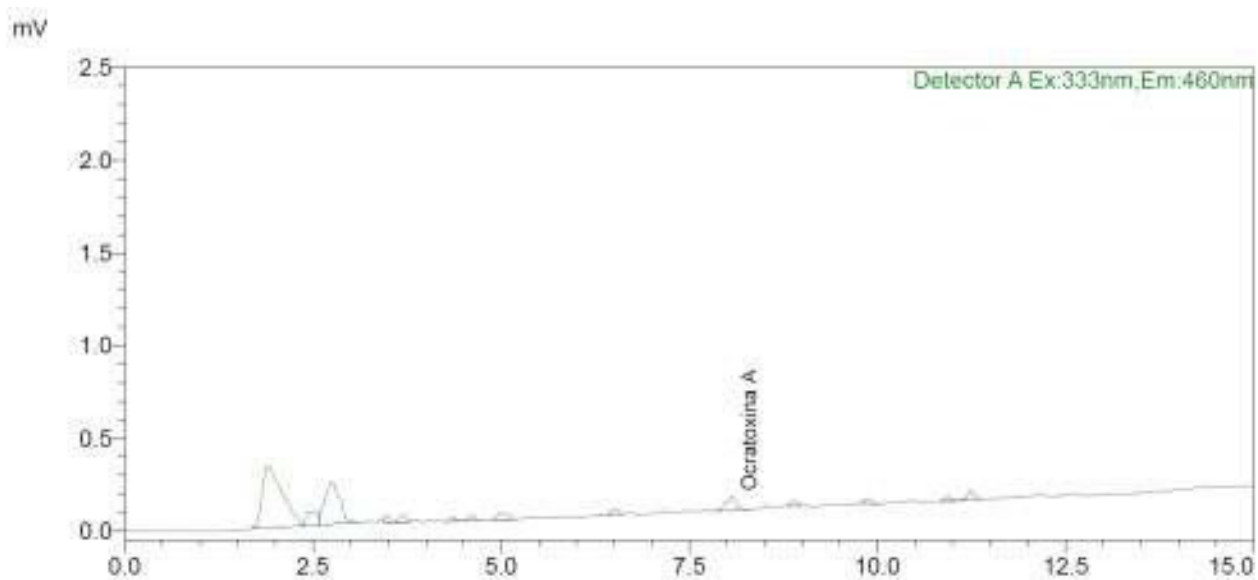


**Figura 24.** Cromatograma HPLC de la primera muestra problema de café tostado (2<sup>da</sup> inyección) Fuente: Elaboración propia

**Tabla 19.** Datos cromatográficos de la primera muestra problema de café tostado (2<sup>ra</sup> inyección)

| Pico | Tiempo de retención | Área | Altura | Concentración | Analito      |
|------|---------------------|------|--------|---------------|--------------|
| 1    | 1,917               | 6685 | 362    | 0             | ----         |
| 2    | 2,427               | 573  | 57     | 0             | ----         |
| 3    | 2,767               | 2664 | 192    | 0             | ----         |
| 4    | 3,485               | 193  | 45     | 0             | ----         |
| 5    | 3,648               | 241  | 36     | 0             | ----         |
| 6    | 4,612               | 147  | 31     | 0             | ----         |
| 7    | 6,497               | 287  | 47     | 0             | ----         |
| 8    | 8,066               | 413  | 37     | 0,073 ug/L    | Ocratoxina A |
| 9    | 11,257              | 372  | 57     | 0             | ----         |

Fuente: Elaboración propia



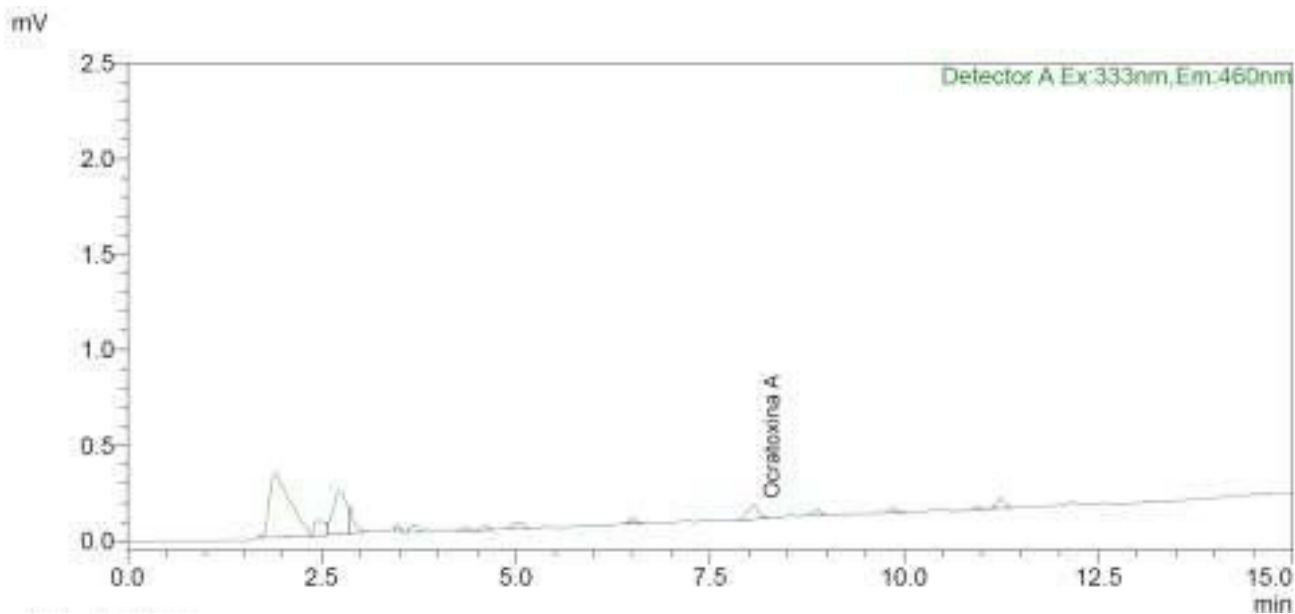
**Figura 25.** Cromatograma HPLC de la segunda muestra problema de café tostado (1<sup>ra</sup> inyección)

Fuente: Elaboración propia

**Tabla 20.** Datos cromatográficos de la segunda muestra problema de café tostado (1<sup>ra</sup> inyección)

| Pico | Tiempo de retención | Área | Altura | Concentración | Analito      |
|------|---------------------|------|--------|---------------|--------------|
| 1    | 1,909               | 6060 | 335    | 0             | ----         |
| 2    | 2,433               | 805  | 77     | 0             | ----         |
| 3    | 2,737               | 3121 | 225    | 0             | ----         |
| 4    | 3,485               | 145  | 36     | 0             | ----         |
| 5    | 3,709               | 259  | 40     | 0             | ----         |
| 6    | 4,353               | 107  | 23     | 0             | ----         |
| 7    | 4,614               | 144  | 28     | 0             | ----         |
| 8    | 5,079               | 320  | 33     | 0             | ----         |
| 9    | 6,505               | 177  | 28     | 0             | ----         |
| 10   | 8,071               | 704  | 74     | 0,145 ug/L    | Ocratoxina A |
| 11   | 8,880               | 153  | 27     | 0             | ----         |
| 12   | 9,869               | 164  | 27     | 0             | ----         |
| 13   | 10,931              | 114  | 19     | 0             | ----         |
| 14   | 11,244              | 356  | 51     | 0             | ----         |

Fuente: Elaboración propia



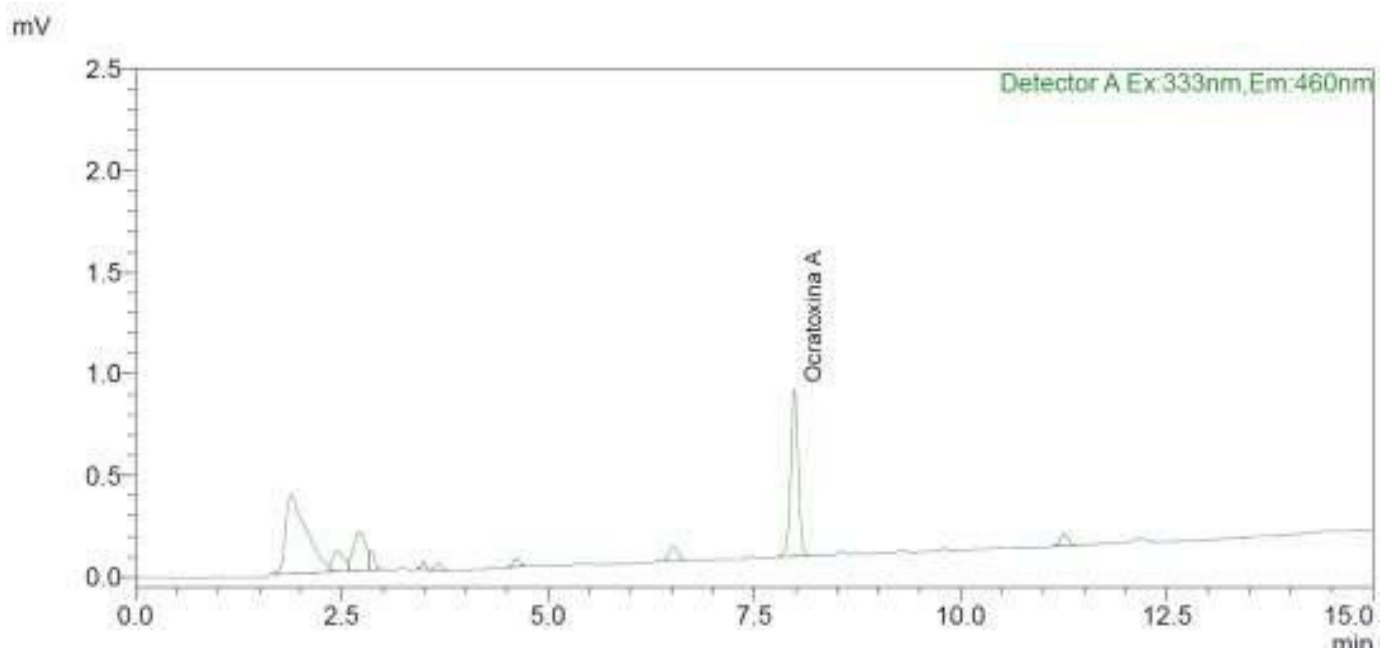
**Figura 26.** Cromatograma HPLC de la segunda muestra problema de café tostado (2<sup>ra</sup> inyección) Fuente: Elaboración propia

**Tabla 21.** Datos cromatográficos de la segunda muestra problema de café tostado (2<sup>ra</sup> inyección)

| Pico | Tiempo de retención | Área | Altura | Concentración | Analito      |
|------|---------------------|------|--------|---------------|--------------|
| 1    | 1,911               | 6136 | 338    | 0             | ----         |
| 2    | 2,433               | 804  | 77     | 0             | ----         |
| 3    | 2,740               | 2567 | 227    | 0             | ----         |
| 4    | 2,873               | 651  | 136    | 0             | ----         |
| 5    | 3,482               | 149  | 36     | 0             | ----         |
| 6    | 3,710               | 256  | 38     | 0             | ----         |
| 7    | 4,355               | 114  | 23     | 0             | ----         |
| 8    | 4,612               | 147  | 28     | 0             | ----         |
| 9    | 5,076               | 307  | 32     | 0             | ----         |
| 10   | 6,502               | 164  | 27     | 0             | ----         |
| 11   | 8,070               | 723  | 75     | 0,150 ug/L    | Ocratoxina A |
| 12   | 8,868               | 145  | 26     | 0             | ----         |
| 13   | 9,868               | 130  | 25     | 0             | ----         |
| 14   | 10,945              | 107  | 19     | 0             | ----         |
|      | 11,249              | 319  | 48     | 0             | ----         |

Fuente: Elaboración propia

#### 4.4 Pruebas de recuperación



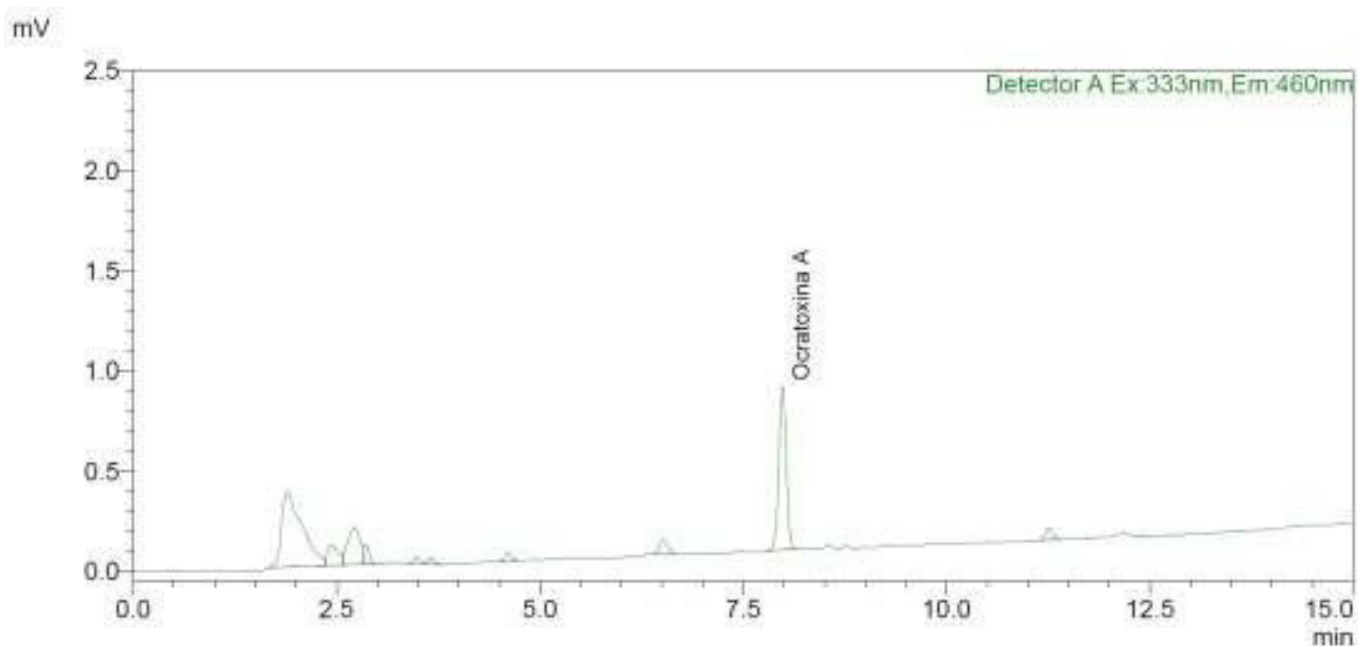
**Figura 27.** Cromatograma del porcentaje de recuperación inyección 1(1<sup>ra</sup> inyección)

Fuente: Elaboración propia

**Tabla 22.** Datos cromatográficos contaminación de café verde (1<sup>ra</sup> inyección)

| Pico | Tiempo de retención | Área | Altura | Concentración | Analito      |
|------|---------------------|------|--------|---------------|--------------|
| 1    | 1,898               | 6793 | 387    | 0             | ----         |
| 2    | 2,440               | 981  | 102    | 0             | ----         |
| 3    | 2,719               | 1954 | 190    | 0             | ----         |
| 4    | 2,867               | 397  | 94     | 0             | ----         |
| 5    | 3,493               | 152  | 36     | 0             | ----         |
| 6    | 3,672               | 180  | 33     | 0             | ----         |
| 7    | 4,620               | 206  | 42     | 0             | ----         |
| 8    | 6,516               | 458  | 68     | 0             | ----         |
| 9    | 7,988               | 5142 | 821    | 1,253 ug/mL   | Ocratoxina A |
| 10   | 11,256              | 379  | 58     | 0             | ----         |

Fuente: Elaboración propia



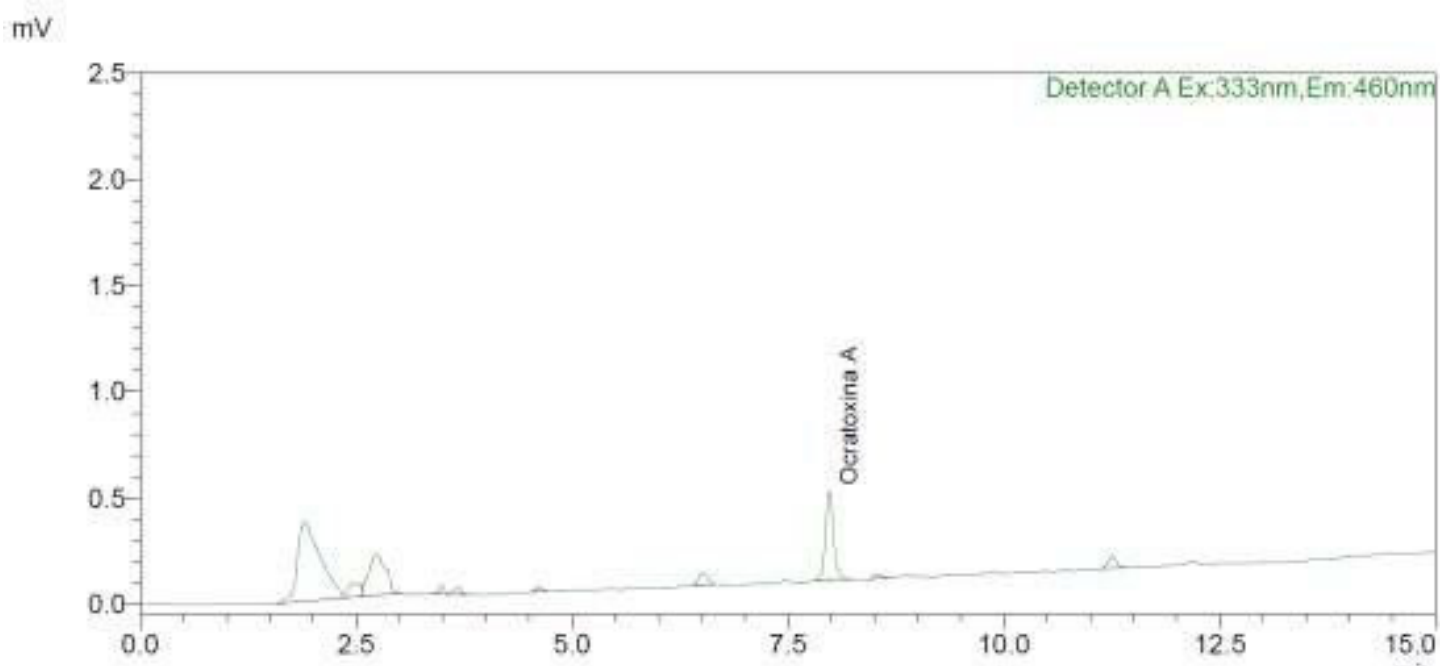
**Figura 28.** Cromatograma del porcentaje de recuperación inyección 2 (2<sup>ra</sup> inyección)

Fuente: Elaboración propia

**Tabla 23.** Datos cromatográficos contaminación de café verde (2<sup>ra</sup> inyección)

| Pico | Tiempo de retención | Área | Altura | Concentración | Analito      |
|------|---------------------|------|--------|---------------|--------------|
| 1    | 1,898               | 6567 | 375    | 0             | ----         |
| 2    | 2,438               | 955  | 101    | 0             | ----         |
| 3    | 2,719               | 2021 | 188    | 0             | ----         |
| 4    | 2,867               | 401  | 94     | 0             | ----         |
| 5    | 3,487               | 157  | 36     | 0             | ----         |
| 6    | 3,666               | 176  | 33     | 0             | ----         |
| 7    | 4,609               | 233  | 45     | 0             | ----         |
| 8    | 6,512               | 467  | 70     | 0             | ----         |
| 9    | 7,984               | 5109 | 815    | 1,245 ug/mL   | Ocratoxina A |
| 10   | 11,261              | 384  | 59     | 0             | ----         |

Fuente: Elaboración propia

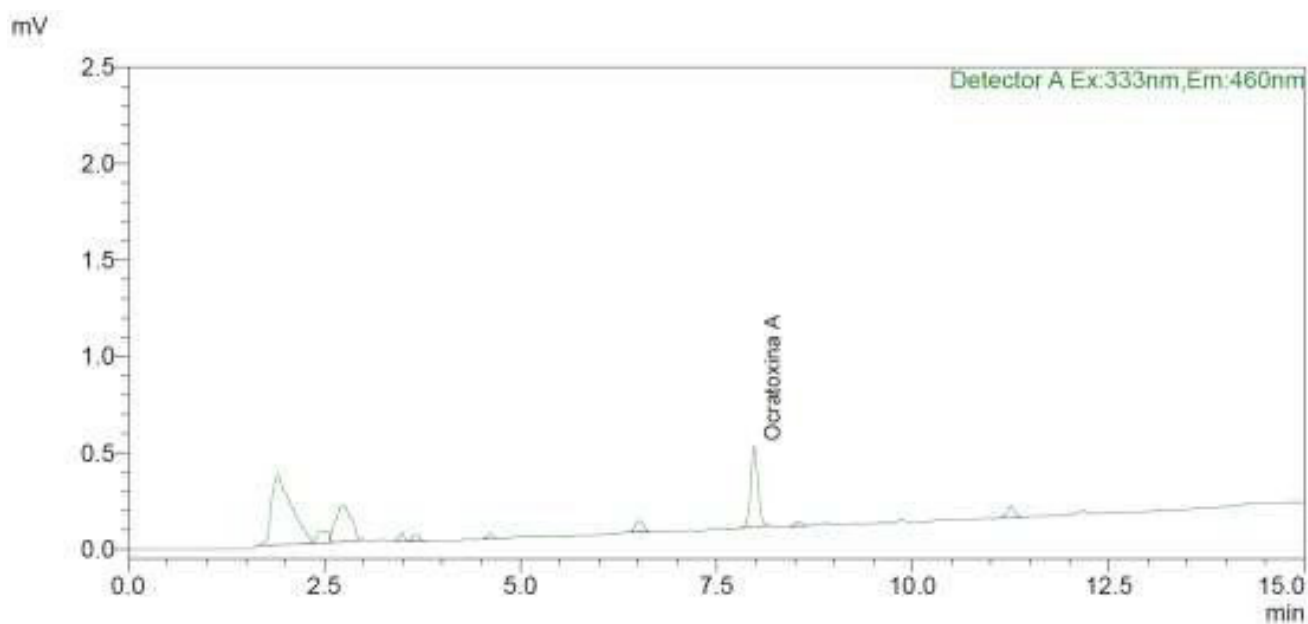


**Figura 29.** Cromatograma del porcentaje de recuperación del café tostado (1<sup>ra</sup> inyección) Fuente: Elaboración propia

**Tabla 24.** Datos cromatográficos contaminación de café tostado (1<sup>ra</sup> inyección)

| Pico | Tiempo de retención | Área | Altura | Concentración | Analito      |
|------|---------------------|------|--------|---------------|--------------|
| 1    | 1,910               | 6890 | 377    | 0             | ----         |
| 2    | 2,433               | 683  | 62     | 0             | ----         |
| 3    | 2,727               | 2535 | 189    | 0             | ----         |
| 4    | 3,486               | 164  | 39     | 0             | ----         |
| 5    | 3,671               | 177  | 30     | 0             | ----         |
| 6    | 4,617               | 111  | 23     | 0             | ----         |
| 7    | 6,508               | 383  | 57     | 0             | ----         |
| 8    | 7,980               | 2697 | 417    | 0,643 ug/mL   | Ocratoxina A |
| 9    | 8,545               | 110  | 20     | 0             | ----         |
| 10   | 11,249              | 374  | 56     | 0             | ----         |

Fuente: Elaboración propia



**Figura 30.** Cromatograma del porcentaje de recuperación del café tostado (2<sup>da</sup> inyección) Fuente: Elaboración propia

**Tabla 25.** Datos cromatográficos contaminación de café tostado (2<sup>da</sup> inyección)

| Pico | Tiempo de retención | Área | Altura | Concentración | Analito      |
|------|---------------------|------|--------|---------------|--------------|
| 1    | 1,909               | 6386 | 361    | 0             | ----         |
| 2    | 2,460               | 633  | 59     | 0             | ----         |
| 3    | 2,726               | 2561 | 190    | 0             | ----         |
| 4    | 3,487               | 174  | 41     | 0             | ----         |
| 5    | 3,667               | 197  | 33     | 0             | ----         |
| 6    | 4,612               | 111  | 23     | 0             | ----         |
| 7    | 6,510               | 405  | 58     | 0             | ----         |
| 8    | 7,982               | 2634 | 415    | 0,627 ug/mL   | Ocratoxina A |
| 9    | 8,543               | 130  | 23     | 0             | ----         |
| 10   | 11,254              | 376  | 58     | 0             | ----         |

Fuente: Elaboración propia



#### 4.5 LÍMITE DE DETECCIÓN (LDD) Y LÍMITE CUANTIFICACIÓN (QL)

**Tabla 26.** Parámetros necesarios para determinar el LDT Y QL.

| N°                | Tiempo de retención, min | Área  | Altura | Conc. (ug/L) | Noise (Ruido) | LDD*         | QL*          |
|-------------------|--------------------------|-------|--------|--------------|---------------|--------------|--------------|
| 1                 | 7.959                    | 463   | 75     | 0.0853       | 5.28          | 0.020        | 0.060        |
| 2                 | 7.955                    | 443   | 73     | 0.0804       | 5.40          | 0.020        | 0.060        |
| 3                 | 7.961                    | 460   | 75     | 0.0845       | 5.35          | 0.020        | 0.060        |
| 4                 | 7.963                    | 456   | 73     | 0.0837       | 5.22          | 0.020        | 0.060        |
| 5                 | 7.978                    | 449   | 73     | 0.0819       | 4.81          | 0.018        | 0.054        |
| 6                 | 7.971                    | 448   | 73     | 0.0817       | 5.50          | 0.020        | 0.062        |
| 7                 | 7.954                    | 464   | 75     | 0.0857       | 5.10          | 0.019        | 0.058        |
| 8                 | 7.954                    | 471   | 75     | 0.0872       | 5.01          | 0.019        | 0.058        |
| 9                 | 7.981                    | 455   | 73     | 0.0834       | 4.60          | 0.017        | 0.053        |
| 10                | 7.989                    | 448   | 71     | 0.0816       | 5.12          | 0.019        | 0.059        |
| <b>Promedio</b>   | 7.964                    | 456.6 | 73.9   | 0.0838       | 5.14          | <b>0.019</b> | <b>0.058</b> |
| <b>Desviación</b> | 0.010                    | 8.9   | 1.1    | 0.0022       | 0.29          | <b>0.001</b> | <b>0.003</b> |
| <b>RSD, %</b>     | 0.129                    | 1.950 | 1.427  | 2.572        | 5.697         | <b>5.176</b> | <b>5.176</b> |

Fuente: Elaboración propia

\*Cálculo del LDD =  $3.3 \times \text{Concx N/ S (ug/L)}$

\*\*Cálculo del QL =  $10 \times \text{Concx N/ S (ug/L)}$

**Tabla 27.** Interpretación de los niveles contaminantes de OTA en muestras de Café verde y Café tostado.

| <b>Muestra analizada</b>  | <b>Nivel de OTA (ug/Kg)</b> |
|---------------------------|-----------------------------|
| <b>Café Verde (CV1)</b>   | 0.057 ug/Kg                 |
| <b>Café Verde (CV2)</b>   | No cuantificable            |
| <b>Café Tostado (CT1)</b> | 0.216 ug/Kg                 |
| <b>Café Tostado (CT2)</b> | 0.444 ug/Kg                 |

Fuente: Elaboración propia

**Tabla 28.** Porcentaje de recuperación de OTA en muestras de Café verde y Café tostado.

| <b>Muestra analizada</b>            | <b>Porcentaje (%) de recuperación de OTA</b> |
|-------------------------------------|--|
| <b>Recuperación en Café Verde</b>   | 74.94 %                                      |
| <b>Recuperación en Café Tostado</b> | 76.20 %                                      |

Fuente: Elaboración propia

## CAPÍTULO V. DISCUSIÓN

La presencia en el café de hongos filamentosas, tales como *Aspergillus ochraceus* y *Penicillium viridicatum* que contaminan dicho producto y afectan su calidad, provocando la formación de micotoxinas del tipo Ocratoxina A (considerada la más peligrosa), la cual representa un problema de seguridad alimentaria, generando impacto en la salud humana y animal.

Las muestras escogidas para la presente investigación corresponden a la región central del país, Departamento de Junín, en la zona cafetalera de Chanchamayo, conocida por la calidad de sus granos<sup>81</sup>.

En la metodología utilizada, se optó por la técnica que nos diera la mayor sensibilidad para detectar el metabolito secundario (OTA) y estableciendo los protocolos de análisis más adecuados. Para la estandarización del método se utilizó un estándar de Ocratoxina A con una pureza > 98%; también se empleó las Columnas de Inmunoafinidad y Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)<sup>79,13</sup> con detección de fluorescencia como metodología actualizada.

La identificación de la ocratoxina A en el HPLC se realizó observando el tiempo promedio de retención de las diluciones de trabajo, el cual fue de 7,964 min, a partir del estándar de menor concentración (0,09918 µg /L) realizándose 10 repeticiones observándose en las tablas 4 al 13.

En trabajos recientes sobre OTA, utilizando el mismo equipo, pero muestras distintas como higo<sup>74</sup>, paprika<sup>75</sup> y caco trinitario<sup>76</sup>, el valor promedio del tiempo de retención para el estándar de OTA, es casi similar obteniéndose 7,9691 min., 7,967 min. y 8,245 respectivamente.

La extracción de la ocratoxina A con un solvente adecuado permitirá su fijación sobre el material de la columna de inmunoafinidad para su recuperación y cuantificación posterior<sup>81</sup>.

En la investigación realizada se utilizó un método estandarizado para la detección de OTA en muestras de café verde y tostado<sup>79</sup>. Las columnas de inmovilización son de la firma NeoColumn código 8640, el cual posee un método de extracción validado para muestras de café verde, tostado e instantáneo<sup>79,81,82</sup>.

Sabiendo que la OTA es una molécula de polaridad media, se busca utilizar solventes polares y semipolares tales como metanol al 60% y agua al 40%<sup>7,82</sup>. También, es muy común utilizar metanol y solución de bicarbonato de sodio al 3% en la relación 1:1<sup>8</sup>.

Hay reportes que muestran la utilización de solventes como la acetona, cloroformo y acetato de etilo, para la extracción de Ocratoxina A en matrices complejas<sup>9-11</sup>, cabe acotar que el uso de solventes apolares como el acetato de etilo para la extracción de OTA, se debe a un procedimiento de desengrase adicional antes de la detección o purificación<sup>9</sup>.

La dilución realizada en nuestro método y el uso de PBS ajustado a 7,4 de pH, permite que se realice la conversión de OP-OTA en OTA antes del proceso de purificación por columnas de inmovilización.

Cuando el pH es demasiado alto conducen a la formación de OTA de anillo abierto (OP-OA), que no es reconocido por los anticuerpos OTA en el procedimiento de purificación o limpieza. Estas circunstancias ya han sido reportadas durante el análisis de otras matrices contaminadas con OTA<sup>14,15</sup>.

Las pruebas de recuperación de las muestras auto contaminadas con OTA, se encuentran en porcentajes de 76,23 % al nivel de 5 µg/kg para el café tostado y 74,94% al nivel de 10 µg/kg para café verde. Los límites de recuperación comúnmente aceptados para un nivel de contaminación de OTA de 10 µg/kg están comprendidos entre 70 a 125% de recuperación<sup>12</sup>. Para la concentración evaluada de 5 µg/kg y 10 µg/kg de OTA, el porcentaje de recuperación del método usado se encuentra entre estos límites. Sin embargo, existen métodos en donde el porcentaje de recuperación para concentraciones más bajas de OTA (5 µg/kg) fue inferior al 70% con el método de validado por la Unión Europea (UE) “14132”<sup>10</sup>. La recuperación por el método de Pittet<sup>70</sup>, el cual emplea solventes como metanol y bicarbonato de sodio al 3%, difieren del método usado en la

presente experiencia, en los volúmenes de extracción y soluciones estabilizadas de lavado (PBS pH 7,4).

Se analizó el contenido de OTA en muestras de granos de café verde y tostado, los resultados se muestran en las tablas 14,15,16, y 17 para el café verde y en las tablas 18, 19, 20 y 21 para el café tostado.

Las muestras fueron analizadas por duplicado, encontrándose para el café verde los valores entre 0,015 y 0,019  $\mu\text{g/L}$  equivalentes a 0,045 ppb y 0,057 ppb; estudios realizados por otros investigadores reportan valores disimiles como en Argentina se encontró un valor medio de 2,7  $\mu\text{g/Kg}$ <sup>8</sup>, otro en Ecuador para café verde 1,47  $\mu\text{g/Kg}$ <sup>13</sup> y en Panamá se reportó valores entre 4,9 – 37,73  $\mu\text{g/kg}$  de OTA<sup>83</sup>.

Para el caso del café tostado se encontraron valores de  $0,072 \pm 0,001$  y  $0,150 \mu\text{g/L}$  equivalentes a 0,216 y 0,444 ppb de OTA. Mientras que Diaz y col.<sup>14</sup> encontraron en la zona de Junín la menor presencia de micotoxinas ( $0,67 \pm 1,15$ )  $\mu\text{g/L}$ , mientras que se registró una alta variabilidad en las muestras del Cusco ( $2,20 \pm 4,92$ )  $\mu\text{g/L}$ .

Valores encontrados de OTA por distintos investigadores en los países de la región reportan lo siguiente: 0,1 a 5 ppb (Brasil)<sup>12</sup>, 0,004 a 0,960  $\mu\text{g/Kg}$  (Costa Rica)<sup>84</sup>, 16.8 ppb (Guatemala)<sup>77</sup>. En países europeos como Portugal se han encontrado valores de 1,84 y 1,45  $\mu\text{g/kg}$  para el café tostado y molido respectivamente<sup>6</sup>, en España la contaminación media de OTA es  $2.07 \pm 0.61 \text{ ng / g}$ <sup>11</sup> y también en Italia aunque la muestra fue café instantáneo contenían OTA en niveles que van desde 0,32 a 6,40  $\mu\text{g / kg}$ <sup>10</sup>, estos reportes mostrados nos estaría indicando que en nuestro país el café presenta una menor contaminación de esta micotoxina, por tanto, ello beneficiaría su mayor consumo que provocaría una mejora económica al caficultor y a las empresas exportadoras de este rubro, beneficiando también a nuestro país con la obtención de un mayor ingreso de divisas.

## CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES

- En las dos muestras de café verde provenientes de distrito de Perene, provincia de Chanchamayo, se logró determinar la presencia de OTA mediante Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia y columnas de Inmunofinidad en una muestra al nivel de 0,019 ug de OTA/L de solución equivalentes a 0,057 ug de OTA/Kg de café verde, mientras que la otra muestra no superó el Límite de Detección, con un valor inferior a 0,019 ug/L.
- En las dos muestras de café tostado provenientes de distrito de Perene, provincia de Chanchamayo, se determinó la presencia de OTA mediante Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia y columnas de Inmunofinidad en 0,072 y 0,148 ug de ocratoxina/L de solución, equivalentes a 0,216 y 0,444 ug de ocratoxina /Kg de café tostado.
- Los niveles detectados de ocratoxina A en muestras de Café verde y café tostado no superan los límites máximos recomendados en la Norma Técnica Peruana (INACAL) de 10 ppb, tampoco superan los niveles establecidos por regulaciones internacionales como la Comunidad Europea con valor límite de 5 ppb.

## CAPÍTULO VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ali R, Ismail M, Bhalli J. Effect of temperature on ochratoxin A production in common cereals by aspergillus species. The Journal of Animal & Plant Sciences. 2013;(23)4: 1316-1320. Disponible: [https://www.researchgate.net/publication/285989126\\_Effect\\_of\\_temperature\\_on\\_ochratoxin\\_A\\_production\\_in\\_common\\_cereals\\_by\\_Aspergillus\\_species](https://www.researchgate.net/publication/285989126_Effect_of_temperature_on_ochratoxin_A_production_in_common_cereals_by_Aspergillus_species)
2. Revalo A, Ruvio C, Gutierrez A. La ocratoxina A en alimentos de consumo humano: revision. Nutrición Hospitalaria. 2011;26(6):1215-1226. Disponible: [https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0212-16112011000600004](https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-16112011000600004)
3. Binder E, Tan L, Chin L, Handl J, Richard J. Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds, and feed ingredients. Animal Feed Science and Technology. 2007;137(3-4):265-282. Disponible: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0377840107002192>
4. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Perspectivas a plazo medio de los productos básicos agrícolas. Roma, 2004. Disponible: <https://www.fao.org/3/y5143e/y5143e00.htm>
5. Commission of the European Communities. Regulation (EC) 1881/2006 of 19/12/2006. Official J.Eu.Commun., L364, 5-24;2006. Disponible: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=celex%3A32006R1881>
6. Benites A, Fernandes M, Boleto A, Azevedo S, Silva S, Leitão A. Occurrence of ochratoxin A in roasted coffee samples commercialized in Portugal. Food Control. 2017;73(1):1223-1228. Disponible: <https://www.infona.pl/resource/bwmeta1.element.elsevier-15b0a6db-fb04-3437-980d-89a765ec569e>
7. Geremew T, Abate D, Landschoot S, Haesaert G, Audenaert K. Occurrence of toxigenic fungi and ochratoxin A in Ethiopian coffee for local consumption. Food Control. 2016;69(1):65-73. Disponible: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0956713516301943>

8. Drunday 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. Disponible: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0956713512004872>
9. Taniwaki M, Teixeira A, Copetti M, Iamanaka B. Ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in defective coffee beans. *Food Research International*. 2014;61(1):161-166.
10. Vecchio A, Mineo V, Planeta D. Ochratoxin A in instant coffee in Italy. *Food Control*. 2012;28(2):220-223.
11. Coronel M, Marin S, Cano G, Ramos A, Sanchis V. Ochratoxin A in Spanish retail ground roasted coffee: Occurrence and assessment of the exposure in Catalonia. *Food Control*. 2011;22(3-4):414-419.
12. Batista L, Chalfoun S, Silva C, Cirillo M, Varga E, Schwan R. Ochratoxin A in coffee beans (*Coffea arabica* L.) processed by dry and wet methods. *Food Control*. 2009;20(9):784-790.
13. Quezada Araujo Claudio. Validación de un Método de Análisis para Ocratoxina A en Café Verde, Utilizando Columnas de Inmunofinidad y Cromatografía Líquida de Alta Resolución. Tesis para optar título de Bioquímico Farmacéutico. Escuela Superior Politecnica de Chimborazo. 2010.
14. Díaz A, Silva M, Dávila J. Relationship between good hygiene practices and ochratoxin A in organic coffee (*Coffea arabica* L.) from the main coffee regions in Peru. *Scientia Agropecuaria*. 2018;9(2):177-187.
15. Davis AP, Chester M, Maurin O, Fay MF. Searching for the relatives of *Coffea* (rubiaceae, ixoroideae): the circumscription and phylogeny of *Coffeae* based on plastid sequence data and morphology. *Am J Bot* 2007;94(3):313–29.
16. Kew Species Profiles. *Coffea arabica* L. Disponible: <http://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:747038-1>
17. Ukers WH. All about coffee. In: *The tea and coffee trade journal*. (New York, USA): The Tea and Coffee Trade Journal Company; 2012. 1922.
18. Silje Johannessen, Harold Wilhite. Who Really Benefits from Fairtrade? An Analysis of Value Distribution in Fairtrade Coffee. *Globalizations*. 2010;7(10):525-544.
19. Jeffrey Neilson. China and the changing economic geography of coffee value chains. *Singapore Journal of Tropical Geography*. 2019;40(3):429-451.



20. Ministerio de agricultura y riego (MINAGRI). Situación actual del café en el país. Disponible: <http://minagri.gob.pe/portal/485-feria-scaa/10775-el-cafe-peruano#:~:text=El%20Per%C3%BA%20posee%20425%2C416%20hect%C3%A1reas,67%20provincias%20y%20338%20distritos.>
21. Junta Nacional del Café, Agronoticias. La ruta del café. USDA Intermercado. Disponible: <https://static1.squarespace.com/static/5c88fb9ab2cf792069ddcb46/t/5f4e279418a2ca52662b702b/1598957517477/El+caf%C3%A9+de+Pr%C3%BA.pdf>
22. Evangelista SR, Silva CF, Miguel MGPC, Cordeiro CS, Pinheiro ACM, Duarte WF, and Schwan RF. Improvement of coffee beverage quality by using selected yeasts strains during the fermentation in dry process. *Food Research International*. 2013;61(1): 183–195.
23. Batista LR and Chalfoun SM. Quality of coffee beans. In: Schwan RF and Fleet G (eds.) *Cocoa and coffee fermentation*. Boca Raton, FL: CRC Press, Chapter 13, 2014.
24. Chalfoun SM and Rebelles PR. Historia da cafeicultura no Brasil. In: Reis PR and Cunha RL (eds.) *Café' ara'rica do plantio a colheita*, pp. 19–65. Brasília: Embrapa. 2010.
25. Mitchell HW. Cultivation and harvesting of the arabica coffee tree. In: Clarke RJ (ed.) *Coffee: agronomy*, pp. 43–90. New York: Elsevier Applied Science. 1988.
26. Toci AT, Farah A. Volatile compounds as potential defective coffee beans' markers. *Food Chemistry*. 2008;108(3):1133–1141.
27. Farah A, Monteiro M, Calado V, Trugo LC. Correlation between the chemical attributes of coffee and cup quality. *Food Chemistry*. 2006;98(2):373–380.
28. Farah A. Coffee as a speciality and functional beverage. In: Paquin P, editor. *Functional and speciality beverage technology*. 1st ed. Cambridge (UK): Woodhead Publishing in Food Science, Technology and Nutrition; 2009.
29. Trugo L. Coffee analysis. In: 2nd ed. Caballero B, Trugo LC, Finglas P, editors. *Encyclopedia of food science and nutrition*, vol. 3. Oxford (UK): Academic Press; 2003.
30. Flament I. *Coffee flavor chemistry*. (West Sussex, England): John Willey & Sons, Ltd; 2002.

31. Bee S, Brando CHJ, Brumen G, Carvalhaes N, Kolling-Speer I, Speer K, et al. The raw bean. In: Illy A, Viani R, editors. Espresso coffee, the science of quality. (Italy): Elsevier Academic Press; 2005. pp. 87–178.
32. Knopp S, Bytof G, Selmar D. Influence of processing on the content of sugars in green Arabica coffee beans. *Eur Food Res Technol* 2006;223(2):195–201.
33. Escrivá L, Font G, Manyes L. In vivo toxicity studies of fusarium mycotoxins in the last decade: A review. *Food and Chemical Toxicology*. 2015;78(1):185-206.
34. Marin S, Ramos A, Cano-Sancho G, Sanchis V. Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food and Chemical Toxicology*. 2013;60(1):218-237.
35. Payros D, Alassane-Kpembé I, Pierron A, Loiseau N, Pinton P, Oswald I. Toxicology of deoxynivalenol and its acetylated and modified forms. *Archives of Toxicology*. 2016;90(12):2931-2957.
36. Marie-Caroline Smith, Stéphanie Madec, Emmanuel Coton, and Nolwenn HymeryNatural. Co-Occurrence of Mycotoxins in Foods and Feeds and Their in vitro Combined Toxicological Effects. *Toxins (Basel)*. 2016; 8(4): 94.
37. Stoev S. Foodborne mycotoxicoses, risk assessment and underestimated hazard of masked mycotoxins and joint mycotoxin effects or interaction. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2015;39(2):794-809.
38. Tao Y, Xie S, Xu F, Liu A, Wang Y, Chen D et al. Ochratoxin A: Toxicity, oxidative stress and metabolism. *Food and Chemical Toxicology*. 2018;112(1):320-331.
39. Taniwaki MH. An update on Ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in coffee. In: Hocking AD, Pitt JI, Samson RA, Thrane U, editors. *Advances in food mycology. Advances in experimental medicine and biology*, ;vol. 571. USA: Springer; 2006. pp. 189–202.3
40. Vettorazzi A, Gonzalez-Peñas E, Trocóniz I, Arbillaga L, Corcuera L, Gil A et al. A different kinetic profile of ochratoxin A in mature male rats. *Food and Chemical Toxicology*. 2009;47(8):1921-1927.
41. Gupta RC. Toxicology of the placenta. In: Ballantine, B., Marrs, T.C., Syversen, T. (Eds.), *General and Applied Toxicology*, third ended. John Wiley and Sons, West Sussex, UK, pp. 2003-2039. 2009.
42. Minervini F, Giannoccaro A, Nicassio M, Panzarini G, Lacalandra G. First Evidence of Placental Transfer of Ochratoxin A in Horses. *Toxins*. 2013;5(1):84-92.

43. SAVA V, REUNOVA O, VELASQUEZ A, HARBISON R, SANCHEZRAMOS J. Acute neurotoxic effects of the fungal metabolite ochratoxin-A. *NeuroToxicology*. 2006;27(1):82-92.
44. Stiborová M, Arlt V, Schmeiser H. Balkan endemic nephropathy: an update on its aetiology. *Archives of Toxicology*. 2016;90(11):2595-2615. Disponible: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5065591/>
45. Levi CP, Trenk HL, Mohr HK: Study of occurrence of ochratoxin A in green coffee beans. *J Assoc Off Anal Chem* 1974, 57:866–870. Disponible: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4425430/>
46. Frisvad JC, Frank JM, Houbraken JAMP, Kuijpers AFA, Samson RA: New ochratoxin A producing species of *Aspergillus* section *Circumdati*. *Stud Mycol* 2004, 50:23-43. Disponible: [https://www.researchgate.net/publication/228775014\\_New\\_Ochratoxin\\_A\\_producin\\_g\\_species\\_of\\_AspERGILLUS\\_section\\_Circumdati](https://www.researchgate.net/publication/228775014_New_Ochratoxin_A_producin_g_species_of_AspERGILLUS_section_Circumdati)
47. Noonim P, Mahakarnchanakul W, Varga J, Frisvad JC, Samson RA: Two novel species of *Aspergillus* section *Nigri* from Thai coffee beans. *Int J Syst Evol Microbiol* 2008, 58:1727–1734. Disponible: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18599725/>
48. Bhat R, Rai RV, Karim AA. Mycotoxins in food and feed: present status and future concerns. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2010;9(1):57–81. Disponible: <https://ift.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1541-4337.2009.00094.x>
49. Milićević DR, Škrinjar M, Baltić T. Real and perceived risks for mycotoxin contamination in foods and feeds: challenges for food safety control. *Toxins* 2010;2(4):572–92. Disponible: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22069600/>
50. Amézqueta S, Schorr-Galindo S, Murillo-Arbizu M, GonzálezPeñas E, López de Cerain A, Guiraud JP. OTA-producing fungi in foodstuffs: a review. *Food Control* 2012;26(2):259–68. Disponible: <https://dadun.unav.edu/handle/10171/35620>
51. Coronel MB, Marin S, Cano G, Ramos AJ, Sanchis V. Ochratoxin A in Spanish retail ground roasted coffee: occurrence and assessment of the exposure in Catalonia. *Food Control* 2011;22(3–4):414–9. Disponible: <https://www.infona.pl/resource/bwmeta1.element.elsevier-4690b63c-dcbb-3430-83db-537118623aa3>

52. Limonciel A, Jennings P. A review of the evidence that ochratoxin A is an Nrf2 inhibitor: implications for nephrotoxicity and renal carcinogenicity. *Toxins*. 2014;6(1):371-9. Disponible: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24448208/>
53. González Salgado A. Diagnóstico y control de especies de *Aspergillus* productoras de Ocratoxina A. Universidad Complutense de Madrid; 2010. Disponible: <https://eprints.ucm.es/id/eprint/10545/1/T30977.pdf>
54. World Health Organization. WHO Technical Report Series 906. World Health Organization, Geneva, Switzerland. World Health Organization, 2002.
55. Mycotoxins in food. Fifty-sixth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives; p. 70.
56. Rosa C, Keller K, Keller L, González Pereyra M, Pereyra C, Dalcerro A et al. Mycological survey and ochratoxin A natural contamination of swine feedstuffs in Rio de Janeiro State, Brazil. *Toxicon*. 2009;53(2):283-288. Disponible: [https://www.researchgate.net/publication/23654112\\_Mycological\\_survey\\_and\\_ochratoxin\\_A\\_natural\\_contamination\\_of\\_swine\\_feedstuffs\\_in\\_Rio\\_de\\_Janeiro\\_State\\_Brazil](https://www.researchgate.net/publication/23654112_Mycological_survey_and_ochratoxin_A_natural_contamination_of_swine_feedstuffs_in_Rio_de_Janeiro_State_Brazil)
57. Skaug M, Eduard W, Størmer F. Ochratoxin A in airborne dust and fungal conidia. *Mycopathologia*. 2001;151(2):93-98. DOI: 10.1023/a:1010953401173. Disponible: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11554583/>
58. Duarte S, Pena A, Lino C. A review on ochratoxin A occurrence and effects of processing of cereal and cereal derived food products. *Food Microbiology*. 2010;27(2):187-198. DOI: 10.1016/j.fm.2009.11.016. Disponible: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20141935/>
59. Pereyra C, Cavaglieri L, Chiacchiera S, Dalcerro A. Fungi and Mycotoxins in Feed Intended for Sows at Different Reproductive Stages in Argentina. *Veterinary Medicine International*. 2010;2010(1):1-7. Disponible : <https://doi.org/10.4061/2010/569108>
60. Klarić M, Cvetnić Z, Pepeljnjak S, Kosalec I. Co-occurrence of Aflatoxins, Ochratoxin A, Fumonisin, and Zearalenone in Cereals and Feed, Determined by Competitive Direct Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Thin-Layer Chromatography. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*. 2009;60(4):427-434. Disponible: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20061243/>

61. Stoev S, Denev S, Dutton M, Njobeh P, Mosonik J, Steenkamp P et al. Complex etiology and pathology of mycotoxic nephropathy in South African pigs. *Mycotoxin Research*. 2009;26(1):31-46. DOI: 10.1007/s12550-009-0038-7. Disponible: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23605239/>
62. Bokhari F. Implications of fungal infections and mycotoxins in camel diseases in Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2010;17(1):73-81. DOI: 10.1016/j.sjbs.2009.12.011. Disponible: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3730929/>
63. Pozzo L, Cavallarin L, Nucera D, Antoniazzi S, Schiavone A. A survey of ochratoxin A contamination in feeds and sera from organic and standard swine farms in northwest Italy. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2010;90(9):1467-1472. DOI: 10.1002/jsfa.3965. Disponible: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20549798/>
64. Dalcero A, Magnoli C, Hallak C, Chiacchiera S, Palacio G, Rosa C. Detection of ochratoxin A in animal feeds and capacity to produce this mycotoxin by *Aspergillus* section *Nigri* in Argentina. *Food Additives and Contaminants*. 2002;19(11):1065-1072. DOI: 10.1080/02652030210151895. Disponible: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12456278/>
65. Smith M, Madec S, Coton E, Hymery N. Natural Co-Occurrence of Mycotoxins in Foods and Feeds and Their in vitro Combined Toxicological Effects. *Toxins*. 2016;8(4):94. DOI: 10.3390/toxins8040094, Disponible: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4848621/>
66. ELobeau M, De Saeger S, Sibanda L, Barna-Vetró I, Van Peteghem C. Development of a new clean-up tandem assay column for the detection of ochratoxin A in roasted coffee. *Anal Chim Acta* 2005;538(1-2):57-61.
67. EScott PM. Methods of analysis for ochratoxin A. In: DeVries JW, Trucksess MW, Jackson LS, editors. *Mycotoxins and food safety. Advances in experimental medicine and biology*, vol. 504. (USA): Springer; 2002. pp. 117-34. Disponible: <https://link.springer.com/book/10.1007/978-1-4615-0629-4>
68. Santos EA, Vargas EA. Immunoaffinity column clean-up and thin layer chromatography for determination of ochratoxin A in green coffee. *Food Addit Contam* 2002;19(5):447-58. DOI: 10.1080/02652030110213717, Disponible: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12028643/>

69. Levi CP. Collaborative study of a method for the determination of ochratoxin A in green coffee. *J Assoc Off Anal Chem* 1975;58(2): 258–62. Disponible: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4425430/>
70. Pittet A, Royer D. Rapid, low cost thin layer chromatographic screening method for the detection of ochratoxin a in Green coffee at a control level of 10 µg/kg. *J Agric Food Chem* 2001;50(2):243–7. DOI: 10.1021/jf010867w. Disponible: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11782189/>
71. Gilbert J, Anklam E. Validation of analytical methods for determining mycotoxins in foodstuffs. *Trends Anal Chem.* 2002;21(6–7):468–86. DOI: 10.1016/S0165-9936(02)00604-0. Disponible: [https://www.researchgate.net/publication/223534190\\_Validation\\_of\\_analytical\\_methods\\_for\\_determining\\_mycotoxins\\_in\\_foodstuffs](https://www.researchgate.net/publication/223534190_Validation_of_analytical_methods_for_determining_mycotoxins_in_foodstuffs)
72. Bandeira RDCC, Uekane TM, Cunha CPd, Geaquinto LRO, Cunha VS, Caixeiro JMR, et al. Development and validation of a method for the analysis of ochratoxin A in roasted coffee by liquid chromatography/electrospray-mass spectrometry in Tandem (LC/ESI-MS/MS). *Quím Nova* 2012;35:66–71. Disponible: <https://www.scielo.br/j/qn/a/hrhtR7SntHKkkWYHmB6yp9B/?lang=en>
73. Overview of analytical methods for ochratoxin A (Part B: techniques). In “Good Hygiene Practices along the coffee chain: a training resource for coffee producing countries, Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2006.
74. Moloche Diaz M Ocratoxina A (OTA) en Ficus carica L. “higo” durante el proceso de cosecha. Tesis 2020. Disponible: [https://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/15395/Moloche\\_d\\_m.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/15395/Moloche_d_m.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
75. Francia Reyes A. Evaluación Ocratoxina A (OTA) por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) en Capsicum annum L “Páprika” procedente del mercado mayorista de Lima- Perú. Tesis. 2021. Disponible: [https://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/17140/Francia\\_ra.pdf?sequence=3&isAllowed=y](https://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/17140/Francia_ra.pdf?sequence=3&isAllowed=y)
76. Ramos N, Castro A, Felix M, Milla F, Soria R, Alcarraz M y col. Evaluación de Ocratoxina A en Theobroma cacao L. “cacao trinitario”, por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) y análisis micotoxigénico durante el proceso de cosecha, fermentado, secado y almacenado. *Rev. Soc. Quím. Perú.* 2018; 84 (4):477-487.

- Disponible: [http://dev.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1810-634X2018000400008&lng=en&nrm=iso&tlng=es](http://dev.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1810-634X2018000400008&lng=en&nrm=iso&tlng=es)
77. López Corado, Edwin Francisco. Determinación del nivel de contaminación por Ocratoxina A en café tostado y molido, elaborado con cafés inferiores procesados en el municipio de Chimaltenango, departamento de Chimaltenango 2013. Tesis. USAC. Disponible: <http://www.repositorio.usac.edu.gt/2169/>
78. Zhang L, Dou X, Zhang C, Logrieco A, Yang M. A review of Current Methods for Analysis of Micotoxins in Herbal Medicines. *Toxins*. 2018;10(2): 1-39. DOI: 10.3390/toxins10020065. Disponible: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29393905/>
79. Tafuri A, Ferracane R, Ritiene A. Ochratoxin A in Italian marketed cocoa products. *Food Chemistry*. 2014; 88(4):487-494. DOI: 10.1016/j.foodchem.2004.01.061  
Disponible: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814604001384?via%3Dihub>
80. Arroyo N, Huertas J, Gamiz L, Garcia A. Control de micotoxinas en alimentos. Granada: Universidad de Granada; 2014 p. 1-16. Disponible: [https://www.ugr.es/~fqm302/media/pdf/BOLETIN%20GRASEQA\\_7\\_2014.pdf](https://www.ugr.es/~fqm302/media/pdf/BOLETIN%20GRASEQA_7_2014.pdf)
81. Milla F, Castro A. Evaluación del nivel contaminante de Ocratoxina A (OTA) mediante columnas de inmunoafinidad y Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia en *Coffea arabica L. "Café"*. *Rev. Soc. Quim. Perú*. 2020; 86 (2) 165-174. Disponible: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1810-634X2020000200164&script=sci\\_abstract](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1810-634X2020000200164&script=sci_abstract)
82. Moez E, Noel D, Brice S, Benjamin G, Pascaline A, Didier M. Aptamer assisted ultrafiltration cleanup with high performance liquid chromatography-fluorescence detector for the determination of OTA in green coffee. *Food Chem*. 2019; 310(1): 1-18. Doi: 10.1016/j.foodchem.2019.125851. Disponible: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31767477/>
83. Franco H, Vega A, Reyes S, De León J, y Bonilla A. Niveles de ocratoxina A y aflatoxina totales en cafés de exportación de Panamá por un método de Elisa. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 2014; vol. 64 (1). Disponible: <https://www.alanrevista.org/ediciones/2014/1/art-6/>
84. Quintana EM, Antillon F y Azofeita J. Determinación de ocratoxina A en plasma humano y en café de Costa Rica por un método de Elisa. *Arch. Latinoamericano de*

Nutrición. 2007; vol. 57 (2).

Disponible:

[http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0004-06222007000200010](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222007000200010)



## CAPÍTULO VII. ANEXOS

### Anexo 1. Instrumentos utilizados en el proceso de extracción y purificación



**Figura 31. Molino Bosch**

Fuente: Elaboración propia



**Figura 32. Agitador magnético**

Fuente: Elaboración propia



**Figura 33. Balanza analítica c/muestra de café**

Fuente: Elaboración propia



**Figura 34. Agitador magnético**

Fuente: Elaboración propia



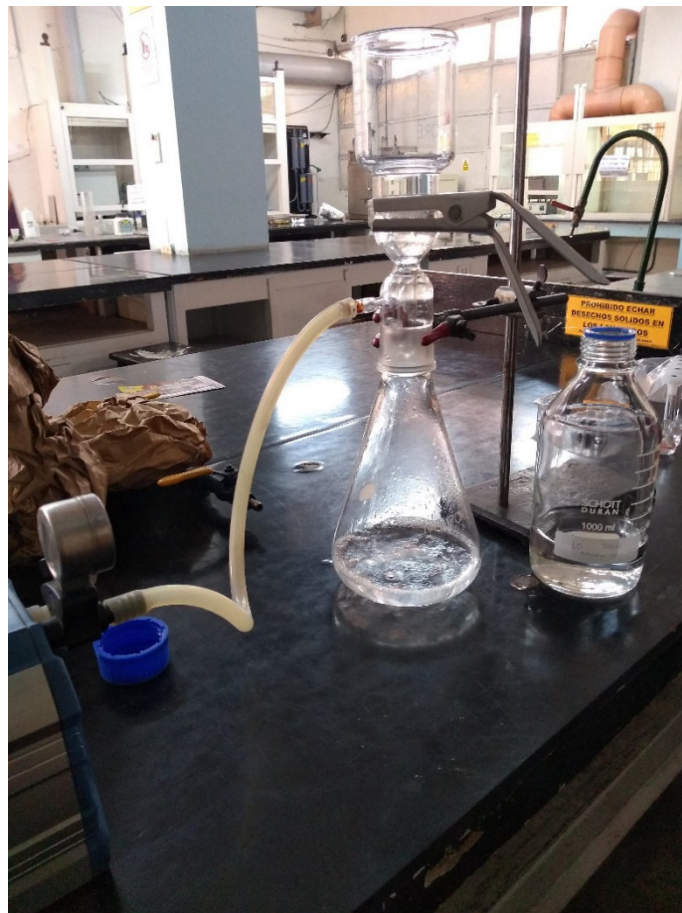
**Figura 35. Equipo de filtración al vacío**

Fuente: Elaboración propia



**Figura 36. Frascos conteniendo muestra para lectura de HPLC.**

Fuente: Elaboración propia



**Figura 37. Equipo de filtración con placa porosa de vidrio asistido por una bomba de vacío. Fuente: Elaboración propia**



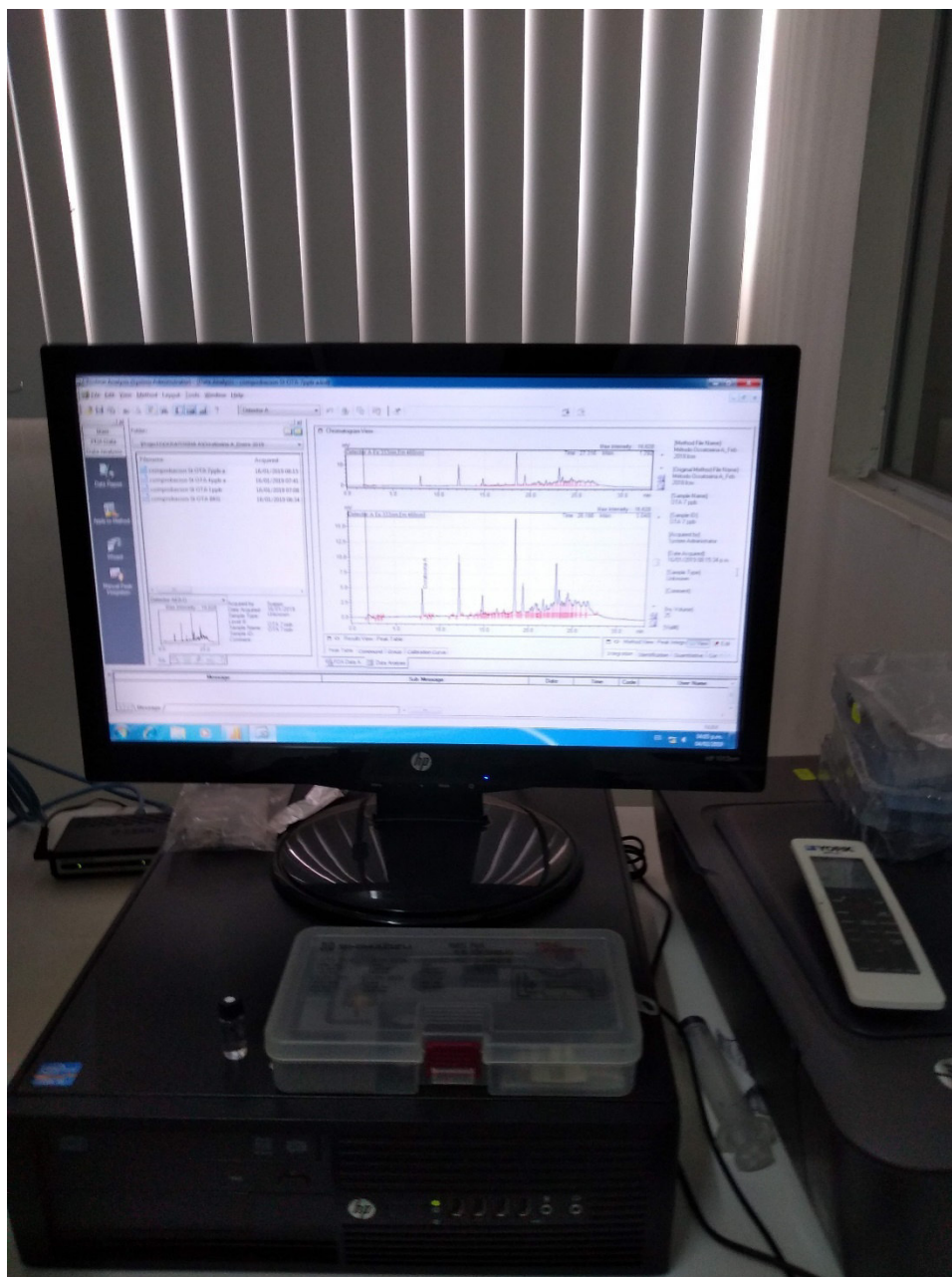
**Figura 38. Fiolas con diferentes concentraciones de estándar Ocratoxina A**

Fuente: Elaboración propia



**Figura 39. Cromatógrafo Líquido de Alto Rendimiento- HPLC Shimadzu.**

Fuente: Elaboración propia



**Figura 40. Equipo informático acoplada al HPCL.**

Fuente: Elaboración propia

## Anexo 2. Certificado de identificación de la especie vegetal *Coffea arabica* L.

JOSÉ R. CAMPOS DE LA CRUZ  
CONSULTOR BOTÁNICO  
C.B.P N° 3796  
Cel. 963 689 079  
Email: jocamde@gmail.com



### CERTIFICACIÓN DE IDENTIFICACION BOTÁNICA

JOSÉ RICARDO CAMPOS DE LA CRUZ. BIÓLOGO COLEGIADO - CBP N° 3796 – INSCRITO EN EL REGISTRO DE PROFESIONALES QUE REALIZAN CERTIFICACIÓN DE IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE ESPECÍMENES Y PRODUCTOS DE FLORA - RESOLUCIÓN DIRECTORAL N° 0311-2013- MINAGRI-DGFFS-DGEFFS.

#### CERTIFICA:

Que, el Mg. **Félix Hugo Milla Flores**, egresado de la Facultad Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, con fines de investigación científica, para desarrollar la tesis titulada: EVALUACIÓN DEL NIVEL CONTAMINANTE POR OCRATOXINA A EN *Coffea arabica* L. (CAFÉ VERDE Y TOSTADO) DEL DISTRITO PERENÉ, PROVINCIA CHANCHAMAYO, POR COLUMNAS DE INMUNOAFINIDAD Y CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA AFINIDAD (HPLC). ha solicitado la identificación y certificación botánica de muestras de café procedentes del distrito de Perené, provincia de Chanchamayo, departamento de Junín, las muestras han sido estudiadas e identificadas como: *Coffea arabica* L. Y según la base de Trópicos que sigue el Sistema moderno de clasificación de las angiospermas (APG), publicado en 1998 por el Grupo para la Filogenia de las Angiospermas, revisado por APG II (2003), APG III (2009) y APG IV (2016), este Sistema de clasificación considera a todas las plantas verdes en la Clase Equisetopsida (Chasse, MW y J.L. Reavel. 2009), comparado con el Sistema Integrado de Clasificación de las Angiospermas de Arthur Cronquist. et. al. (1981), (1988), ocupa las siguientes categorías taxonómicas.

| Categorías | Sistema APG-2016         | Sistema de Cronquist (1981), (1988) |
|------------|--------------------------|-------------------------------------|
| Reino      | Plantae                  | Plantae                             |
| División   | Angiospermae             | Magnoliophyta                       |
| Clase      | Equisetopsida            | Magnoliopsida                       |
| Subclase   | Magnoliidae              | Asteridae                           |
| Superorden | Rosanae                  | ...                                 |
| Orden      | Gentianales              | Rubiales                            |
| Familia    | Rubiaceae                | Rubiaceae                           |
| Género     | <i>Coffea</i>            | <i>Coffea</i>                       |
| Especie    | <i>Coffea arabica</i> L. | <i>Coffea arabica</i> L.            |

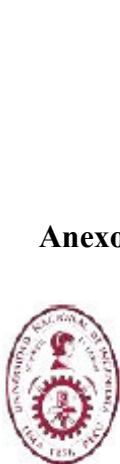
Nombre vulgar: "café"

Se expide la presente certificación para fines de investigación científica.

Lima, 18 de octubre del 2018



*Jose R. Campos De La Cruz*  
José R. Campos De La Cruz  
BIOLOGO  
C.B.P. 3796



### Anexo 3. Informe técnico de la identificación de ocratoxina A en *Coffea arabica* L.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERÍA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
LABICER (Laboratorio N° 12)  
ANÁLISIS QUÍMICO, CONSULTORÍA E INVESTIGACIÓN



#### INFORME TÉCNICO N° 0335 – 19 – LABICER

1. **DATOS DEL SOLICITANTE**
  - 1.1 NOMBRE DEL SOLICITANTE : FELIX HUGO MILLA FLORES
  - 1.2 D.N.I. : 08070390
2. **FECHA DE EMISIÓN** : 26 / 02 / 2019
3. **ANÁLISIS SOLICITADO** : ANÁLISIS DE OCRATOXINA A POR HPLC
4. **DATOS REFERENCIALES DE LA MUESTRA SEGÚN EL SOLICITANTE**
  - 4.1 IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA : 06 EXTRACTOS PROVENIENTES DEL CAFÉ VERDE Y TOSTADO (PROCEDENCIA: CHANCHAMAYO).

| N° | MUESTRA |
|----|---------|
| 1  | CV      |
| 2  | V1      |
| 3  | V2      |
| 4  | CT      |
| 5  | T1      |
| 6  | T2      |

5. **DATOS DEL ESTÁNDAR DE OCRATOXINA A**
  - 5.1 NOMBRE DEL PRODUCTO : OCRATOXINA A
  - 5.2 NÚMERO DE LOTE : D00171728
  - 5.3 MARCA : MERCK MILLIPORE
  - 5.4 PUREZA : 99.18%
6. **LUGAR DE RECEPCIÓN DE LA MUESTRA** : LABICER - FACULTAD DE CIENCIAS
7. **CONDICIONES AMBIENTALES** : Temperatura: 20°C; Humedad relativa: 60 %
8. **MÉTODO UTILIZADO** : CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTO RENDIMIENTO.
9. **DOCUMENTO DE REFERENCIA** : Ochrotoxin A in Italian marketed cocoa products. A. Tafuri et al. / Food Chemistry 88 (2004) 487–494.
10. **EQUIPOS UTILIZADOS**

CROMATÓGRAFO LÍQUIDO DE ALTO RENDIMIENTO-HPLC. SHIMADZU.

  - Desgasificador: DGU-20A5R
  - Bomba: LC-30AD
  - Automuestreador: SIL-30AC
  - Homo de Columna: CTO-20AC
  - Detector de fluorescencia: RF-20AxS
  - Control de Sistema: CBM-20A

BALANZA ANALÍTICA DIGITAL. SARTORIUS, CPA225D.  
EQUIPO ULTRASONIDO, WISD Laboratory Instruments.  
EQUIPO DE AGUA ULTRA PURA. ELGA PURELAB CLASSIC UV.
11. **REACTIVOS**
  - Estándar OCRATOXINA A, 99.18%, adquirido de MERCK PERUANA.
  - Acetonitrilo, gradient 240nm/far UV HPLC grade, adquirido de MERCK PERUANA.
  - Ácido acético glacial P.A., adquirido de MERCK PERUANA.
  - Agua ultrapura, purificada en equipo ELGA PURELAB CLASSIC UV.



## 12. SOLUCIONES ESTÁNDAR

Se recibieron las siguientes soluciones estándar de trabajo de Ocratoxina A: 0.1; 1; 5; 10 y 15 µg/L preparadas en Metanol: Ac. Acético: Agua (49:1:50). Se filtraron usando filtros de jeringa de 0.22µm y se trasvasaron a los viales. Estos se colocaron inmediatamente en la bandeja de viales del HPLC, acondicionada a 15°C, para su análisis inmediato.

## 13. MUESTRAS

Se recibieron 06 extractos provenientes del café verde y tostado. Las muestras se filtraron usando filtros de jeringa de 0.22µm y se trasvasaron a los viales. Estos se colocaron inmediatamente en la bandeja de viales del HPLC, acondicionada a 15°C, para su análisis inmediato.

## 14. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

|                                |  |
|--------------------------------|--|
| Columna                        | RP C18 de 250 mm x 4.6 mm ID x 5 µm Particula (Restek)   |
| Horno de Columna               | 25°C   |
| Detector                       | Detector de Fluorescencia  |
| Longitud de onda de excitación | 333nm  |
| Longitud de onda de emisión    | 460nm  |
| Bomba                          | Cuaternaria  |
| Flujo                          | 1 mL/min   |
| Fase móvil                     | A: CH <sub>3</sub> CN (1% ác. Acético)<br>B: H <sub>2</sub> O (1% ác. Acético)                                   |
| Elución                        | Gradiente<br>0 a 20min: A:B, 50:50 a A:B, 100:0<br>20 a 23min: A:B, 100:0<br>23 a 33min: A:B, 100:0 a A:B, 50:50 |
| Volumen de Inyección           | 25 µL  |
| Tiempo de corrida              | 33min  |
| Integración                    | Area vs Concentración  |

## 15. RESULTADOS

| Muestra | Concentración HPLC, µg/L <sup>(1)</sup> | R.S.D., % <sup>(2)</sup> |
|---------|---|--------------------------|
| CV      | 1.249                                   | 0.465                    |
| V1      | 0.019                                   | 0.635                    |
| V2      | < 0.019 <sup>(3)</sup>                  | -                        |
| CT      | 0.635                                   | 1.760                    |
| T1      | 0.072                                   | 1.498                    |
| T2      | 0.148                                   | 2.353                    |

<sup>(1)</sup> Ver cromatogramas en Anexo.

<sup>(2)</sup> R.S.D.: Desviación estándar relativa.

<sup>(3)</sup> L.D.D.(Límite de detección) = 0.019µg/L.

## 16. VALIDEZ DEL INFORME TÉCNICO

El Informe técnico es válido solo para la muestra y las condiciones indicadas en los ítems del uno (1) al cuatro (4) del presente informe técnico.

Bach. Nadia Rodríguez  
Analista  
LABICER – UNI

M.Sc. Otilia Acha de la Cruz  
Jefa de Laboratorio  
Responsable de Análisis  
CQP 202

El Laboratorio no se responsabiliza del muestreo ni de la procedencia de la muestra.