

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA



DETERMINACION DE OCRATOXINA A (OTA) EN CAFE INSTANTANEO POR
ENSAYO INMUNOADSORBENTE LIGADO A ENZIMAS (ELISA)

TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR:
REBECA ESTER GONZALEZ VILLALOBOS

PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIADA EN QUIMICA Y FARMACIA

SEPTIEMBRE 2019

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMERICA

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

MAESTRO ROGER ARMANDO ARIAS ALVARADO

SECRETARIO GENERAL

MAESTRO CRISTOBAL HERNAN RIOS BENITEZ

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

DECANO

LIC. SALVADOR CASTILLO AREVALO

SECRETARIO

MAE. ROBERTO EDUARDO GARCIA ERAZO

DIRECCION DE PROCESOS DE GRADUACION

DIRECTORA GENERAL

MSc. Cecilia Haydeé Gallardo de Velásquez

TRIBUNAL CALIFICADOR

**ASESORA DE AREA EN APROVECHAMIENTO DE RECURSOS
NATURALES:**

Licda. Rina Antonieta Toledo Mendoza.

ASESORA DE AREA EN INDUSTRIA DE ALIMENTOS Y TOXICOLOGÍA:

MAE. Nancy Zuleyma González Sosa

DOCENTE ASESOR

Lic. Juan Agustín Cuadra Soto

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primer lugar a Dios por amarme, por darme su ayuda y sabiduría en todo mi camino, a mis padres y mi hermanita que siempre me han apoyado incondicionalmente y me han brindado su cariño y amor, así como a mis abuelos, tíos y primos por sus oraciones, amor y sus palabras de aliento.

A mis docentes quienes han compartido conmigo y me han enseñado no sólo de su conocimiento, sino que también de sus valores, de su forma justa y amable de tratar a los demás y de su humildad. A mis docentes asesores, Lic. Cuadra que ha dedicado de su tiempo para ayudarme, aconsejarme, darme ánimos, y enseñarme, a MSc. Cecy Gallardo, Licda. Rina Toledo y MAE. Nancy que me ayudaron con ideas y consejos para mejorar el trabajo, colaborando así con la dirección de esta investigación.

A mis compañeros de trabajo y amigos porque siempre me han apoyado y dado ánimos para no rendirme.

A maestra María Elisa que más que una maestra es como una madre para sus estudiantes, al ing. Magaña por todo su apoyo, por compartir sus conocimientos y por ser calidad de persona, a Lic. Mayte porque sin ser su obligación siempre me escuchó con mucha paciencia, me motivó y aconsejó, su ayuda fue muy importante para mí, a George porque he aprendido mucho de él y por siempre animarme, a Lic. Reyes por ser una excelente persona, por su paciencia y por todas sus enseñanzas, a Anyoeth por ser una gran amiga y compañera, a Kelly por ser mi amiga y cómplice, a Nacho por su amistad y por todo lo que me ha enseñado de computación.

A todas las personas que Dios ha puesto en mi camino y que estoy segura que han sido parte de sus bendiciones para mí.

DEDICATORIAS

Dedicado primeramente a mi Dios, porque todo lo que puedo alcanzar, es por su gracia y misericordia infinita, Él es quien siempre me han sostenido y me han dado las fuerzas para seguir adelante, ha sido guía, luz, y alegría en mi camino, Él es mi preciosa compañía a cada momento de mi vida y mi único amigo fiel, es el Rey al lado de quien siempre quiero estar y a quien por siempre voy a agradecer y amar.

Dedicado a uno de los más grandes regalos que Dios me ha dado, mi familia que amo mucho; es mi familia que siempre me ha acompañado y me han apoyado en gran manera, que me enseñaron a vivir y me han cuidado toda la vida, a mi padre que siempre ha sido mi gran amigo, mi confidente y mi consejero, quien a pesar de últimamente estar lejos físicamente de mí siempre he sentido cerca, a mi madre que siempre ha creído en mí, que ha sido mi maestra en la vida, mi gran ayuda y mi amiga más linda, a mi hermanita que Dios un día envió a mi vida para ser mi más tierna compañía, mi cariño y mi dulce amiga, toda mi vida les voy a agradecer su apoyo incondicional, les doy muchas gracias por ayudarme y amarme como nadie más lo haría, sin ellos nunca hubiera podido llegar hasta aquí, son mi motivación, mi amor y mi vida.

INDICE

	Pág.
RESUMEN	
CAPÍTULO I	
1.0 INTRODUCCIÓN	xvii
CAPÍTULO II	
2.0 OBJETIVOS	20
2.1. Objetivo general	20
2.2. Objetivos específicos	20
CAPÍTULO III	
3.0 MARCO TEÓRICO	22
3.1. Generalidades del café	22
3.1.1. Planta de café (cafeto)	22
3.1.2. <i>Coffea arabica</i> (café arábica)	24
3.1.3. <i>Coffea canephora</i> (Café robusta)	25
3.2. Café instantáneo	26
3.2.1. Beneficiado del café	27
3.2.2. Beneficiado seco	28
3.2.3. Beneficiado húmedo	29
3.2.4. Producción de café instantáneo	32
3.2.5. Secado por atomización	35
3.2.6. Secado por liofilización	36

3.3. Consumo de café instantáneo en El Salvador	40
3.4. Generalidades de las micotoxinas	40
3.4.1. Factores involucrados en la producción de micotoxinas	41
3.4.2. Micotoxicosis	42
3.5. Ocratoxinas	43
3.6. Ocratoxina A	44
3.6.1. Propiedades de la OTA	46
3.6.2. Toxicidad de OTA	47
3.6.2.1. Nefropatía Endémica de los Balcanes	48
3.6.2.2. Carcinogenicidad de la OTA	49
3.7. Contaminación por OTA en el café	50
3.7.1. Contaminación antes de la cosecha	51
3.7.2. Contaminación durante la cosecha	52
3.7.3. Contaminación durante el procesamiento	53
3.8. Reglamentación con respecto a OTA	55
3.9. Inmunoensayos	56
3.9.1. Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)	58
3.9.1.1. Clasificación de las técnicas ELISA	59
3.9.2. Columna de inmunoafinidad (IAC)	60

CAPÍTULO IV

4.0 DISEÑO METODOLÓGICO	63
4.1. Tipo de estudio	63
4.1.1. De campo	63

4.1.2. Experimental:	63
4.1.3. Exploratorio:	63
4.1.4. Prospectivo:	63
4.2. Investigación bibliográfica	63
4.3. Investigación de campo	64
4.3.1. Universo	64
4.3.2. Muestra	64
4.4. Parte experimental	64
4.4.1. Selección de las marcas	64
4.4.2. Material, equipo, reactivos y preparación de reactivos	64
4.4.3. Elaboración de curva de calibración	65
4.4.4. Determinación de OTA en café instantáneo	65
4.4.4.1. Extracción y purificación de OTA	65
4.4.4.2. Cuantificación de OTA por el método ELISA	66
4.4.4.3. Análisis de datos	68

CAPÍTULO V

5.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	71
5.1. Selección de las marcas	71
5.2. Determinación de OTA en café instantáneo	73
5.3. Análisis estadístico de datos	79
5.4. Recuperación de Ocratoxina A	81
5.5. Comparación de resultados con la normativa europea	82

CAPÍTULO VI

6.0 CONCLUSIONES	84
------------------	----

CAPÍTULO VII

7.0 RECOMENDACIONES	86
---------------------	----

BIBLIOGRAFIA

GLOSARIO

ANEXOS

INDICE DE ANEXOS

1. MAPA DEL DISTRITO 2 DE SAN SALVADOR
2. MATERIALES Y EQUIPO
3. PREPARACIÓN DE REACTIVOS
4. ESQUEMAS DEL PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS DE OTA EN CAFÉ INSTANTANEO
5. FOTOGRAFÍAS DEL ANÁLISIS DE OCRATOXINA A EN CAFÉ INSTANTÁNEO
6. REGLAMENTO (CE) N° 123/2005 DE LA COMISIÓN DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS
7. CLASIFICACIÓN DE LOS CARCINÓGENOS

INDICE DE FIGURAS

Figura N°

1.	Capas del fruto de café.	23
2.	Diagrama de flujo de las etapas del beneficiado del café.	31
3.	Diagrama de flujo de etapas de la producción de café instantáneo.	39
4.	Estructuras de las cinco principales Ocratoxinas.	43
5.	Granos de café y frutos de la planta de café robusta	51
6.	Principio de funcionamiento de IAC para purificación de analito.	61
7.	Curva de calibración de los estándares de Ocratoxina A.	74
8.	La OTA y el conjugado compiten por los sitios de unión en los	76
9.	Lavados para eliminar interferentes y adición de sustrato	76
10.	Determinación de OTA a través de la reacción colorimétrica.	77

INDICE DE TABLAS

Tabla N°

1.	Taxonomía de las principales especies del género <i>Coffea</i> .	24
2.	Especies de <i>Aspergillus</i> productoras de OTA en alimentos.	45
3.	Especies de <i>Penicillium</i> productoras de OTA en alimentos.	46
4.	Propiedades físicoquímicas de OTA.	47
5.	Resumen de la reglamentación a nivel mundial respecto a OTA.	56
6.	Marcas de café instantáneo encontradas en los supermercados.	71
7.	Marcas seleccionadas para el estudio y su país de procedencia.	72
8.	Elaboración de la curva de calibración.	73
9.	Resultados del contenido de Ocratoxina A en café instantáneo	78
10.	Recuperación de OTA en muestras contaminadas con OTA.	81

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

- a_w : Actividad del agua
- CSC: Consejo Salvadoreño del Café.
- EFSA: European Food Safety Authority (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria).
- EIA: Inmunoanálisis enzimático.
- EMIT: Enzyme multiplied immunoassay technique (Técnica de inmunoensayo multiplicado por enzimas).
- ELICT: Enzyme-linked immunocytochemical technique (Técnica inmunocitoquímica ligada a enzimas).
- ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay (Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas).
- FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura).
- g: Gramo
- IAC: Immunoaffinity column (Columna de inmunoafinidad).
- IARC: International Agency for Research on Cancer (Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer).
- IDT: Ingesta Diaria Tolerable.
- IDTP: Ingestión Diaria Tolerable Provisional.
- ISTP: Ingesta Semanal Tolerable Provisional (o en inglés PTWI)
- JECFA: Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios.
- Kg: Kilogramo
- MAG: Ministerio de Agricultura y Ganadería.
- ng: Nanogramo.
- NSO: Norma Salvadoreña Obligatoria.
- OMS: Organización Mundial de la Salud.

OTA: Ocratoxina A.
OTB: Ocratoxina B.
OTC: Ocratoxina C.
PBS: Phosphate Buffered Saline (Buffer Fosfato Salino).
ppb: Partes por billón ($\mu\text{g} \times \text{kg}^{-1}$ ó $\text{ng} \times \text{g}^{-1}$)
SCF: Scientific Committee on Food (Comité Científico de la Alimentación Humana).
UE: Unión Europea.
 μL : Microlitros.

RESUMEN

La ocratoxina A es un metabolito secundario producido por hongos del género *Aspergillus* y *Penicillium*, es decir, se trata de una micotoxina. Los estudios revelan que la ocratoxina A puede ser nefrotóxica, hepatotóxica, teratogénica, inmunosupresora y carcinogénica en animales, por tal razón ha sido clasificada por la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer como posible carcinógeno humano en el grupo 2B.

La Ocratoxina A puede estar presente en el café como un contaminante y es conocido que su concentración en café instantáneo tiende a tener valores mayores, comparado con muestras de café tostado y molido, por lo que a fin de analizar su incidencia en muestras de café instantáneo se realizó su determinación por medio del ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas de tipo competitivo directo.

En la investigación se seleccionaron las seis marcas de café instantáneo puro que se encontraron presentes en todos los supermercados del distrito 2, zona 2, de San Salvador siendo estas Listo, Nescafé, Musún, Coscafé, Juan Valdez y Colcafé, se recolectaron 3 frascos por marca, es decir, 18 muestras de café instantáneo, llevándose a cabo dos determinaciones por cada muestra, totalizando así 36 análisis. Los análisis fueron realizados en el lector de microplacas Biotek Elx800 del laboratorio de análisis bromatológico de la Universidad de El Salvador.

En los ensayos ninguna de las muestras analizadas superó los límites establecidos para el contenido de Ocratoxina A en café instantáneo el cual es de 10 ppb, debido a que los resultados obtenidos reflejaron concentraciones menores a 1 ppb (valor que corresponde al límite de detección del método utilizado), no obstante para establecer un perfil respecto a la calidad e inocuidad del café instantáneo consumido en el país, debería de considerarse efectuar análisis de otros contaminantes que podrían estar presentes en esta matriz alimentaria.

CAPÍTULO I
INTRODUCCIÓN

1.0 INTRODUCCIÓN

Alrededor del 25% de todos los cultivos a nivel mundial se encuentran contaminados con mohos y estos pueden, bajo ciertas condiciones, producir micotoxinas, las cuales son metabolitos secundarios tóxicos que se encuentran como contaminantes naturales en los alimentos.

El café al igual que muchos cultivos puede presentar riesgos de contaminantes para la salud de los consumidores. Estos contaminantes se incorporan al café a lo largo de toda la cadena de producción. Las cosechas de café al ser invadidas por micotoxinas representan un riesgo para la salud del consumidor, así como pérdidas económicas para el sector productivo y el comercio internacional.

Se conoce que uno de los contaminantes de alta incidencia en el café es la Ocratoxina A (OTA) siendo un metabolito secundario producido por hongos de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*. La Ocratoxina A (OTA) es una de las micotoxinas de mayor toxicidad en mamíferos, según las investigaciones es nefrotóxica, inmunosupresora, teratogénica, hepatotóxica y carcinogénica en animales; debido a que no existen estudios que comprueben su carcinogenicidad en humanos, la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC) ha clasificado la Ocratoxina A (OTA) como posible agente carcinogénico en humanos (grupo 2B).

Una fuente de Ocratoxina A (OTA) para el ser humano es el café, el cual es la bebida estimulante no alcohólica más consumida. El Salvador no es la excepción ante esta preferencia por las bebidas de café, según estudios realizados por el Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG) y el Consejo Salvadoreño del Café (CSC) en 2008, un 81% de los salvadoreños consume café y de ellos un 60% manifiesta optar por el café instantáneo.

Teniendo en cuenta que de las micotoxinas que han sido detectadas en el café, la Ocratoxina A (OTA) es la de mayor preocupación; se realizó un estudio evaluando muestras de café instantáneo comercializadas en todos los supermercados del distrito 2 zona 2 del municipio de San Salvador, siendo el propósito de esta investigación determinar el riesgo que existe para la población salvadoreña de ingerir Ocratoxina A (OTA) en cantidades que puedan afectar su salud (al consumir café instantáneo), lo anterior fue realizado estudiando muestras de seis diferentes marcas de café instantáneo puro a través de un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) de tipo competitivo directo. Luego de seleccionar las muestras, se realizó durante el mes de febrero de 2019, en el laboratorio de Análisis Bromatológico de la Universidad de El Salvador, la extracción de la Ocratoxina A de las muestras, su purificación por medio de columnas de inmunoafinidad (IAC) y finalmente la cuantificación.

En las muestras estudiadas los resultados fueron menores al límite de detección del método utilizado, el cual era de 1 ppb, en consecuencia estas cumplen con el reglamento (CE) No 123/2005 de la comisión de las comunidades europeas, el cual especifica que el café instantáneo no puede contener más de 10 ppb de Ocratoxina A (OTA), teniéndose por tanto, para las muestras consideradas en la investigación, valores más de 10 veces menores que límite establecido por la Unión Europea.

CAPÍTULO II
OBJETIVOS

2.0 OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Determinar Ocratoxina A (OTA) en café instantáneo por Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas (ELISA).

2.2. Objetivos específicos

- 2.2.1. Seleccionar las marcas de café instantáneo, comercializadas en los supermercados del distrito 2 zona 2 de San Salvador.
- 2.2.2. Cuantificar Ocratoxina A (OTA) en las muestras recolectadas, por medio del método ELISA competitivo directo.
- 2.2.3. Analizar los datos obtenidos en la determinación de Ocratoxina A (OTA) mediante una prueba de hipótesis con la distribución t de student.
- 2.2.4. Comparar los resultados obtenidos con el reglamento (CE) N°123/2005 de la Comisión de las Comunidades Europeas para Ocratoxina A (OTA) en café instantáneo.

CAPÍTULO III
MARCO TEÓRICO

3.0 MARCO TEÓRICO

3.1. Generalidades del café

El café es una bebida preparada por infusión de semillas de cafetos adecuadamente procesadas, principalmente *Coffea arabica* y *Coffea canephora* (o robusta). En todo el mundo, el café se ha convertido en la segunda bebida más consumida, lo cual puede ser explicado por la gran variedad de compuestos químicos que contiene, los que le proporcionan al café, una mezcla única de propiedades sensoriales y efectos fisiológicos. ⁽²⁴⁾

El café se comercializa de diferentes maneras, está disponible como granos tostados, polvo soluble o "instantáneo" y más recientemente como bebidas preenvasadas.

El café instantáneo está también disponible en mezclas con sustitutos del café, como diferentes productos con plantas tostadas, como raíces de achicoria o cereales, que se asemejan a las características de la bebida del café, a un precio menor, con contenido reducido de cafeína.

Las bebidas solubles tienen, la ventaja común de su uso práctico y limpio (se disuelven instantáneamente en agua caliente) en comparación a otras formas de hacer café. ⁽⁹⁾

3.1.1. Planta de café (cafeto)

Los granos de café que se utilizan para elaborar la bebida del café son en realidad las semillas de una planta conocida como cafeto (o simplemente planta de café).⁽²⁰⁾ El cafeto es un arbusto que puede llegar a vivir unos 70 años, presenta

un tronco recto, con hojas perennes, lanceoladas, verdes y brillantes en la parte superior, que crecen en pares a cada lado del tallo, florea a partir del tercer año, pero su producción es rentable hasta el quinto año. ⁽⁴⁰⁾

El fruto del café, también llamado baya o cereza, (ver figura N° 1) consiste en un suave pericarpio, generalmente verde, que al madurar se vuelve rojo-violeta o rojo oscuro (incluso amarillo o naranja en genotipos particulares). El pericarpio cubre la pulpa suave, amarillenta, fibrosa y dulce que es el mesocarpio externo. Luego se encuentra una capa traslúcida de mucílago incoloro, delgado, viscoso y altamente hidratado, conocida como capa de pectina. Seguidamente está el endocarpio que es delgado y de color amarillento, también llamado pergamino. Finalmente, una piel plateada (perispermo) cubre cada hemisferio del grano de café (endospermo). El café se comercializa internacionalmente como café verde (el grano de café cubierto o no con la piel plateada), que se produce por beneficiado húmedo o seco. ⁽¹⁹⁾

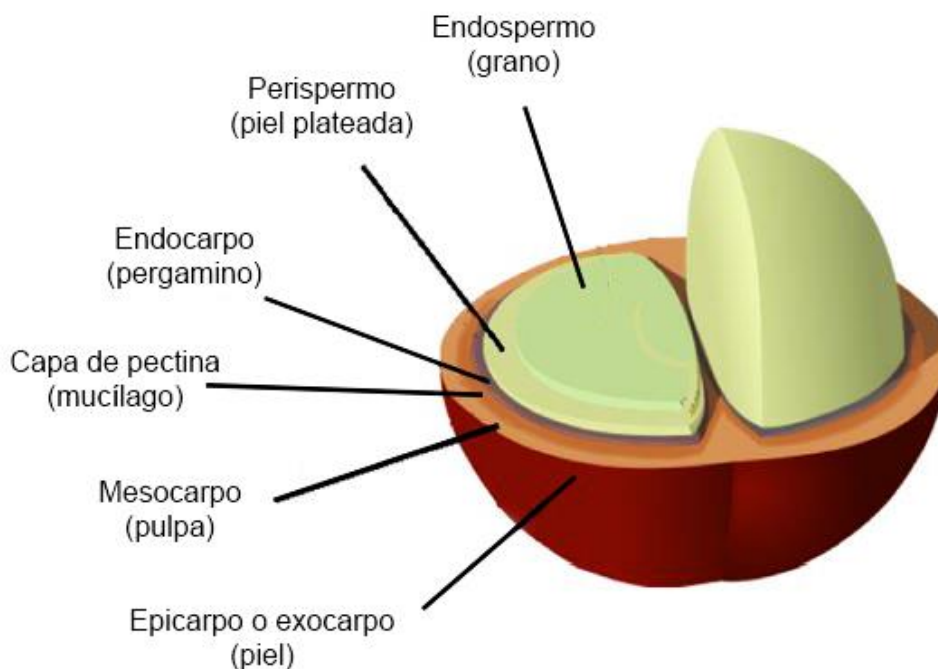


Figura N° 1 Capas del fruto de café. ⁽²⁰⁾

La clasificación botánica del café y algunas de las principales especies del género *Coffea* se presentan en la tabla N° 1.

Tabla N° 1. Taxonomía de las principales especies del género *Coffea*. (20)

+Taxonomía	
Reino	<i>Plantae</i>
Subreino	<i>Angiospermae</i>
Clase	<i>Dicotyledoneae</i>
Subclase	<i>Sympetalae</i> o <i>Metachlamydeae</i>
Orden	<i>Rubiales</i>
Familia	<i>Rubiaceae</i>
Género	<i>Coffea</i>
Subgénero	<i>Eucoffea</i>
Especies	<i>arabica; canephora; liberica; eugenioides; congensis; salvatrix; racemosa; anguebariae; pseudozanguebariae; mongensis; humilis; kapakata; betrandi; perrieri; pervilleana</i>

El Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) de los Estados Unidos describió más de 90 especies dentro del género *Coffea*, siendo algunas de las más estudiadas presentadas en la tabla N°1. De estas especies, solo dos tienen mayor importancia comercial a nivel mundial: *Coffea arabica* y *Coffea canephora*. (20)

3.1.2. *Coffea arabica* (café arábica)

El café arábica fue descrito por primera vez por Linnaeus en 1753. Las variedades más conocidas son “Typica” y “Bourbon”, pero a partir de ellas se han desarrollado muchas variedades diferentes.

La planta de café arábica es un arbusto grande con hojas ovaladas de color verde oscuro. Los frutos son ovalados y maduran en 7-9 meses; generalmente

contienen dos semillas planas (los granos de café): cuando se desarrolla solo un grano, se conoce como arándano.

En comparación con robusta, el café arábica es generalmente menos vigoroso y productivo con un costo de producción más alto y produce granos que contienen aproximadamente la mitad de la cantidad de cafeína.

El café arábica produce una bebida con un sabor dulce típico aromático y se suele consumir solo o mezclado con *Coffea canephora*. Las variedades “Catuai” y “Mundo Novo” de *Coffea arabica* son las más cultivadas tradicionalmente, pero muchos otros también son económicamente importantes en todo el mundo.

El café arábico es a menudo susceptible a ser atacado por plagas y enfermedades, la resistencia es por lo tanto un objetivo principal de los programas de cultivo de plantas. El *Coffea arabica* se cultiva en toda América Latina, en África Central y Oriental, en India y, en cierta medida, en Indonesia.⁽⁵⁾ y representa alrededor del 60% de la producción mundial de café. ⁽²⁰⁾

El café producido por *Coffea arábica* es considerado muchas veces superior por sus propiedades sensoriales por lo que alcanza precios más altos en el mercado internacional. ⁽¹⁹⁾

3.1.3. *Coffea canephora* (Café robusta)

Es un arbusto robusto o árbol pequeño que puede alcanzar hasta 10 m de altura, pero con un sistema de raíces poco profundo. Los frutos son redondos y tardan hasta 11 meses en madurar; las semillas son de forma ovalada y más pequeñas que las de *Coffea arabica*.⁽⁵⁾ Esta planta crece en elevaciones bajas y climas más cálidos y tienen una mayor resistencia a enfermedades, una calidad de taza

inferior y menor valor de mercado en comparación con el café arábico. Sus semillas representan menos del 40% de la producción mundial de café. ⁽²⁰⁾

El café robusta se cosecha en África occidental y central, en todo el sudeste asiático y, en cierta medida, en Brasil, donde se lo conoce como conilón. El café robusta constituye un cultivo comercial relativamente nuevo, por lo que existe un gran potencial para la mejora genética. “*robusta*” es la variedad más cultivada de *Coffea canephora* en el mundo, por lo que el nombre de esta variedad se utiliza para designar el nombre común de la especie.

Coffea canephora produce una bebida que lo califica para ser utilizado para la producción de café instantáneo y para ser mezclado con café arábica, ya que, aunque tienen diferentes características sensoriales, el café robusta producido y procesado adecuadamente puede ser una fuente de características deseables cuando se mezclan las dos especies. ⁽⁵⁾

3.2. Café instantáneo

El café instantáneo, también conocido como café soluble o polvo de café, es una forma de bebida popular que se disfruta por su aroma, sabor único, por los efectos estimulantes de la cafeína como también por su conveniencia y larga vida útil. ⁽³⁰⁾

El café instantáneo es el polvo o granulado que queda luego de que al extracto de café se le ha retirado el agua. A diferencia del café tostado, cuando es empacado en un recipiente hermético, es estable y puede mantener su calidad durante muchos meses e incluso años pues es menos vulnerable a procesos de oxidación. Se prepara muy fácilmente con sólo adicionarle agua o leche sin necesidad de máquinas con filtros o alta presión. ⁽²¹⁾ El café instantáneo también

se puede definir como el producto deshidratado constituido por los sólidos solubles en agua del café tostado y molido, y que al ser reconstituido con agua produce en forma rápida una bebida de café. ⁽¹⁶⁾

Los procesos de producción del café instantáneo comienzan a partir del grano verde el cual se obtiene tras su procesamiento en un beneficio.

3.2.1. Beneficiado del café

La composición y muchas características de los granos, las cuales determinan las propiedades y la calidad del café preparado, no solo dependen de la especie, condiciones de cultivo de las plantas (sombra, poda, fertilización, suelo, altitud, exposición solar, precipitaciones y temperatura), grado de madurez en el método de cosecha y la cosecha en sí, sino también del beneficiado (seco o húmedo), siendo así que este último influye en las propiedades sensoriales que tendrá la bebida ya preparada de café.

En general, se cree que el café procesado en húmedo tiene un aroma de calidad superior y en consecuencia tiene mayor aceptación. ⁽¹⁹⁾

La NSO 67.31.01:03 define el beneficiado del café como el “proceso que consiste en eliminar del fruto de café todas las partes que cubren el grano o semilla. Dicho proceso se puede realizar mediante vía húmeda o vía seca”. ⁽¹⁵⁾

Finalizado el beneficiado del café se obtiene el café verde también conocido como café oro, café crudo o almendra. ⁽¹⁵⁾ este debe de distinguirse del café inmaduro el cual es definido por la NSO 67.31.01:03 como “el fruto de café que no ha alcanzado a madurar y que tiene color verde y cuando se corta en dicho estado es procesado por medio del beneficiado seco”.

Los frutos procesados por el método seco son conocidos como café cerezo, mientras que se conoce como café pergamino al café verde procesado por el método húmedo. ⁽⁵⁴⁾ La producción de granos de café verde permite elaborar varios subproductos, dependiendo del método de procesamiento que se lleve a cabo. ⁽¹⁹⁾

3.2.2. Beneficiado seco

En el beneficiado seco, los frutos de café cosechados se secan al sol y luego se descascaran mecánicamente, siendo las cáscaras secas (piel, pulpa, mucílago y pergamino) eliminadas, junto con tanto como sea posible, de la piel plateada. ⁽¹⁹⁾

El método seco conocido como método natural es el método más antiguo y simple y requiere poca maquinaria en el cual se seca la cereza entera, es ecológico porque produce bajas cantidades de desechos sólidos y líquidos, sin producción de efluentes con alto contenido de materia orgánica en el que se produce una bebida con cuerpo y menos ácida que el café producido por el beneficiado húmedo.

En primer lugar, las cerezas cosechadas generalmente se clasifican y limpian, para separar las cerezas inmaduras, demasiado maduras y dañadas, y para eliminar la suciedad, la tierra, las ramas y las hojas. Las cerezas de café se extienden en patios bajo el sol. Cuando las cerezas se secan, se rastrillan o se giran a mano lo que permite un secado homogéneo. Pueden pasar hasta 4 semanas antes de que las cerezas se sequen hasta el contenido de humedad máximo del 12.5%, dependiendo de las condiciones climáticas. En ocasiones puede usarse secado a máquina después de un presecado al sol.

Las cerezas secas se almacenan a granel en silos especiales hasta que se envían al molino donde tiene lugar el descascarillado en el que todas las capas externas de la cereza seca son eliminadas (en la descascarilladora), la clasificación y el ensacado. ⁽⁵⁾

La operación de secado es un punto crítico del proceso, ya que afecta la calidad final del café verde. El café que ha sido secado en exceso se vuelve frágil y produce demasiados granos rotos durante el descascarillado (los granos rotos se consideran defectuosos) mientras que el café que no se ha secado lo suficiente será demasiado húmedo y propenso a un rápido deterioro causado por el ataque de hongos y bacterias durante el tiempo de almacenamiento. ⁽⁵⁾

3.2.3. Beneficiado húmedo

El método húmedo requiere el uso de equipos específicos y cantidades sustanciales de agua. Cuando se hace correctamente, asegura que las cualidades intrínsecas de los granos de café se conservan mejor, produciendo un café verde, que es homogéneo y tiene pocos granos defectuosos. Por esta razón, el café producido por este método generalmente se considera de mejor calidad y alcanza precios más altos en el mercado. Al igual que en el método seco, la clasificación preliminar y la limpieza de las cerezas generalmente son necesarias. ⁽⁵⁾

En el proceso húmedo, la flotación de bayas dañadas e inmaduras en el agua permite su separación de las maduras que se encuentran en el fondo. La mayor parte de la piel, y la pulpa de los frutos hundidos se eliminan mecánicamente presionando el fruto en el agua, utilizando un despulpador. ⁽¹⁹⁾ La eliminación de

la cereza es la diferencia clave entre los métodos seco y húmedo, ya que, en este último, la pulpa del fruto se separa de los granos antes de la etapa de secado. ⁽⁵⁾ Luego deben eliminarse los restos de pulpa y la capa de mucílago, esto puede realizarse a través de una fermentación "controlada" (durante 12-48 h) y lavado en tanques de concreto, o fregado mecánico (aquapulping). En el paso de fermentación, el mucílago se hidroliza por las enzimas de los tejidos de café y de microorganismos encontrados en las pieles de los frutos. Los granos resultantes todavía están cubiertos por el pergamino. ⁽¹⁹⁾

Cuando la fermentación se completa, el café se lava cuidadosamente con agua limpia en tanques o en lavadoras especiales. El café pergamino húmedo en esta etapa tiene aproximadamente 57% de humedad.

Para reducir la humedad a un máximo del 12.5%, el café pergamino se seca al sol, en un secador mecánico o mediante una combinación de ambos. El secado al sol debería tomar de 8 a 10 días, dependiendo de la temperatura y humedad ambiental.

Las etapas finales de la preparación del café, conocidas como "curado", generalmente tienen lugar en una planta especial justo antes de que el café se venda para la exportación. En la etapa final, el café se descascara para quitar el pergamino, y luego pasa por una serie de operaciones de limpieza, cribado y clasificación, que son comunes tanto para el café procesado húmedo como para el seco. ⁽⁵⁾ Finalmente se pueden pulir en máquina, para producir granos de café con precios superiores. ⁽¹⁹⁾

En la figura N°2 se muestra un diagrama de flujo de las principales etapas en el procesamiento del café desde su cosecha hasta la obtención del café verde.

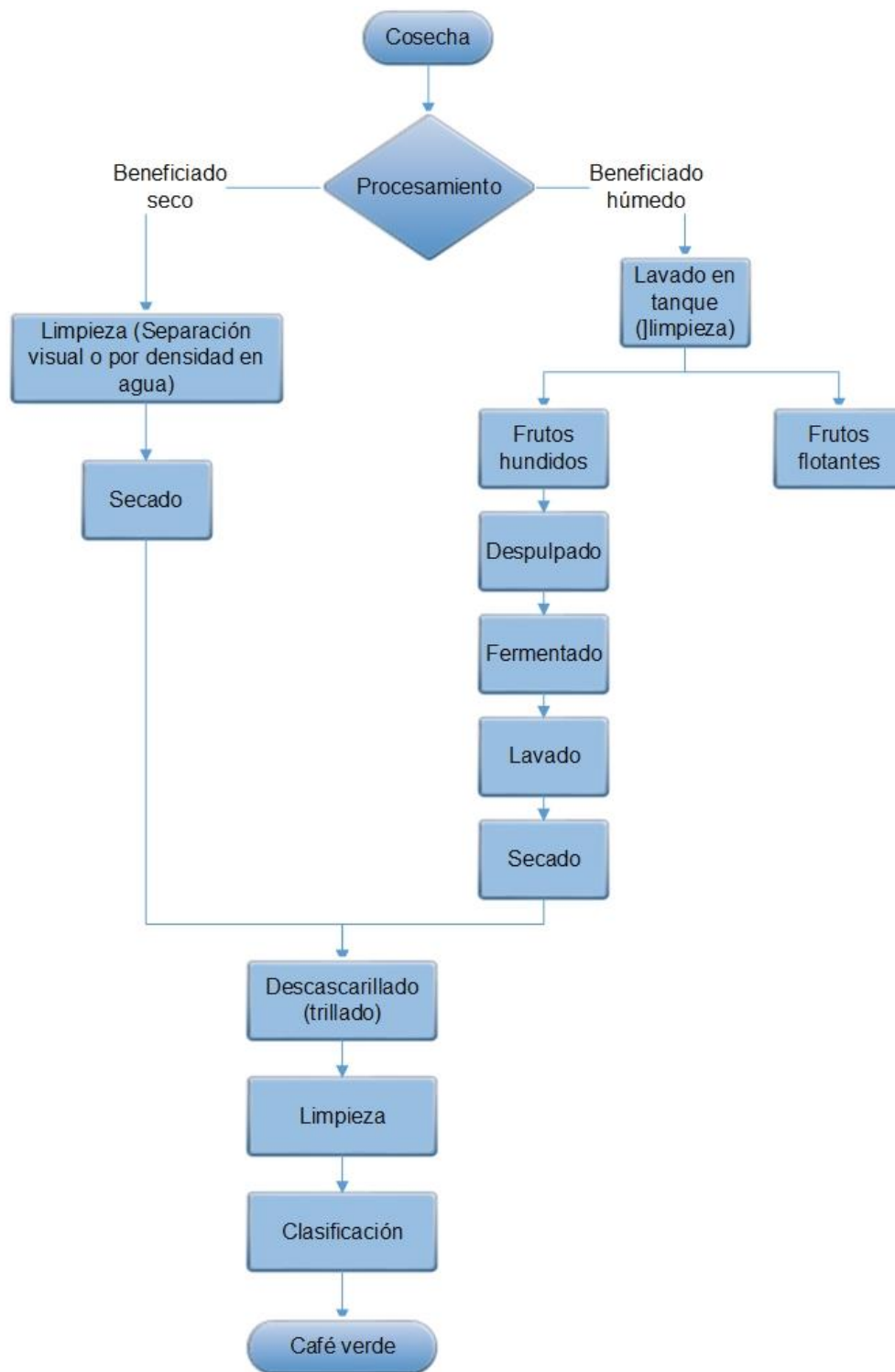


Figura N° 2: Diagrama de flujo de las etapas del beneficiado del café.

3.2.4. Producción de café instantáneo

En la elaboración del café instantáneo se debe obtener primero la bebida mediante los procesos industriales de tostado, molienda y extracción, la cual luego se deshidrata, obteniéndose los sólidos solubles secos en forma de polvo o granulados, que finalmente se envasan. ^{(30) (21)}

El tostado es un paso esencial en la producción de café instantáneo de alta calidad, ya que este proceso produce el aroma y el sabor deseado de los granos. Se utilizan temperaturas de entre 160°C y 260°C durante diferentes períodos de tiempo dando lugar a cambios físicos, químicos, estructurales y sensoriales.

El tostado comienza cuando se alcanzan los 160°C en esta etapa los granos de café comienzan a perder humedad. Las reacciones pirolíticas comienzan a 190°C, causando muchos cambios químicos directamente relacionados con el grado de tostado en los granos de café.

Cuando se alcanza el grado de tueste requerido, los granos deben enfriarse rápidamente, usando agua o aire como agente refrescante, para evitar una mayor volatilización del aroma, lo que alteraría la calidad del producto. ⁽³⁰⁾

La molienda es el segundo paso en el proceso del café instantáneo, en la cual los granos se reducen a trozos de 0.5-1.1 mm para aumentar la interfaz entre el agua y el café y para facilitar la transferencia de sustancias solubles a la infusión.

Cuando se realiza este proceso a gran escala suele emplearse rodillos gemelos horizontales de etapas múltiples, principalmente para asegurar una distribución de tamaño de partícula más uniforme de lo que de otro modo no sería posible. Se pueden usar hasta cuatro etapas, las dos primeras esencialmente craqueando

o triturando los granos en unidades más pequeñas, seguidas por etapas para un molido progresivamente más fino. ⁽¹¹⁾

Una vez tostado y molido, el café se hidrata en agua para realizar la extracción, la cual es la parte más compleja del procesamiento de café instantáneo, siendo la temperatura y la presión los dos parámetros más importantes. Algunos carbohidratos poliméricos que son beneficiosos para asegurar una buena combinación de aromas se extraen a una temperatura de 180°C ajustando el sabor del producto; la temperatura debe mantenerse por debajo de 190°C, así se evita la extracción adicional de sólidos de sabores indeseables.

El proceso generalmente depende de la adición de agua blanda en una serie de cinco a ocho columnas interconectadas de granos de café molidos en diferentes etapas de agotamiento y junto con una combinación adecuada de temperatura y presión, se ha convertido en el sistema de extracción más utilizado, y da como resultado un extracto de café que contiene entre 20-30% de sólidos solubles para su secado posterior. ^{(30) (11)}

La operación para la obtención del extracto es intermitente, contracorriente (con respecto al agua-café) y bajo presión para todas las columnas excepto la primera (lo que permite mantener el sistema hidráulico a temperaturas superiores a 100°C hasta 175°C). La primera columna contiene café tostado fresco extraído con licor a 100°C, mientras que el más gastado se pone en contacto con agua de alimentación pura a la temperatura más alta. ⁽¹¹⁾

Para retirar el agua que hace parte del extracto se requieren fundamentalmente dos procesos industriales adicionales: la concentración y el secado, ⁽²¹⁾ ya que la remoción de agua de un extracto se logra más económicamente si se alimenta con extracto concentrado a los secadores. ⁽¹¹⁾

La concentración es la etapa que sigue a la extracción, la cual pretende obtener un extracto que contenga alrededor de 40% de sólidos. ⁽³⁰⁾ La evaporación es de los métodos más utilizados en la industria, nuevamente, por razones de economía de calor, se lleva a cabo en varios tipos de unidades de múltiples etapas, pero la evaporación del agua siempre va acompañada de evaporación y pérdida de sustancias orgánicas volátiles que contribuyen al sabor. ⁽¹¹⁾

Para evitar el problema y conservar las propiedades del café suele utilizarse la técnica de evaporación al vacío, que es el proceso en el cual el líquido se evapora a una temperatura inferior a la normal, acelerando así la concentración, ⁽³⁰⁾ se usan normalmente temperaturas que oscilan alrededor de unos 45°C. ⁽²¹⁾

Otra técnica es la utilización de evaporadores de centrífuga, que implica el uso de una centrífuga para separar el agua más clara del café más pesado. Una tercera técnica alternativa es la concentración por congelación, que es un proceso de enfriamiento del extracto suficiente para congelar el agua y luego separar mecánicamente los cristales de hielo del concentrado de café ⁽³⁰⁾ mediante filtros especiales, así los extractos reciben menos calor, lo cual reduce el riesgo de perder ciertos aromas y sabores, ⁽²¹⁾ por lo tanto, ésta técnica tiene la marcada ventaja de retener las sustancias volátiles, pero a la vez tiene la desventaja de alcanzarse una concentración final menor comparada con las otras técnicas, esto se debe a que se generan problemas de alta viscosidad, ⁽¹¹⁾ además de ser más costoso de producir que otros, ésta técnica también es conocida como crioconcentración. ⁽²¹⁾

El siguiente paso necesario para la fabricación de café instantáneo, luego de obtener el extracto de café, es el secado. La forma como se seca el extracto para obtener finalmente el café instantáneo es aún más crucial para evitar la pérdida de estos aromas altamente volátiles. Existen dos formas para eliminar el agua

remanente en los extractos: el secado por atomización, también conocido como procesos "spray dried" y el secado por liofilización "freeze dried". En ninguno de los dos procesos se utilizan aditivos o material diferente al extracto, sin embargo, su impacto en la calidad de la bebida es muy diferente, de tal forma que el liofilizado aunque se realiza a un costo mayor es utilizado porque produce una calidad superior de café. ⁽²¹⁾

3.2.5. Secado por atomización

En un método de secado en el cual el extracto se atomiza desde una torre alta, y para el momento en que llega al fondo de la misma se ha evaporado casi toda el agua y sólo queda el polvo de café soluble. ⁽²¹⁾ En el secado por atomización la temperatura utilizada en la entrada de la cámara de secado se mantiene entre 250°C y 270°C, mientras que la temperatura de salida se mantiene entre 110°C y 130°C (empleándose diferentes temperaturas para condiciones específicas). ⁽³⁰⁾ Se realiza hasta temperaturas de entre 40°C y 50°C, cuando se utilizan presiones menores que la atmosférica. ⁽²¹⁾

Las principales etapas del secado por atomización se describen a continuación:⁽¹⁰⁾

1. El concentrado de café enfriado se transporta a la boquilla de pulverización situada en la parte superior de la cámara de secado mediante la bomba de alimentación.
2. El aire se calienta a alrededor de 250°C y se sopla hacia abajo a través de la niebla, donde el dispersor de aire evapora el agua.
3. El sistema de limpieza del aire de escape, desvía el aire de secado de la cámara de secado cerca de la parte inferior.
4. El aire se filtra para eliminar partículas finas, y luego puede recircularse a través de la cámara durante el paso de aglomeración.

5. El café en polvo resultante se recoge en el fondo de la cámara. Contiene 2-4% de humedad y consiste en partículas que fluyen libremente, no polvorientas. La concentración requerida de café es una consideración importante en este proceso. A concentraciones más altas, la viscosidad y la tensión superficial aumentan, lo que es beneficioso en la formación de café en polvo. Sin embargo, si la concentración es demasiado alta, puede provocar una atomización deficiente.

En ocasiones en el secado por atomización es necesario pasar por una etapa de aglomeración cuando partículas producidas son demasiado finas para disolverse completamente en la taza al agregar agua. ⁽³⁰⁾

La aglomeración es un proceso utilizado para aumentar el tamaño medio de partícula, lo que facilita la rápida disolución en agua, denominado frecuentemente como "instantización", la cual no es necesaria para un café instantáneo con un tamaño de partícula satisfactorio.

En la aglomeración se usa vapor/agua para rehumedecer la superficie de las partículas ⁽¹¹⁾ y luego se hace que las partículas entren en contacto entre sí, lo que lleva a la adherencia y la formación de partículas más grandes ⁽³⁰⁾ seguidamente se seca. La disminución del contenido de compuestos volátiles desde el secado por pulverización hasta la formación de gránulos no es muy grande. ⁽¹¹⁾

3.2.6. Secado por liofilización

La liofilización es un método útil para el secado de sustancias termosensibles, consiste en la deshidratación por sublimación de un producto congelado a

temperaturas y presiones muy bajas, ⁽³⁰⁾ es decir, se congela el extracto de café a temperaturas muy frías del orden de los -50°C , al ser sometido a un vacío profundo, de menos de una milésima de la presión atmosférica, se posibilita, con un mínimo de calor que el agua remanente en el extracto congelado pase directamente del estado sólido (hielo) al gaseoso (vapor), proceso conocido como sublimación.

El hecho de que el producto permanezca a temperaturas muy bajas y sin contacto con aire caliente (está al vacío) permite que los delicados aromas se conserven, generando así una bebida de excelentes características organolépticas. ⁽²¹⁾

Los diseños de liofilizador disponibles, generalmente manejarán los gránulos congelados en bandejas que descansan en estantes calentados de forma discontinua, durante un tiempo de hasta 7 horas bajo condiciones de vacío (aproximadamente 0.4 torr), utilizando usualmente por razones económicas extractos concentrados por evaporación de 40% p/p o superior, así como concentrados por congelación de hasta 40% p/p. ⁽¹¹⁾

Las principales etapas del secado por liofilización se describen a continuación:⁽¹⁰⁾

1. El café concentrado con 40% de sólidos se usa comúnmente como materia prima en el proceso de liofilización. Esto conserva energía y proporciona una buena densidad de partículas en el producto final.
2. La etapa de congelación primaria enfría el concentrado de café a baja temperatura ($0-3^{\circ}\text{C}$) para detener la volatilización de sustancias aromáticas y reducir la carga de los secadores.
3. En la etapa de congelación, el café cambia rápidamente de líquido a sólido: el tiempo de congelación es un factor importante que afecta la calidad del producto final. Los procesos de congelación rápida (que

toman 30-120 s) conducen a gránulos más pequeños y de color más claro, mientras que los procesos más lentos (que toman 10-180 min) dan como resultado gránulos porosos, más grandes y más oscuros.

4. En la etapa de trituración y tamizado, las losas de hielo formadas durante la congelación se rompen primero en pedazos y se muelen en partículas del tamaño requerido para la siguiente etapa de secado; las partículas se tamizan para mantener el tamaño correcto, y cualquier partícula que sea demasiado pequeña se derrite y se devuelve a la etapa de congelación primaria.
5. Las partículas de café congelado se colocan en una cinta o bandeja de acero y se envían a una cámara de secado. Dentro de la cámara calentada, el hielo se vaporiza y se elimina a la temperatura requerida y bajo condiciones de vacío. El vapor de agua es eliminado de la cámara y recogido por el condensador para mantener un vacío constante en la cámara de secado.
6. Los gránulos liofilizados se retiran de la cámara y se envasan.

La liofilización presenta múltiples ventajas como lo son las reacciones microbiológicas y deterioro limitados, debido a la ausencia de agua líquida y las bajas temperaturas involucradas; lo que implica la obtención de un producto final de muy alta calidad. Otra ventaja es que el agua en su estado sólido protege la estructura primaria y la forma de los productos con una reducción mínima de volumen.

Sin embargo, a pesar de que ofrece numerosas ventajas, la liofilización ha sido reconocida como el método más costoso para fabricar un producto deshidratado, ⁽³⁰⁾ sin embargo, la proporción de café instantáneo liofilizado ha crecido en forma constante en la medida en que los consumidores exigen un café de mejor calidad.⁽²¹⁾

En la figura N°3 se presenta un esquema resumen del proceso de producción de café instantáneo.



Figura N° 3. Diagrama de flujo de etapas de la producción de café instantáneo.

3.3. Consumo de café instantáneo en El Salvador

En El Salvador según el Diagnóstico del Consumo de Café del MAG y el CSC realizado en 2008 alrededor de un 81% de la población salvadoreña consume café y es preciso destacar que de ellos el 60% prefiere el café instantáneo. ⁽¹⁸⁾

El lugar donde los Salvadoreños acuden usualmente a comprar el café que consumen son los supermercados basándose en el trabajo realizado por Avalos, Guillermo, & Chávez (2017) en el cual un 67% de los salvadoreños entrevistados afirmaron que compran el café que consumen en supermercados⁽³⁾, asimismo según el estudio publicado en 2008 por la defensoría del consumidor las cadenas de supermercados ocupan el segundo lugar en el tipo de establecimiento en que los salvadoreños más confían para realizar sus compras, estando sólo por debajo de las farmacias, las cuales no suministran café instantáneo. ⁽¹⁷⁾

3.4. Generalidades de las micotoxinas

Los hongos tienen la capacidad de cambiar la textura, el olor, el color, el sabor y la calidad de muchos alimentos, lo que contribuye a su descomposición, pudiendo además acarrear peligros para la salud de los seres humanos y los animales. ⁽⁸⁾

Los hongos filamentosos actúan como patógenos oportunistas y pueden producir toxinas a las que se ha implicado en diversas enfermedades y síndromes clínicos en el ser humano y los animales. ⁽³⁷⁾

Es importante tener en cuenta que los hongos filamentosos o microhongos que producen micotoxinas no deben confundirse con los macrohongos o setas. ⁽⁷⁾

El término micotoxinas se deriva de la palabra griega *mykes* que significa hongo y la palabra latina *toxicum* que significa toxina o veneno. ⁽⁷⁾ Las micotoxinas son

metabolitos secundarios tóxicos los cuales son producidos por hongos microscópicos durante la fase estacionaria de su crecimiento. ⁽⁸⁾

3.4.1. Factores involucrados en la producción de micotoxinas ⁽⁸⁾

La presencia de propágulos de hongos implica un riesgo potencial de contaminación, aunque no necesariamente, la existencia de toxinas ya que es importante destacar que no todas las especies son toxigénicas y aunque suelen registrarse mayores niveles de toxinas en granos visiblemente dañados, se ha demostrado, que la contaminación puede aparecer también en granos aparentemente sanos, o en aquellos donde el hongo ha perdido su viabilidad.

Los factores ambientales más importantes que influyen sobre el crecimiento de los hongos y la producción de micotoxinas, son la temperatura y la actividad del agua (a_w), relacionada con la humedad relativa ambiental. Los requerimientos de temperatura óptima y temperaturas extremas de crecimiento, así como para los valores de a_w que resultan limitantes para el desarrollo y la biosíntesis de las toxinas son variables. En muchos casos la producción de la toxina ocurre solo en un rango de a_w considerablemente más elevado que el requerido para el crecimiento del hongo y en un rango de temperatura más estrecho.

En el caso de los hongos que pueden sintetizar más de una toxina, las condiciones ambientales también influyen sobre el tipo y la cantidad de metabolitos producidos.

Otros factores que influyen también en la proliferación de hongos y en la generación de micotoxinas en los alimentos pueden ser los daños mecánicos y la acción de agentes biológicos, como lo son, insectos y roedores, los que aumentan la susceptibilidad a la infección, además cabe destacar que esos

agentes biológicos pueden portar esporas de hongos e introducirlas en los productos atacados.

Existen asimismo factores que pueden disminuir la posibilidad de la proliferación de micotoxinas, como lo es la competencia microbiana, siendo así que la presencia de otras especies rivales disminuye o anula la producción de micotoxinas.

En algunos casos el genoma de la planta hospedera hace a ciertas especies resistentes a la infección, esto se relaciona con sus características químicas.

3.4.2. Micotoxicosis

Las micotoxinas pueden originar enfermedades las cuales son conocidas como micotoxicosis, éstas pueden manifestarse como un proceso agudo o crónico, debido a su ingestión, inhalación o por contacto directo con la toxina.

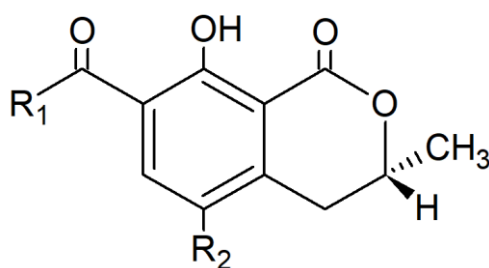
Los síntomas iniciales y la gravedad de una micotoxicosis dependen del tipo de micotoxina involucrada, la cantidad, la vía y la duración de la exposición, la edad, el sexo y el estado de salud de la persona expuesta. Siendo así que factores, como la desnutrición, el consumo abusivo de alcohol, la coexistencia de una enfermedad infecciosa y la exposición a otras toxinas puede actuar de manera sinérgica aumentando el efecto y la gravedad de la intoxicación por una micotoxina. ⁽³⁷⁾

Se han aislado de los alimentos muchas sustancias que son consideradas micotoxinas, pero solo unas pocas de ellas han sido implicadas como agentes causales de micotoxicosis en humanos y animales, siendo las más importantes las aflatoxinas, OTA, zearalenona, tricotecenos, fumonisinas, patulina y las toxinas del ergot entre otras. ⁽⁸⁾

La contaminación de alimentos y piensos con micotoxinas se ha convertido en un importante problema de seguridad, con respecto a la salud del consumidor. Se han identificado casi 400 tipos de micotoxinas siendo la OTA una de las que alcanza mayor relevancia en el control de la inocuidad de los alimentos. ⁽⁹⁾

3.5. Ocratoxinas

Se conocen como ocratoxinas a un grupo de compuestos que poseen el aminoácido fenilalanina ligada por el grupo amida a una isocumarina (ver figura N°4). De los metabolitos identificados en este grupo la de mayor relevancia tanto por sus efectos tóxicos como por su amplia distribución en la naturaleza y en los alimentos es la OTA, la cual presenta en su molécula un átomo de cloro que es responsable de su carácter tóxico. ⁽⁸⁾ A la luz ultravioleta, la OTA presenta fluorescencia verde. La OTB es un análogo no clorado de este compuesto de la cual se sabe que es significativamente menos tóxica tanto in vivo como in vitro. A la luz ultravioleta, la Ocratoxina B (OTB) tiene fluorescencia azul. ⁽²³⁾



Ocratoxina	R1	R2
A	Fenilalanina	Cl
B	Fenilalanina	H
C	Fenilalanina, etil éster	Cl
α	OH	Cl
β	OH	H

Figura N° 4. Estructuras de las cinco principales Ocratoxinas. ⁽²⁵⁾

La Ocratoxina C (OTC) es un éster de la OTA, y su posible potencial tóxico, (aunque se considera prácticamente nulo) se ha estudiado sobre algunas líneas celulares de monocitos en el ser humano. ⁽²⁵⁾

La Ocratoxina α (OT α) y la Ocratoxina β (OT β) producidos en la hidrólisis de la OTA y OTB respectivamente, no poseen la molécula de fenilalanina y no se consideran tóxicas. La OT α se ha detectado en la orina de animales de experimentación a los que se les ha administrado OTA, además se ha observado en animales rumiantes como parte de un proceso de detoxificación de la OTA que tiene lugar en el rumen. ⁽²⁵⁾

Se han descrito varios derivados de ocratoxinas, pero, solo la OTA, y muy raramente la OTB, se han encontrado como contaminantes naturales en productos alimenticios, las demás ocratoxinas se han aislado solo de cultivos de hongos o bajo condiciones de laboratorio, ⁽³²⁾ además se han estudiado alrededor de 30 metabolitos producidos tras biotransformaciones dentro de los cuales se pueden encontrar tanto compuestos hidroxilados, así como otros que son un resto de fenilalanina o compuestos que están conjugados (por ejemplo, con glutatión, ácido glucurónico, sulfato o pentosa), asimismo se han investigado productos de la degradación térmica de OTA como la Ocratoxina α amida que tiene lugar a altas temperaturas durante el tostado del café o los compuestos 2'-DC-OTA y 2'-R-OTA de los cuales se ha identificado su formación durante el tostado del café a 225°C. ⁽³⁴⁾

3.6. Ocratoxina A

La OTA es una de las micotoxinas más importantes y nocivas, descubierta en Sudáfrica como un metabolito tóxico en una harina de maíz que fue inoculada intencionalmente con *Aspergillus ochraceus*, se aisló y caracterizó químicamente en 1965. ⁽³⁴⁾ En muchos productos alimenticios se ha detectado contaminación

por OTA, como por ejemplo, cereales y productos de cereales, carne de cerdo y de aves de corral, nueces y especias, uvas, vino, cerveza y café. La OTA es producida por hongos de la especie *Penicillium* los cuales se encuentran en climas fríos, y por varias especies de *Aspergillus* en regiones con climas tropicales y subtropicales. ⁽⁴⁶⁾

En las tablas N°2 y N°3 se presenta información de las especies de microhongos *Aspergillus* y *Penicillium* productoras de OTA en alimentos, especificándose algunos de los productos alimenticios en los que ya ha sido estudiada. ⁽³⁴⁾

Tabla N° 2. Especies de *Aspergillus* productoras de OTA en alimentos.

Género	Sección	Especies	Productos alimenticios (ejemplos)	Año de descubrimiento
<i>Aspergillus</i>	<i>circumdati</i>	<i>A. ochraceus</i> G. Wilh.	Frijol de soya, nueces, pimienta roja, cereales, granos de café verde	1965
		<i>A. steynii</i> Frisvad & Samson	Granos de café	2004
		<i>A. westerdijkiae</i> Frisvad & Samson	Granos de café	2004
	<i>nigri</i>	<i>A. carbonarius</i> (Bainier) Thom	Uvas, pimienta roja, granos de café	1996
		<i>A. foetidus</i> Thom & Raper	Uvas	1996
		<i>A. lacticoffeatus</i> Frisvad & Samson	Granos de café	2004
		<i>A. niger</i> Tiegh.	Uvas, cacahuates	1994
		<i>A. sclerotioniger</i> Frisvad & Samson	Granos de café	2004
		<i>A. tubingensis</i> Mosseray	Uvas	2005

Tabla N° 3. Especies de *Penicillium* productoras de OTA en alimentos.

Género	Subgénero	Series	Especies	Productos alimenticios (ejemplos)	Año de descubrimiento
<i>Penicillium</i>	<i>penicillium</i>	Verrucosa	<i>P. verrucosum</i> Dierckx	Cereales	1969
		Verrucosa	<i>P. nordicum</i> Dragoni & Marino	Jamón seco, salami	2001

Caballero Torres (2008) afirma que las condiciones ambientales para la producción de OTA por *A. ocraceus* y *P. viridicatum* en alimentos son una a_w óptima de 0.99 con un valor límite de 0,85 y temperatura óptima de 31°C con un recorrido que varía de 19 a 37 °C. Mientras que la OTA se produce por *P. verrucosum* a temperatura óptima de 24 °C y a_w óptima de 0,97 con un valor límite de 0.9. ⁽⁸⁾

3.6.1. Propiedades de la OTA

Es una de las Ocratoxinas cuyo nombre IUPAC es (*N*-[[*(3R)*-5-chloro-8-hydroxy-3-methyl-1-oxo-7-isochromanyl] carbonyl]-3-phenyl-L-alanine) y que posee un número de CAS: 303-47-9. ⁽³⁴⁾

La OTA es una toxina fúngica natural que se produce como cristal incoloro a temperatura ambiente y observada bajo luz normal. El ácido libre es insoluble en agua, pero es moderadamente soluble en solventes orgánicos como cloroformo, etanol, metanol y xileno. Es inestable a la luz, especialmente en ambientes con condiciones muy húmedas; sin embargo, es estable en la oscuridad en soluciones de etanol. ⁽⁴⁴⁾

La OTA también es bastante estable al calor y no se destruye mediante procedimientos comunes de preparación de alimentos. ⁽¹⁰⁾ Se ha observado que,

en productos de cereales, hasta 35% de la toxina sobrevive en autoclave por hasta 3 horas, ⁽⁴⁴⁾ por lo que se requieren entonces temperaturas superiores a 250°C durante varios minutos para reducir la concentración de OTA. ⁽¹⁰⁾

Las propiedades físicas y químicas de la OTA son enlistadas en la Tabla N°4.

Tabla N° 4. Propiedades físicoquímicas de OTA. ⁽⁴⁴⁾

Propiedad	Información
Peso molecular	403.8 g/mol
Densidad	1.366 g/mL
Punto de ebullición	169°C
Log K_{ow}	4.74
Solubilidad en agua	1.31 mg/L at 25°C
Presión de vapor	7.56×10^{-15} mm Hg at 25°C
Constante de disociación (pK_a)	3.46

3.6.2. Toxicidad de OTA

Varios estudios realizados comprueban que la OTA es una nefrotoxina, un inmunosupresor, un agente teratógeno, carcinógeno y además es fetotóxica. ⁽⁴⁶⁾

Administrando dosis elevadas de OTA en animales, pueden observarse daños en diferentes órganos y tejidos, sin embargo, en niveles bajos de exposición los daños se manifiestan solo en los riñones. ⁽⁸⁾

Estudios han comprobado que la OTA es nefrotóxica, incluso a muy bajas concentraciones, en todas las especies de animales en los que ha sido estudiada, como por ejemplo, roedores, cerdos, pájaros y pequeños rumiantes, ⁽²⁵⁾ actúa atacando de forma selectiva al riñón, afectando fundamentalmente los túbulos proximales (degenerándolos), las lesiones incluyen además, fibrosis intersticial y más tarde hialinización de los glomérulos con alteración de la función renal. ⁽⁸⁾

Esta toxina resultó ser teratogénica en todas las especies estudiadas ya que al aplicar inyección intraperitoneal se observan un aumento de la mortalidad prenatal, disminución de la edad fetal, el peso y diversas malformaciones fetales.⁽³²⁾ Existen además ciertas evidencias de su acción sobre el sistema inmunológico,⁽⁸⁾ además administrada a cerdos, roedores y conejos, produjo trastornos en el hígado, provocándose una acumulación de glucógeno en los tejidos hepático y muscular, se inhibió la síntesis de ADN, ARN y proteínas y se presentaron efectos neurotóxicos.⁽²⁵⁾

Investigaciones han asociado la OTA con una micotoxicosis denominada “nefropatía porcina” la cual es endémica en Dinamarca, en las cuales se ha descubierto la presencia de concentraciones elevadas de esta toxina en la dieta de los cerdos; además, se detectó la presencia de la toxina en el 35% de los riñones de animales afectados, mientras que al compararla con riñones de animales sanos esta no fue encontrada⁽⁸⁾

3.6.2.1. Nefropatía Endémica de los Balcanes

Existe además una nefropatía que presenta características clínicas e histopatológicas comparables a la nefropatía porcina.⁽⁸⁾ La enfermedad denominada nefropatía endémica de los Balcanes (NEB) una nefritis progresiva crónica observada en poblaciones residentes en zonas limítrofes al río Danubio en Rumania, Bulgaria y la antigua Yugoslavia. Se ha descrito también una gran cantidad de casos de tumores renales en personas con NEB.⁽³⁷⁾ La NEB es una enfermedad que presenta una evolución lenta pero que termina provocando muerte por fallo renal en las personas que la padecen.⁽²⁵⁾

La contaminación de los alimentos con Ocratoxina y la presencia de OTA en el suero humano es más frecuente en familias afectadas por NEB y en individuos

con tumores del aparato genitourinario que en familias no afectadas, sin embargo, aunque se han encontrado indicios que sugieren que el origen de la NEB es una micotoxicosis por OTA los estudios no son concluyentes y existen hipótesis de que en la enfermedad podrían participar diversos factores, como factores genéticos, metales pesados y posibles agentes infecciosos ocultos. No obstante debido a la nefrotoxicidad aguda, acción inmunodepresora y efectos teratogénicos de la OTA en los animales junto a su tendencia de conservarse a lo largo de la cadena alimentaria representan un riesgo para la salud de los seres humanos, lo que justifica la importancia llevar a cabo más estudios al respecto.⁽³⁷⁾

3.6.2.2. Carcinogenicidad de la OTA

Se prevé razonablemente que la OTA es un carcinógeno humano, basado en evidencia suficiente de carcinogenicidad de estudios en animales, ya que se ha comprobado que la exposición oral a la OTA causa tumores hepáticos y renales, benignos y/o malignos. Sin embargo, los datos de los estudios epidemiológicos en humanos son inadecuados para concluir si existe una relación entre el cáncer humano y la exposición específicamente a la OTA.⁽⁴⁴⁾

En 1976 y 1983, la IARC evaluó por primera vez el riesgo carcinogénico de la OTA humanos, para ese momento, no se disponía de ningún informe sobre casos de cáncer o estudios epidemiológicos y, debido a la ausencia de estudios epidemiológicos adecuados, no se pudo realizar una evaluación de la carcinogenicidad de la OTA con respecto a los humanos. En 1987, la IARC reclasificó OTA en el Grupo 3 (no clasificable por su carcinogenicidad para los humanos). Luego en 1993 debido a una gran cantidad de evidencia de carcinogenicidad de OTA la cual fue revelada en nuevos estudios con animales, fue nuevamente reclasificada en el Grupo 2B (posiblemente carcinogénico para humanos).⁽³¹⁾

En la actualidad, la nueva información sobre genotoxicidad de OTA (formación de aductos de OTA-ADN), su papel en el estrés oxidativo, y la identificación de los factores epigenéticos implicados en la carcinogénesis por OTA, pueden en caso de que proporcionen evidencia sólida, de que la carcinogenicidad de la OTA está mediada por un mecanismo que también ocurre en humanos, llevar a otra reclasificación de la OTA. ⁽³⁴⁾

Desafortunadamente, el mecanismo o los mecanismos de acción implicados en la tumorigenicidad y la toxicidad mediadas por OTA aún no se conocen bien, se han propuesto mecanismos genotóxicos directos (unión directa de ADN de OTA), daño indirecto del ADN oxidativo y varios mecanismos epigenéticos (como la interrupción de mitosis, proliferación celular, activación de vías de señalización celular e inhibición de la síntesis de proteínas), es necesario diferenciar entre estos diferentes mecanismos para la evaluación y manejo del riesgo, sin embargo ha sido tema de debate generando controversia con respecto a la OTA ya que se cuenta con evidencias que respaldan cada uno de estos mecanismos.

Esta controversia a nivel científico también se puede observar en las diferentes evaluaciones realizadas por diversas agencias internacionales. Algunas agencias han utilizado un enfoque basado en el umbral y han derivado ingesta semanal tolerable provisional (ISTP) de 100 o 120 ng/kg de peso corporal mientras que otras agencias como Health Canada recomienda que la OTA sea regulado como un carcinógeno sin umbral y derivan de un TDI provisional de 3ng/kg de peso corporal. ⁽⁴⁹⁾

3.7. Contaminación por OTA en el café

La exposición humana a OTA ocurre principalmente a través de la cadena alimenticia, ya que se encuentra en varios tipos de productos, siendo las tres fuentes principales los cereales, el vino y el café. ⁽²⁴⁾

Durante el cultivo y el procesamiento del café diferentes hongos y bacterias pueden contaminar las bayas y los granos de café. Este tipo de contaminación podría no representar un riesgo grave para la salud de los consumidores ya que en el proceso de producción de café se aplican altas temperatura durante el tostado. Sin embargo, ciertos hongos producen micotoxinas con diferentes niveles de resistencia al proceso de tostado y, por lo tanto, representan un riesgo para la salud humana, la OTA es una de esas micotoxinas. ⁽²⁴⁾

Los granos de café son propensos a la contaminación por moho durante la etapa previa a la cosecha (nivel de la granja) o durante el procesamiento llevado a cabo después de la cosecha en el secado, tostado, almacenamiento, etc. ⁽⁴⁷⁾ (Ver figura N° 5)



Figura N° 5. Granos de café (izquierda) ⁽²²⁾ y frutos de la planta de café robusta (derecha) contaminados con hongos. ⁽²⁶⁾

3.7.1. Contaminación antes de la cosecha

Experimentos preliminares han demostrado que cuando las flores del cafeto están expuestas a las esporas del *Aspergillus ochraceus*, se pueden contaminar los granos de café, ⁽⁴¹⁾ también puede ocurrir la invasión de insectos como la broca

del café (*Hypothenemus hampei*), la cual puede contaminar al perforar las bayas y hacer uno o más túneles en los grano y llevar así esporas al fruto, dejando indicios visibles, ⁽³⁹⁾ sin embargo, los estudios indican que pocas cerezas en los cafetos se infectan con especies micotoxigénicas productoras de OTA por lo que se deduce que se produce después de la cosecha, siendo probablemente las fuentes fúngicas el suelo, el equipo y las superficies del patio de secado. ⁽⁴³⁾

3.7.2. Contaminación durante la cosecha

Durante la cosecha el contacto directo del fruto con el suelo puede ser una fuente de contaminación dado que el suelo es un depósito potencial de propágulos de moho y por lo tanto fuente potencial de contaminación con micotoxinas, por ésta razón siempre es apropiado usar tapetes de cosecha como prevención ante frutos caídos durante la recolección, ⁽⁴⁷⁾ en El Salvador a este tipo de fruto se le conoce como café de pepena y está definido en la NSO 67.31.01:03 como el “grano de café verde, maduro o seco que se ha caído de la planta y es recogido después de efectuada la recolección. Se procesa por la vía seca.” ⁽¹⁵⁾ Es importante resaltar que en los espigueos la contaminación aumenta según el número de días en los que el fruto permanece en contacto con el suelo. ⁽⁴⁷⁾

Las investigaciones demuestran que el *Aspergillus ochraceus* se encuentra con mayor frecuencia en el suelo que rodea las raíces de los cafetos que en otros suelos, siendo así que la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) recomienda que el café que ha estado en contacto con el suelo varios días representa un riesgo de OTA y debería eliminarse de la cadena alimentaria. ⁽⁴¹⁾ Por otra parte es importante considerar que el retraso en el procesamiento después de la cosecha promueve la contaminación fúngica y por OTA además del deterioro de la calidad de la taza, debido a lo cual el tiempo de demora debería ser menor a 4 horas. ⁽⁴⁷⁾

3.7.3. Contaminación durante el procesamiento

Durante el secado:

El secado del café es un punto crítico ya que se da la transición entre el café húmedo (estado en el cual algunos organismos hidrofílicos y la fisiología de la semilla pueden obstaculizar la formación de mohos toxicogénicos) y el café totalmente seco (en el que no se pueden formar mohos).

Los niveles intermedios de humedad son un entorno propicio para los organismos productores de OTA, ⁽⁴¹⁾ por lo que requiere especial atención del tiempo que tardan las bayas en secarse por debajo de una actividad crítica del agua (a_w) de aproximadamente 0.80, debido a esto las bayas no deberían pasar más de 4 días entre 0.80 a 0.97 de a_w . ⁽⁴³⁾ la clasificación adecuada de las cerezas de café en función de la madurez mejora el secado y el control de la humedad en el procesamiento en seco. ⁽⁴⁷⁾

Un buen patio de secado es requerido para evitar la contaminación, los granos de café deben ser secados sobre un piso de concreto, baldosas, ladrillo, granito o cualquier otra superficie dura. Alternativamente, en caso de carecer de un patio de secado apropiado, se puede secar el café sobre láminas de plástico o lona, teniendo el cuidado de girar el café regularmente para evaporar la humedad condensada en la capa inferior. ⁽⁴⁷⁾

Durante el secado al sol, se puede formar OTA en el pericarpio de la cereza de café (pulpa y pergamino), la parte de la cereza que se elimina en el proceso de descascarillado. El procedimiento del descascarillado es bastante polvoriento y existe la posibilidad de que parte de la OTA contenida en las cáscaras se transfiera como partículas de polvo o fragmentos de cáscara al café crudo. ⁽⁴⁷⁾

Considerando el beneficiado:

Se ha descubierto que la OTA se encuentra en mayor cantidad en frutos flotantes en el beneficiado húmedo,⁽¹⁹⁾ de manera que su eliminación le brinda una ventaja, a este procesamiento, frente al beneficiado por el método seco,⁽⁴⁷⁾ además investigaciones demuestran que la carga fúngica disminuye después de la fermentación, lavado y secado. Se han descrito también diferentes tipos de especies de levaduras para inhibir hongos durante la fermentación del café.⁽⁴³⁾

En la producción de café instantáneo:

La cantidad de OTA presente en el café verde se reduce drásticamente durante la fabricación del café instantáneo. Una pequeña proporción de OTA se elimina durante la limpieza del café verde, pero la reducción más significativa se produce durante el tostado.⁽⁶⁾ Sin embargo los estudios de prevalencia de OTA en muestras de café demuestran que las concentraciones encontradas de ésta micotoxina son mayores en café instantáneo que en café tostado y molido, probablemente porque en la concentración que se produce en el procesamiento de este tipo de café, etapa en la que se concentra el extracto obtenido del café tostado el contenido de OTA puede duplicar su concentración inicial.⁽²⁴⁾ Otro factor que podría estar involucrado es que la contaminación de OTA en el café se concentra generalmente en las cáscaras, en proporciones de más del 90%, por tanto, la adición de cáscara, una práctica fraudulenta a veces encontrada en la fabricación de café instantáneo, puede conducir también a niveles relativamente altos de contaminación por OTA en café instantáneo adulterado.⁽⁴³⁾

En el 2001 la FAO dirigió un proyecto para "elevar la calidad del café mediante la prevención de la formación de hongos" se documentó un nexo entre la contaminación por OTA y los granos defectuosos de café verde. Algunos datos recopilados por el proyecto indican una "fuerte relación" entre algunos defectos y

la contaminación por OTA, aunque no en todos los casos. Un estudio realizado en Kenya, por ejemplo, reveló que casi todo el contenido de OTA se concentraba en granos clasificados "enfermos" y "dañados por insectos". Pero estudios realizados en otros países no mostraron relación entre los defectos y la OTA. Se comprobó además que los granos defectuosos de café se suelen incorporar en los cafés de menor calidad, a menudo elaborados para consumo local en los países productores. El proyecto concluyó que las prácticas postcosecha son la forma más eficaz de evitar la formación de mohos y la contaminación por OTA en el café, a fin de obtener a la mayor velocidad posible un nivel de humedad que no represente riesgos y evitar que el café se humedezca de nuevo. ⁽⁴¹⁾

3.8. Reglamentación con respecto a OTA

En 1998 por el Comité Científico de la Alimentación de la UE (SCF) estableció para la OTA dosis diarias tolerables entre 1.2-14 ng/kg por peso corporal. expertos canadienses evaluaron la OTA y sugirieron dosis de ingestión diaria tolerable provisional (IDTP) de 1.2 – 5.7 ng/kg de peso corporal para un nivel de riesgo de 10^{-5} . ⁽¹³⁾ Luego de los resultados de investigaciones respecto a esta micotoxina el Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) establece en su 37ª reunión una ingesta semanal tolerable provisional (ISTP o PTWI por sus siglas en inglés) de 112 ng/kg de peso corporal. ⁽¹⁴⁾

La última opinión científica actualizada de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) presentó una ingesta semanal tolerable (TWI) de 120 ng / kg de peso corporal, luego basándose en ella y en información sobre la exposición humana a OTA por parte de la población europea de los estados miembros de la Unión Europea, se establecieron los niveles máximos de OTA en diferentes productos de consumo que contribuyen significativamente a la exposición general de humanos a la OTA. ⁽⁴⁹⁾ Después de evaluar la ingesta alimenticia de la OTA

por parte de la población se determinó que el café contribuye significativamente a esta exposición, por lo tanto, se estableció el límite máximo aplicable a OTA contenida en el café instantáneo de 10 µg/kg (ppb).⁽¹²⁾ En la tabla N° 5 se muestra un resumen de la normativa más relevante existente para OTA.

Tabla N° 5. Resumen de la reglamentación a nivel mundial respecto a OTA.

Organización	Límite
Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA).	Ingesta semanal tolerable provisional (ISTP o PTWI) de 112 ng/kg de peso corporal.
La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA).	120 ng / kg de peso corporal (TWI).
Unión Europea	10 µg/kg (ppb).

3.9. Inmunoensayos

En un principio los inmunoensayos se desarrollaron en entornos médicos como un apoyo en el estudio de la inmunología, en especial la interacción anticuerpo-antígeno, sin embargo, en la actualidad su aplicación se está extendiendo fuera del campo clínico,⁽²⁹⁾ de tal manera que en las últimas décadas ha surgido y tomado auge su utilización en Química Analítica, especialmente su aplicación en el análisis de los contaminantes alimentarios. Los inmunoensayos ofrecen ventajas en el análisis de contaminantes de alimentos sobre los métodos convencionales, debido a que pueden proporcionar un método de detección rápido, simple y rentable, con sensibilidad y especificidad comparable a los métodos convencionales, proporcionando además una mayor velocidad del análisis.⁽³³⁾

Los inmunoensayos se basan en la capacidad de los anticuerpos para unirse específicamente a moléculas particulares llamadas antígenos, las cuales poseen una estructura complementaria a una región específica del anticuerpo. ⁽³³⁾ Un anticuerpo es una sustancia proteica producida en un animal como respuesta a la aplicación de un inmunógeno (antígeno), sustancia que es considerada extraña por el organismo animal y frente a la cual se genera una reacción de defensa, por esta razón, los anticuerpos pueden determinar cantidades muy pequeñas y en forma selectiva de dicho antígeno siendo muy específicos en cuanto a su reconocimiento. ⁽³⁵⁾ Los antígenos y anticuerpos pueden utilizarse en los inmunoanálisis como moléculas de captura o como moléculas diana, siendo así que un anticuerpo puede servir para capturar un antígeno, permitiendo conocer o cuantificar la presencia de un analito en una muestra, asimismo un antígeno se puede utilizar para capturar su respectivo anticuerpo. ⁽²⁹⁾

Existen inmunoensayos en los cuales su respuesta se basa en una señal de positividad de la reacción que se puede lograr marcando el antígeno o el anticuerpo con un cromógeno fluorescente (inmunofluorescencia), un isótopo radiactivo (RIA: Radio Inmunoanálisis en fase líquida o sólida), o una enzima (EIA: Inmunoanálisis enzimático). Pueden además encontrarse inmunoensayos que no utilicen señal de positividad (inmunoafinidad, como por ejemplo, cromatografías de inmunoafinidad). ⁽³⁵⁾

La utilización de marcadores enzimáticos facilitó la revelación de las uniones de los antígenos y anticuerpos permitiendo ampliar las aplicaciones de los inmunoensayos, surgiendo así los inmunoensayos enzimáticos. ⁽²⁹⁾ En estos ensayos se marca el antígeno o el anticuerpo con enzimas formando conjugados con propiedades inmunológicas y a la vez enzimáticas los cuales luego de reaccionar con un sustrato cromogénico pueden ser leídos espectrofotométricamente. Los inmunoensayos enzimáticos se clasifican como

homogéneos, como la Técnica de inmunoensayo multiplicado por enzimas (EMIT), y heterogéneos, como el ELISA y la Técnica inmunocitoquímica ligada a enzimas (ELICT). En los homogéneos al medir la señal no se requiere que haya una separación entre el componente que contiene la enzima marcadora y el componente que no tiene la enzima mientras que en los heterogéneos es necesaria esta separación. ⁽³⁵⁾

3.9.1. Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)

Engvall y Perlmann fueron de los primeros investigadores en realizar estudios de inmunoensayos enzimáticos, y mediante el empleo de marcadores enzimáticos desarrollaron el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) que dieron a conocer mediante una publicación en 1971, en el cual se une un antígeno o un anticuerpo a un soporte sólido, por esta razón se dice que es un ensayo inmunoabsorbente. ⁽²⁹⁾ La alta sensibilidad, especificidad y alto rendimiento han convertido a ELISA en el inmunoanálisis más utilizado, desarrollándose en los últimos años muchos kits para el análisis de diferentes muestras. ⁽⁴⁵⁾

Usualmente el ensayo se realiza en placas de microtitulación hidrófobas de 96 pocillos, fabricadas en plástico con capacidad de unos 300 µL en las que se utilizan lavados para separar las moléculas unidas y no unidas, éstas placas se identifican con letras de A – H las filas mientras que las columnas con números del 1 - 12. ⁽²⁹⁾

En el análisis de alimentos suele preferirse los inmunoensayos enzimáticos ⁽²⁹⁾ de los cuales ELISA es el más utilizado, ésta es una técnica heterogénea en la que un anticuerpo o un antígeno ⁽⁴⁵⁾ se encuentra en la fase sólida, esto se consigue recubriendo las microplacas mediante una solución que se incuba en cada pocillo en la cual se encuentran los anticuerpos ⁽²⁷⁾ o los antígenos, llevándose a cabo de ésta manera una adsorción pasiva durante horas e incluso durante toda una

noche, luego se lava la microplaca para eliminar todo lo que no se unió al pocillo ⁽⁴⁵⁾ y se utiliza un tampón de bloqueo ya que en este ayuda a reducir la posibilidad de reacciones inespecíficas además de proteger las moléculas fijadas al pocillo y se procede a secar la microplaca, aunque es importante aclarar que este paso es omitido en la mayoría de kits comercializados debido a que se venden prereducidos. Luego se marca el antígeno con una enzima y junto a la muestra se añade a los pocillos ya recubiertos, se incuban durante un determinado tiempo para permitir que se unan los anticuerpos a sus respectivos antígenos. Se lava la placa para evitar interferencias debido a moléculas no unidas. Se añade un agente cromógeno y el color desarrollado permite su lectura espectrofotométricamente. La cantidad de color es inversamente proporcional a la cantidad de antígeno (analito) presente en la muestra. ⁽²⁷⁾

3.9.1.1. Clasificación de las técnicas ELISA

Las técnicas de ELISA se clasifican como directas o indirectas y a la vez se pueden subclasificar en competitivas y no competitivas.

El ELISA directo es de formato no competitivo, presenta la ventaja de ser la técnica más sencilla, ⁽³⁸⁾ y más rápida, y consiste anclar el analito al pocillo que luego forma un complejo con un anticuerpo primario marcado con enzima luego el sustrato o sustancias para la detección son adicionadas para permitir una señal que puede ser leída en un espectrofotómetro. Es necesario que el antígeno esté purificado y los anticuerpos deben poderse marcar con enzimas por lo que su ejecución es limitada. ⁽²⁸⁾

En el ELISA de tipo indirecto se ancla el antígeno y éste forma un complejo con un anticuerpo primario, al que se le adiciona un anticuerpo secundario marcado con enzima el cual se utiliza para la detección del complejo formado, éste ensayo presenta la desventaja de ser inespecífico. ⁽²⁸⁾

El ELISA Sandwich es otra técnica no competitiva en la cual se ancla un anticuerpo específico, luego se adiciona la muestra que contiene el antígeno a determinar, posteriormente la cuantificación del complejo antígeno-anticuerpo se realiza mediante un anticuerpo específico que se llega a unir al antígeno, es decir, se forma un “sándwich” en donde el antígeno queda en medio de dos anticuerpos. En las técnicas no competitivas la absorbancia es directamente proporcional a la concentración del antígeno. ⁽³⁵⁾

La modalidad competitiva indirecta consiste en anclar un antígeno el cual se une durante el ensayo a los anticuerpos, pero la unión es inhibida por el antígeno presente en la solución patrón o en la muestra ⁽³⁵⁾ razón por la cual es conocida también como ELISA de inhibición, ⁽³³⁾ luego utilizando un anticuerpo secundario (que se obtiene de otra especie animal) marcado con enzima se detecta la cantidad del complejo antígeno y anticuerpo formado. La absorbancia es inversamente proporcional a la concentración del antígeno. ⁽³⁵⁾

En la técnica competitiva directa los antígenos presentes en la muestra inhiben la unión del antígeno marcado con enzima (conjugado) a los anticuerpos fijados en la los pocillos de la microplaca, siendo así la absorbancia leída inversamente proporcional a la concentración del antígeno. ⁽³⁵⁾

3.9.2. Columna de inmunoafinidad (IAC)

En los inmunoanálisis es conveniente, de ser posible, la utilización de columnas de inmunoafinidad (IAC) para la purificación parcial de las muestras. ⁽⁴⁹⁾ La función de la columna inmunoafinidad (IAC) es purificar y concentrar el analito antes de su análisis por medio de otras técnicas. ⁽³⁶⁾ En algunas literaturas para referirse al proceso de pasar la muestra por IAC se utilizan términos como inmunoextracción,

extracción en fase sólida a base de inmunoafinidad o cromatografía de inmunoafinidad sol-gel.⁽⁴²⁾

La IAC es una pequeña columna de plástico en la cual generalmente se empaquetan aproximadamente 0.2-0.5 ml de gel para realizar una extracción en fase sólida basada en inmunoafinidad (inmunoextracción).

El principio consiste en que un anticuerpo (policlonal o monoclonal) generado contra el analito es inmovilizado en el gel, la muestra con el analito es pasada a través de la columna utilizando presión positiva desde una jeringa o simplemente por gravedad, ⁽⁴²⁾ los anticuerpos capturan el analito (antígeno) y dejan pasar los demás componentes de la muestra, luego el analito es recuperado a través de una elución con un solvente adecuado (frecuentemente conocido como buffer de elución) que libera el antígeno de los anticuerpos por ruptura de sus enlaces. ⁽³⁶⁾ Muchos kits comerciales para la determinación de micotoxinas en alimentos por métodos ELISA recomiendan la utilización de columnas de inmunoafinidad para una rápida y eficaz limpieza del extracto del alimento. ⁽⁴²⁾ (Ver figura N°6)

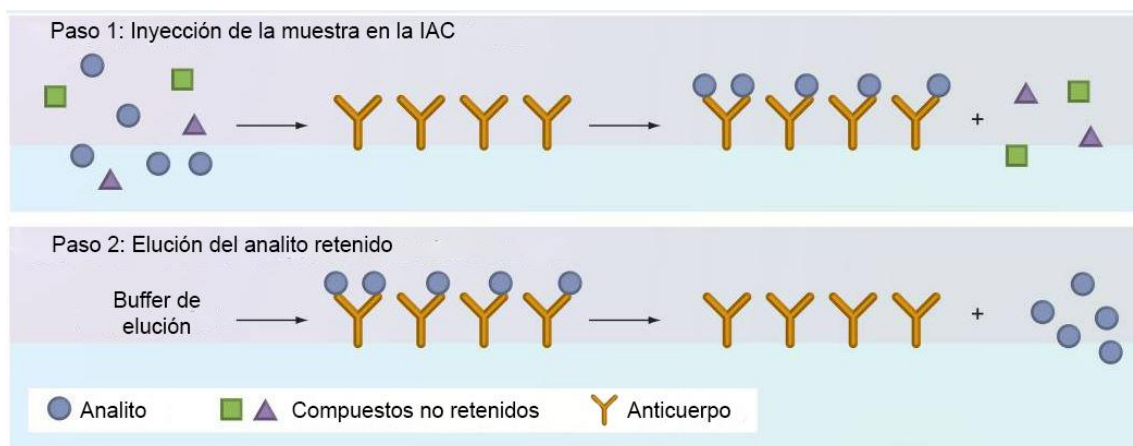


Figura N° 6. Principio de funcionamiento de IAC para purificación de analito. ⁽³⁶⁾

CAPÍTULO IV
DISEÑO METODOLÓGICO

4.0 DISEÑO METODOLÓGICO

4.1. Tipo de estudio

4.1.1. De campo:

Se realizó una visita a los supermercados del distrito 2 zona 2 de San Salvador para verificar las marcas comercializadas en los diferentes supermercados.

4.1.2. Experimental:

Se analizaron las diferentes muestras, en el laboratorio de análisis bromatológico, determinando a través de un ensayo de inmunoadsorción ligada a enzima, la presencia y concentración del contaminante Ocratoxina A.

4.1.3. Exploratorio:

Se investigó un tema que ha sido poco estudiado y para el cual en el país no se presentan estudios previos, lo que permitió conocer mejor el problema de investigación.

4.1.4. Prospectivo:

Se analizó la ocurrencia actual de OTA en cafés instantáneos comercializados en supermercados del distrito 2, zona 2 de El Salvador, los datos obtenidos podrán ser utilizados como base para futuras investigaciones.

4.2. Investigación bibliográfica

Se realizó en las siguientes bibliotecas:

- Dr. Benjamín Orozco de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador.
- Central de la Universidad de El Salvador.
- Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de El Salvador.
- Universidad Centroamericana José Simeón Cañas

- Universidad Salvadoreña Alberto Masferrer
- Internet

4.3. Investigación de campo

4.3.1. Universo

Está constituido por todas las marcas de café instantáneo puro comercializado en los supermercados del distrito 2 zona 2 de San Salvador. (Ver Anexo N°1)

4.3.2. Muestra

Se compone de las marcas de café instantáneo que se encuentran en todos los supermercados del distrito 2, zona 2 de San Salvador.

4.4. Parte experimental

4.4.1. Selección de las marcas

Se realizó una visita a los supermercados del distrito 2 zona 2, para seleccionar aquellas marcas que se encontraron en los cuatro supermercados, se recolectaron tres frascos de cada una de las marcas a analizar.

4.4.2. Material, equipo, reactivos y preparación de reactivos (Ver anexo N°2 y N°3)

4.4.3. Elaboración de la curva de calibración para la determinación de OTA

En la determinación de Ocratoxina A se utilizó el kit de estándares Neogen para Ocratoxina A los cuales se adquirieron en frascos color ámbar conteniendo diluciones de 0 ppb, 2 ppb, 5 ppb, 10 ppb, y 25 ppb listos para utilizar y realizar

la curva de calibración que se empleó en la determinación de Ocratoxina A (Ver anexo N°2).

4.4.4. Determinación de OTA en café instantáneo (Ver Anexo N°5)

Se realizó la extracción, purificación y cuantificación de cada uno de los tres frascos que se seleccionaron por marca, realizando el análisis dos veces por cada frasco recolectado, se determinó OTA por medio de una técnica ELISA competitiva directa, utilizando un kit de la marca Neogen con un límite de detección de 1 ppb. (Ver anexo N°2)

4.4.4.1. Extracción y purificación de OTA₍₄₈₎ (Ver Anexo N° 4)

1. Pesar 10 g de cada muestra.
2. Mezclar los 10 g de café instantáneo con 50 ml de una mezcla de CH₃OH / NaHCO₃ 1% (7:3) mezclar vigorosamente en un agitador magnético (600 rpm) durante 3 minutos.
3. Dejar reposar por 3 minutos (para que la muestra mezclada sedimente).
4. Filtrar el líquido sobrenadante a través de papel Whatman MN640 W ø 125mm (#5).
5. Tomar 5 ml del filtrado (equivalente a 1 g de la muestra original) y diluir con 45 ml de PBS (Buffer Fosfato Salino) / Tween (0.01% v/v) para obtener un volumen final de 50 ml.
6. Pasar 50 mL de la muestra por la columna de inmunoafinidad, utilizando una jeringa de 50 mL para generar presión positiva desde la jeringa.
7. Lavar la columna con 20 mL de PBS / Tween (0.01% v/v). No permitir que la columna se seque.

8. Lavar adicionalmente la columna de inmunoafinidad con 10 ml de PBS y asegurarse de que todo el líquido se elimine de la columna usando presión positiva desde una jeringa.
9. Eluir lentamente la OTA unida en los anticuerpos de la columna de inmunoafinidad, pasando 1 mL de metanol a través de la columna. Volver a succionar el metanol jalando el émbolo hacia arriba lenta y suavemente permitiendo que el metanol pase a través de la columna tres veces para asegurar la elución completa de la OTA unida. Recoger la OTA eluída en un vial de vidrio ámbar limpio.
10. Repetir el paso anterior utilizando 1 mL de metanol y recoger este eluyente en el mismo vial de vidrio anteriormente usado.
11. Agregar 2 ml de agua destilada a la columna y asegurarse la recuperación completa de este volumen al forzar el aire a través de la columna por medio de presión ejercida desde una jeringa. Recoger este eluyente en el mismo vial de vidrio de los pasos anteriores, el volumen total será de 4 mL el cual está listo para ser analizado por el método ELISA.

4.4.4.2. Cuantificación de OTA por el método ELISA ⁽⁴⁸⁾ (Ver Anexo N° 4)

1. El kit debe permanecer almacenado a temperaturas entre 2–8°C cuando no esté en uso (sin llegar a congelar). Antes de usarlos, llevar todos los reactivos a temperatura ambiente (18–30°C).
2. Asegurarse de que muestra se encuentre en un pH entre 6 – 8.
3. Retirar 1 pozo de mezclado marcado con rojo para cada muestra que se va a analizar más 5 pozos para controles marcados con rojo y colocarlos en el portapozos.
4. Retirar un número igual de pozos recubiertos con anticuerpos.

5. Marcar un extremo de la tira con un "1" utilizando un marcador negro y luego colocar la tira en el portapozos con el extremo marcado al lado izquierdo. No marcar el interior o el fondo de los pozos.
6. Mezclar cada reactivo agitando cada frasco de reactivo en forma circular antes de usarlo.
7. Colocar 100 μ L de conjugado del frasco con etiqueta azul en cada pozo de mezclado marcado de rojo.
8. Utilizando una punta de pipeta nueva para cada pocillo, transferir 100 μ L de controles y muestras a los pocillos rojos para mezclarlos. El orden será primero el estándar negativo (0 ppb), luego el de 2 ppb, 5 ppb, 10 ppb, 25 ppb y luego las muestras (asegurarse de anotar el orden en el cual se colocan las muestras).
9. Utilizando una pipeta de 12 canales, mezclar el líquido en los pocillos pipeteándolo hacia arriba y hacia abajo 3 veces.
10. Transferir 100 μ L de los pozos rojos a los pozos recubiertos de anticuerpos cuidando de no tocar el fondo de los pocillos con las puntas. Mezclar deslizando hacia atrás y hacia adelante el portapozos sobre una superficie plana durante 10–20 segundos sin salpicar los reactivos de los pozos. Incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente (18–30 °C). Desechar los pozos de mezclado marcados con rojo.
11. Desechar el contenido de los pocillos y llenarlos con 300 μ L de agua destilada o desionizada y descartarlos. Repetir 5 veces este paso, luego voltear los pozos hacia abajo y golpear suavemente sobre una toalla de papel hasta que se retire toda el agua restante.
12. Verter el volumen necesario de sustrato (del frasco con etiqueta verde) a la cubeta de reactivo correspondiente.
13. Con puntas nuevas en la pipeta de 12 canales, ambientar y pipetear 100 μ L de sustrato dentro de los pozos. Mezclar deslizando hacia atrás y hacia adelante sobre una superficie plana durante 10–20 segundos.

14. Incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente. (Desechar el sustrato restante en la cubeta de reactivo, la cual luego debe ser lavada).
15. Verter la solución STOP del frasco con etiqueta roja dentro de la cubeta de reactivo correspondiente.
16. Sacar el excedente de sustrato de la pipeta de 12 canales, ambientar las puntas y pipetear 100 μ L de Solución STOP a cada pozo. Mezclar deslizando hacia atrás y hacia adelante sobre una superficie plana. Desechar las puntas.
17. Limpiar el fondo de los pocillos (por fuera) con un paño o toalla secos, eliminar las burbujas de aire, ya que pueden afectar los resultados analíticos y leer en un lector de microplacas con un filtro de 650 nm. Los resultados se deben leer dentro de los siguientes 20 minutos después de agregar la solución STOP.

Nota: La metodología utilizada presenta ligeras variaciones respecto a la metodología original del kit para OTA del fabricante, lo anterior debido a que originalmente no se contempla en el instructivo del kit, la utilización de columnas de inmovilización, sin embargo, el fabricante comercializa también las columnas que se utilizaron en el análisis.

4.4.4.3. Análisis de datos

Los resultados obtenidos fueron sometidos a un análisis de datos, aplicando la prueba t-student, para su posterior comparación con el reglamento (CE) N°123/2005 de la Comisión de las Comunidades Europeas para OTA. (Ver anexo N°6) el cual establece que el límite para la cantidad de OTA permitida en muestras de café instantáneo es de 10 ppb, se plantearon las siguientes hipótesis estadísticas:

Hipótesis nula $H_0: \mu = 10$ ppb

Hipótesis alterna $H_1: \mu > 10$ ppb

Refiriéndose así la hipótesis nula al cumplimiento de la normativa para OTA en café instantáneo, mientras que la hipótesis alterna comprende todos los valores de OTA que se encuentren fuera del límite.

CAPÍTULO V
RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

5.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5.1 Selección de las marcas

Antes de empezar el análisis de OTA el primer paso fue llevar a cabo un adecuado muestreo, y luego se realizó un pretratamiento que consistió en homogenizar la muestra. Para realizar el muestreo primeramente se visitaron los supermercados del distrito 2 zona 2 a fin de conocer las marcas comercializadas en cada uno de ellos generando un listado de 12 marcas, como herramienta para identificar las que se encontraban en los cuatro supermercados.

Se utilizó un muestreo aleatorio simple, recolectando tres (3) frascos de café por cada marca, totalizando 18 muestras, lo anterior debido a que se planteó la utilización de la t-student asumiendo una tendencia normal de los datos. La t-student permite analizar muestras con un tamaño menor a 30 cuando no es posible obtener muestras grandes debido a razones de costo y se requiere utilizar una distribución de probabilidad que permita hacer estimaciones confiables. ⁽¹⁾

En la tabla N°6 se presentan las marcas observadas en la visita realizada en noviembre de 2018.

Tabla N° 6. Marcas de café instantáneo encontradas en los supermercados del distrito 2 zona 2 de San Salvador.

Supermercado Marca	Despensa de Don Juan	Super Selectos Metro Sur	Super Selectos sexta etapa	Super Selectos octava etapa
Listo	x	x	x	x
Nescafé	x	x	x	x
Coscafé	x	x	x	x
Musun	x	x	x	x
Juan Valdez	x	x	x	x

Tabla N° 6. Continuación

Supermercado Marca	Despensa de Don Juan	Super Selectos Metro Sur	Super Selectos sexta etapa	Super Selectos octava etapa
Colcafé	x	x	x	x
Aroma	x		x	x
Dany		x	x	x
Selectos		x	x	x
Suli	x			
Rico		x		
Folgers				x

De las marcas observadas sólo seis se encuentran presentes en todos los supermercados visitados, las que se resaltan en la Tabla N° 1, siendo estas: Listo, Nescafé, Coscafé, Musun, Juan Valdez y Colcafé, las cuales fueron seleccionadas para la determinación de Ocratoxina A en café instantáneo.

Se observó que en los supermercados se encuentran disponibles en mayor cantidad las marcas extranjeras frente a las nacionales. (Ver Tabla N°7)

Tabla N° 7. Marcas seleccionadas para el estudio y su país de procedencia.

Marca	País de Procedencia
Listo	Brasil
Nescafé	México
Coscafé	El Salvador
Musun	México
Juan Valdez	Colombia
Colcafé	Colombia

5.2 Determinación de OTA en café instantáneo

Las muestras fueron rotuladas y trasladadas al laboratorio de análisis bromatológico de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador, en donde se realizó el siguiente proceso:

a) Elaboración de la curva de calibración

En la tabla N°8 se presentan las lecturas correspondientes a las densidades ópticas de los estándares de 0 ppb, 2 ppb, 5 ppb, 10 ppb y 25 ppb a 620 nm en el lector de microplacas ELx800, las cuales sirvieron para elaborar la curva de calibración (Ver figura N°7), de modo que, se determinó la relación funcional existente entre las concentraciones y las densidades ópticas con un coeficiente de correlación $R^2 = 0.9886$ a partir de la curva de calibración el software Veratox de Neogen estimó las concentraciones de las muestras a partir de las lecturas de densidades ópticas obtenidas.

Tabla N° 8. Resultados de lecturas de las densidades ópticas de estándares para la elaboración de la curva de calibración.

Concentración (ppb)	Densidad óptica
0	0.388
2	0.362
5	0.331
10	0.289
25	0.186

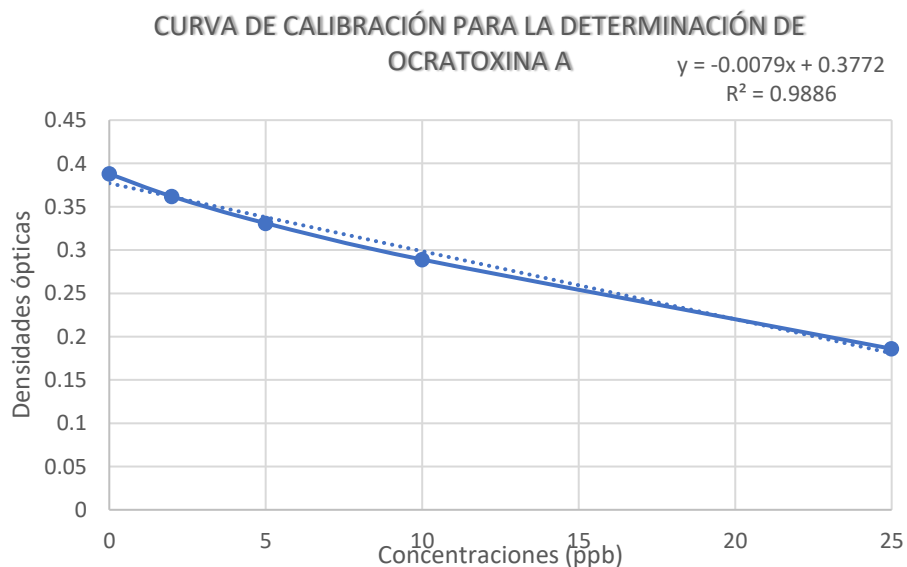


Figura N°7. Curva de calibración de los estándares de Ocratoxina A.

b) Extracción y purificación de OTA (Ver Anexo N° 4)

Siguiendo los procesos para la determinación de OTA se realizó la extracción de la micotoxina de la matriz en estudio, el café instantáneo, a través de un solvente adecuado. Los solventes orgánicos y el agua (o mezclas de los dos) son usualmente utilizados para la extracción de OTA del café instantáneo, es muy común utilizar soluciones acuosas de metanol y bicarbonato ya que la solubilidad de la OTA aumenta bajo condiciones de pH alcalino, además estudios han demostrado que el bicarbonato de sodio usado en concentraciones que van desde 1-5% disminuye la probabilidad de extraer otros componentes interferentes para el análisis.

En el método inicial a utilizar no se contemplaba el uso de una columna de inmunoafinidad (IAC) pero es sabido que en los análisis de micotoxinas el uso de IAC se ha convertido en el método de elección para la limpieza, purificación y

concentración del analito, esta limpieza permite realizar una separación preliminar de la OTA de otros componentes que podrían haberse extraído junto a ella e interferir en el análisis. La columna de inmovilización para Ocratoxina A de la marca Neogen fue lavada con un buffer de fosfato salino (PBS) que favorece la eliminación de cualquier componente interferente que permanezca en el gel de la columna, otra razón de usar PBS es mantener condiciones de isotonicidad lo cual favorece las reacciones entre antígenos y anticuerpos. En ocasiones se pueden utilizar detergentes junto a los tampones de lavado, siendo el más utilizado el Tween-20 a una concentración del 0.05%, debido a que los detergentes iónicos pueden desnaturalizar los epítomos. La elución del analito en moléculas pequeñas suele realizarse con metanol, solvente que fue utilizado como “buffer de elución” para la OTA. Luego de estos procesos se continuó con la cuantificación de la OTA por el método ELISA competitivo directo.

c) Cuantificación de OTA en café instantáneo (Ver Anexo N° 4)

En el análisis de moléculas pequeñas, como es el caso de la OTA, que pueden tener sólo un epítomo disponible se usan para su determinación inmunoensayos de tipo competitivo. En los inmunoensayos competitivos además del anticuerpo específico y el antígeno (en este caso la OTA) se tiene un trazador que es el mismo analito marcado con enzima (esta enzima es la que genera la señal) siendo conocido también como conjugado enzimático.

Se realizó una premezcla de las muestras y estándares con el conjugado enzimático en los pocillos color rojo los cuales no contienen anticuerpos, luego de homogenizar la muestra se traslada a los pocillos con anticuerpos.

En esta fase de la técnica se ancla, a través de adsorción, el anticuerpo al fondo del pocillo y tanto el analito como el conjugado enzimático compiten por los sitios de unión de los anticuerpos (Ver Figura N° 8)

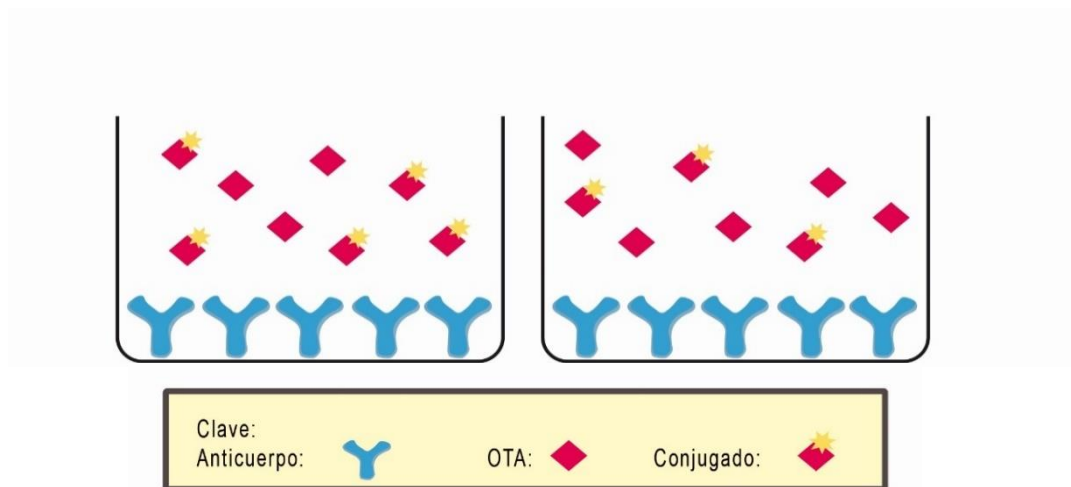
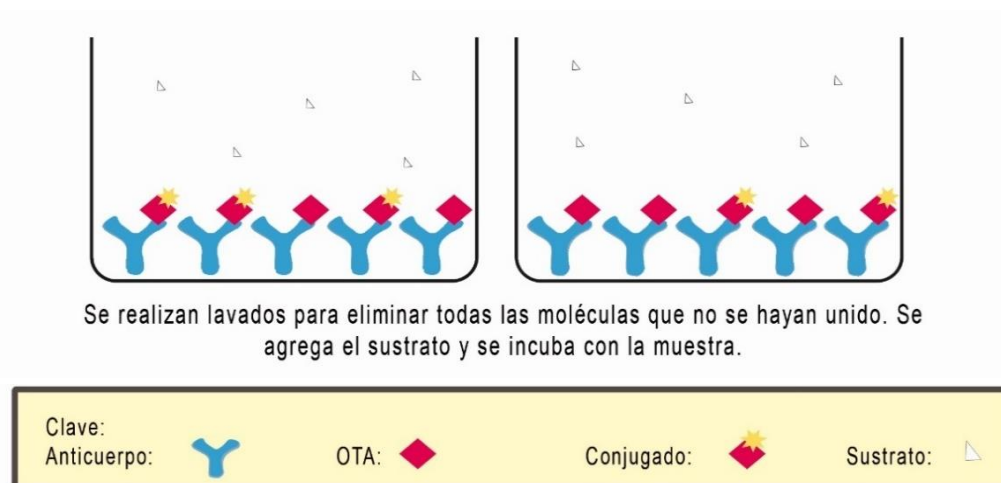


Figura N° 8 La OTA y el conjugado compiten por los sitios de unión en los anticuerpos previamente fijados al pocillo.

Posteriormente los pocillos son lavados para eliminar todas aquellas moléculas no unidas a los anticuerpos, usualmente inundar los pocillos y luego desechar el agua contenida es suficiente. Luego se adiciona un sustrato (Ver Figura N°9) el cual reacciona con la enzima del conjugado produciendo (para el análisis de OTA) una coloración la cual es medible y es proporcional a la cantidad de conjugado unido los anticuerpos.



Se realizan lavados para eliminar todas las moléculas que no se hayan unido. Se agrega el sustrato y se incuba con la muestra.

Figura N° 9. Lavados realizados para eliminar posibles interferentes y adición del sustrato.

Después de un tiempo de desarrollar el color se utiliza una solución de parada, así la reacción enzimática con el sustrato es detenida, evitándose que siga cambiando el color esto usualmente se realiza cambiando el pH mediante la adición de un ácido. Finalmente se determina la concentración del analito a partir de la señal producida, si la concentración de analito es alta se unirán más moléculas del analito a los anticuerpos y se unirán menos moléculas de conjugado enzimático de esta forma al adicionar el sustrato producirá una menor señal de color, caso contrario si la concentración de analito en la muestra es pequeña la cantidad de conjugado enzimático unido será mayor y se producirá un mayor cambio de color, por lo tanto el cambio de color será inversamente proporcional a la cantidad de analito en la muestra. (Ver Figura N°.10)

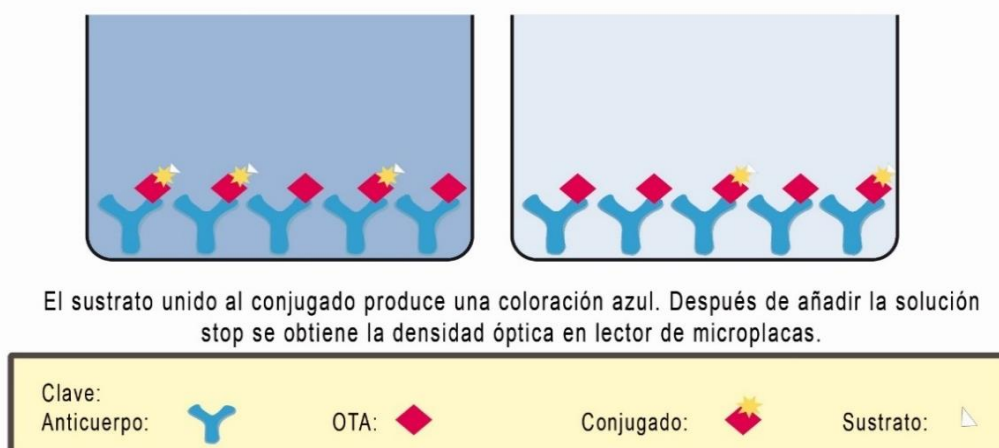


Figura N° 10. Determinación de OTA a través de la reacción colorimétrica.

El tipo de espectrofotómetro utilizado para cuantificar la concentración del analito a partir del color es conocido como lector de microplacas. La señal obtenida fue leída colorimétricamente como densidad óptica.

Tabla N° 9. Resultados del contenido de Ocratoxina A en café instantáneo para las seis marcas analizadas del distrito 2, zona 2 de San Salvador.

Marca	Muestra	Densidad óptica	Lectura (ppb)	Límite permitido de OTA en café instantáneo (UE)
Listo	A1	0.691	< 1	10 ppb
		0.720	< 1	
	A2	0.427	< 1	
		0.364	< 1	
	A3	0.655	< 1	
		0.676	< 1	
Nescafé	B1	0.571	< 1	
		0.615	< 1	
	B2	0.485	< 1	
		0.474	< 1	
	B3	0.538	< 1	
		0.581	< 1	
Coscafé	C1	0.650	< 1	
		0.824	< 1	
	C2	0.538	< 1	
		0.581	< 1	
	C3	0.664	< 1	
		0.508	< 1	
Musun	D1	0.526	< 1	
		0.601	< 1	
	D2	0.545	< 1	
		0.421	< 1	
	D3	0.397	< 1	
		0.340	< 1	
Colcafé	F1	0.584	< 1	
		0.447	< 1	
	F2	0.499	< 1	
		0.561	< 1	

Tabla N° 9. Continuación.

Marca	Muestra	Densidad óptica	Lectura (ppb)	Límite permitido de OTA en café instantáneo (UE)
Colcafé	F3	0.454	< 1	10 ppb
		0.446	< 1	
Juan Valdez	E1	0.517	< 1	
		0.552	< 1	
	E2	0.701	< 1	
		0.538	< 1	
	E3	0.481	< 1	
		0.525	< 1	

En la medición colorimétrica, se registra el valor de la sensibilidad óptica del color producido en la reacción enzimática, esta medición se realiza a través de la densidad óptica (DO). En base a los datos obtenidos, se utilizó la curva de calibración para estimar la concentración de las muestras.

En la tabla N°9 se reflejan valores menores a 1 ppb para las concentraciones en todas las marcas, debido a que la OTA no fue detectada en ninguna de las muestras estudiadas ya que el límite de detección con el kit de análisis Neogen Veratox para Ocratoxina y los estándares de OTA utilizados es de 1 ppb.

5.3 Análisis estadístico de datos

Según la normativa de la Comisión de las Comunidades Europeas (CE) N° 123/2005 (anexo N°5) la OTA presente en el café instantáneo no debe ser mayor a 10 ppb. En relación a lo anterior se plantearon las siguientes hipótesis estadísticas:

Hipótesis nula $H_0: \mu = 10 \text{ ppb}$

Hipótesis alterna $H_1: \mu > 10 \text{ ppb}$

Las distribución utilizada fue la t- student de una muestra en la que se comparan los resultados obtenidos contra un valor objetivo, el cual para el caso corresponde al límite establecido por la Unión Europea para OTA en café instantáneo, es decir, 10 ppb.

La hipótesis alterna fue planteada teniendo en cuenta que se requiere evaluar el riesgo existente, por lo que nos interesa conocer si la concentración media de OTA en café instantáneo supera las 10 ppb, cabe destacar que la hipótesis nula fue planteada como la media igual a 10 ppb por razones estadísticas, ya que se analizó si la media se encuentra en el valor objetivo (el límite establecido en la referencia) o es mayor a este, de esta forma la hipótesis nula se refiere al cumplimiento de la normativa para OTA mientras que la alterna comprende todos los valores que de OTA que se encuentren fuera del límite.

Según los resultados obtenidos en el ensayo la media no es mayor que el valor objetivo correspondiente al límite de OTA en muestras de café instantáneo (10 ppb), ya que para la determinación realizada en todas las marcas la OTA fue menor a 1 ppb y aunque se deseaba detectar si la media era mayor que el valor objetivo o el valor de referencia, los datos sugieren que realmente es menor que 10 ppb, por tanto se acepta la hipótesis nula, que matemáticamente se expresa como $\mu = 10$ ppb sin embargo debe interpretarse este resultado como el cumplimiento del criterio de aceptación planteado por la Unión Europea.

En vista de que se acepta la hipótesis nula no es preciso analizar los datos mediante cálculos estadísticos para realizar las pruebas de hipótesis, evidenciándose por lo tanto, que las muestras analizadas no representan un riesgo para la salud.

5.4 Recuperación de Ocratoxina A

En vista de los resultados obtenidos en los análisis de determinación de Ocratoxina A, se realizó un segundo análisis con dos muestras de café siendo estas de la marca Juan Valdés y Coscafé a las cuales se les realizó el mismo procedimiento con la diferencia que las muestras fueron contaminadas inicialmente con 1.2 mL de estándar de Ocratoxina A de 25 ppb para añadir teóricamente una cantidad de 0.03 μg lo que equivaldría a tener una muestra de 10 g de café instantáneo con 3 ppb de OTA.

Luego de realizar la extracción y purificación de la OTA se procedieron a realizar los análisis obteniéndose las siguientes lecturas:

Tabla N° 10. Recuperación de OTA en muestras contaminadas con OTA.

Muestra contaminada	Densidad óptica	Lectura	Recuperación
Juan Valdez	0.330	2.787	92.90 %
Colcafé	0.329	2.923	97.43 %

En el ensayo realizado se obtuvieron valores de recuperación superiores al 90% (Ver tabla N°10), de forma que los resultados sugieren que el método llevado a cabo para la determinación de OTA es funcional para la extracción, purificación y cuantificación de Ocratoxina A en muestras de café instantáneo por lo anterior se tiene mayor confiabilidad en los resultados obtenidos.

5.5 Comparación de resultados con la normativa europea

En el análisis estadístico se determinó que la media no es significativamente mayor que el valor de 10 ppb, por lo anterior, se acepta la hipótesis nula y en consecuencia se sabe que las muestras analizadas en esta investigación cumplen con la normativa de la Comisión de las Comunidades Europeas (CE) N° 123/2005 (anexo N°5) la cual establece que la concentración de Ocratoxina A (OTA) no debe ser mayor a 10 ppb en café instantáneo.

En los resultados obtenidos no existe una diferencia significativa entre la cantidad de OTA en café instantáneo de procedencia extranjera frente a la marca nacional analizada. Asimismo, no se observó influencia del punto de muestreo, debido a que se analizaron las mismas marcas en los supermercados estudiados, cabe mencionar además que no es posible que se produzcan micotoxinas luego del envasado del café instantáneo, a causa de que no existen las condiciones adecuadas para la proliferación de hongos productores de OTA.

Por lo tanto en esta investigación no se asoció el consumo de café instantáneo con un riesgo toxicológico por ingesta de OTA, sin importar la procedencia del producto por lo que es probable que el café instantáneo comercializado en El Salvador no contribuya significativamente en la ingesta diaria de OTA y por lo tanto no constituya una fuente de esta micotoxina en la dieta.

CAPÍTULO VI
CONCLUSIONES

6.0 CONCLUSIONES

1. Las marcas seleccionadas para la investigación fueron Listo, Nescafé, Coscafé, Musun, Juan Valdez y Colcafé, debido a que se encontraban presentes en todos los supermercados, se observó entre las muestras una mayor presencia de marcas extranjeras.
2. En los resultados obtenidos no existió una diferencia significativa entre la cantidad de OTA en muestras de café instantáneo de procedencia extranjera frente a la marca nacional analizada (Coscafé).
3. La utilización de columnas de inmunoafinidad fue necesaria en la determinación de Ocratoxina A en café instantáneo, para realizar la concentración y purificación del analito, lo anterior a fin de eliminar interferentes que pueden resultar en falsos positivos para el análisis.
4. En las marcas estudiadas, debido al secado realizado durante el procesamiento del café no existe posibilidad de que el producto terminado y adecuadamente envasado sea contaminado con OTA ya que no se encuentran las condiciones adecuadas para la proliferación de hongos productores de micotoxina.
5. Debido a que los resultados obtenidos en los análisis reflejaron concentraciones menores a 1 ppb, se acepta la hipótesis nula, que plantea el cumplimiento a la normativa de la Comisión de las Comunidades Europeas para Ocratoxina A (OTA) en café instantáneo (CE) N°123/2005.
6. Ninguna de las muestras analizadas supera los límites establecidos por la Unión Europea para el contenido máximo de Ocratoxina A en café instantáneo (10 ppb).

CAPÍTULO VII
RECOMENDACIONES

7.0 RECOMENDACIONES

1. Lavar bien la columna de inmunoafinidad (IAC) con la solución de lavado recomendada de PBS/Tween (0.01%) a fin de eliminar del gel cualquier otra molécula no unida a los anticuerpos que al ser recuperada en la elución de la OTA pueda generar falsos positivos en los análisis.
2. Utilizar un frasco ámbar para la recolección de la OTA eluida de la columna de inmunoafinidad (IAC), debido a que la OTA es sensible a la luz y al salir de la columna purificada no existen pigmentos ni otras sustancias que la protejan de la luz.
3. Que se considere la utilización de estándares con concentraciones de OTA menores a las utilizadas en futuras investigaciones, para tener una curva de calibración más amplia que permita la cuantificación de cantidades aún más pequeñas de OTA, utilizando asimismo un software que permita analizar los datos estimando concentraciones a partir de una mayor cantidad de estándares.
4. Que en futuras investigaciones se determinen otros contaminantes que podrían estar presentes en el café instantáneo, tales como la acrilamida, metales pesados, residuos de pesticidas y furano, teniendo así estudios que permitan elaborar el perfil respecto a la calidad e inocuidad del café instantáneo en el país.
5. En futuras investigaciones realizar el análisis para la determinación de Ocratoxina A utilizando cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) para detectar las trazas de ocratoxina A, ya que en la metodología utilizada no se detectaron concentraciones menores de 1 ppb, no obstante al ser la Ocratoxina A un contaminante natural en café instantáneo no se descarta la posibilidad de que se encontrase en cantidades menores al límite de detección.

BIBLIOGRAFIA

1. Acuña, J. (2009). Control de calidad : Un enfoque integral y estadístico. (págs. 63-65) Cartago: Tecnológica de Costa Rica
2. Alcaldía de San Salvador. (8 de Mayo de 2009). Distrito Municipal 2. Recuperado el 22 de Febrero de 2018, de <https://alcaldiass.wordpress.com/2009/05/08/distrito-municipal-2/>
3. Ávalos, C., Guillermo, R., & Chávez, M. (2017). Diseño de plan de marketing digital, caso práctico: Consejo Salvadoreño del Café. San Salvador: Universidad de El Salvador, Facultad de Química y Farmacia.
4. Bateman, H., Hillmore, R., Jackson, D., & Luszkat, S. (2005). Dictionary of Medical Terms. London: A & C Black Publishers Ltd.
5. Batista, L., Chalfoun de Souza, S., Silva, C., & Schwan, R. (2016). Coffee: Types and Production. En B. Caballero, P. Finglas, & F. Toldrá, Encyclopedia of Food and Health (págs. vol. 2. 244, 246). Kidlington: Elsevier.
6. Blanc, M., Pittet, A., Muñoz-Box, R., & Viani, R. (1998). Behavior of Ochratoxin A during Green Coffee Roasting and Soluble Coffee Manufacture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(2), 673-675.
7. Bryden, W. (2011). Mycotoxins: Natural Food Chain Contaminants and Human Health. Elsevier, 898-905.
8. Caballero Torres, Á. E. (2008). Micotoxinas en alimentos. En Temas de higiene de los alimentos (págs. 109-110). La Habana: Ciencias Médicas.
9. Casal, S., Vieira, T., Cruz, R., & Cunha, S. C. (2014). Ochratoxin A in commercial soluble coffee and coffee substitutes.

10. Chan, C. Y., & Kelman, B. J. (2015). Mycotoxins. En R. D. Harbison, M. M. Bourgeois, & G. T. Johnson, Hamilton & Hardy's Industrial Toxicology (Sexta ed., pág. 1286). New Jersey, United States of America: John Wiley & Sons.
11. Clarke, R. J. (2003). Coffee. En B. Caballero, Enciclopedia of Food Sciences and nutrition (págs. 1490, 1495-1498). Academic Press.
12. Comisión de las Comunidades Europeas. (26 de Enero de 2005). Reglamento (CE) N° 123/2005. Recuperado el 7 de Abril de 2018, de Diario Oficial de la Unión Europea: http://www.ico.org/projects/Good-Hygiene-Practices/cnt/cnt_sp/sec_2/docs_2.2/Reg%20CE%20123-2005.pdf
13. Comisión del codex alimentarius. (marzo de 1999). Documento de posición sobre la Ocratoxina A. Recuperado el 6 de Abril de 2018, de FAO: http://www.fao.org/tempref/codex/Meetings/CCFAC/CCFAC31/FA99_14S.pdf
14. Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA). (2007). Ochratoxin A. Recuperado el 7 de Abril de 2018, de <http://apps.who.int/food-additives-contaminants-jecfa-database/chemical.aspx?chemID=1905>
15. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). (2003). Estándares de calidad para el café de comercialización nacional e internacional. NSO 67.31.01:03. Recuperado el 23 de Marzo de 2018, de Defensoria del consumidor: <https://www.defensoria.gob.sv/images/stories/varios/NORMAS/CAFE/EDICIONFINALCAFEVERDE.pdf>
16. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). (2004). Estándares de calidad. Café soluble instantáneo. NSO 67.31.03:04. Recuperado el 16 de Enero de 2018, de <https://www.defensoria.gob.sv/images/stories/varios/NORMAS/CAFE/CAFE%20SOLUBLE%20INSTANTANEO.pdf>

17. Defensoría del consumidor. (15 de 04 de 2008). PNUD El Salvador. Recuperado el 23 de 01 de 18, de Perfil del consumidor salvadoreño en el siglo XXI.
18. El Diario de Hoy. (17 de Junio de 2008). El 60% de la población consume café soluble. Recuperado el 19 de Enero de 2018, de elsalvador.com: http://archivo.elsalvador.com/mwedh/nota/nota_completa.asp?idCat=6374&idArt=2613211
19. Esquivel, P., & Jiménez, V. (2012). Functional properties of coffee and coffee by-products. *Food Research International* (46), 488-495.
20. Farah, A., & Ferreira dos Santos, T. (2015). The Coffee Plant and Beans: An Introduction. En V. Preedy, *Coffee in Health and Disease Prevention* (págs. 5 - 7). Kidlington, Reino Unido: El Sevier.
21. Federación Nacional de Cafeteros de Colombia. (2010). *Café de Colombia*. Recuperado el 14 de enero de 2018, de Producción de Café Soluble: http://www.cafedecolombia.com/particulares/es/sobre_el_cafe/el_cafe/industrializacion/produccion_de_cafe_soluble/
22. Federación Nacional de Cafeteros de Colombia. (2010). *Defectos de Café Verde*. Recuperado el 5 de Agosto de 2018, de *Café de Colombia*: http://www.cafedecolombia.com/particulares/es/regulacion_nacional/exportadores/2831_calidades_de_exportacion/
23. Frazier, W. C., & Westhoff, D. C. (1993). Envenenamientos, infecciones e intoxicaciones de origen alimentario, de etiología no bacteriana, micotoxinas: ocratoxina A. En *Microbiología de los alimentos*. Zaragoza, España: Acribia.

24. Galarce-Bustos, O., Alvarado, M., Vega, M., & Aranda, M. (2014). Occurrence of ochratoxin A in roasted and instant coffees in Chilean market. *Food control* (46), 102-107. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.05.014>
25. González Salgado, A. (2009). Diagnóstico y control de especies de *Aspergillus* productoras de ocratoxina A. Madrid: Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de genética.
26. Gopinandhan, T. N., Basavaraj, K., & Raghuramulu, Y. (Junio de 2013). Ochratoxin A (OTA) contamination in coffee - A revisit. *Indian coffee*, 21.
27. He, J. (2013). Practical guide to ELISA development. En D. Wild, *The Immunoassay Handbook Theory and Applications of Ligand Binding, ELISA and Related Techniques* (pág. 381). Oxford: Elsevier.
28. Hosseini, S., Vázquez-Villegas, P., Rito-Palomares, M., & Martínez-Chapa, S. O. (2018). Different Protocols. En *Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) From A to Z* (págs. 39-40, 42-47). Monterrey, Mexico: Springer.
29. Hsieh, Y.-H. P., & Rao, Q. (2017). Immunoassays. En S. S. Nielsen (Ed.), *Food Analysis* (Fifth ed., págs. 487-496). Switzerland: Springer.
30. Huang, M., & Zhang, M. (2013). Tea and coffee powders. En *Handbook of Food Powders: Processes and Properties* (págs. 513-526). Philadelphia, USA: Elsevier.
31. International Agency for Research on Cancer (IARC). (1993). Ochratoxin A. Recuperado el 29 de Enero de 2018, de Monographs: <https://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol56/mono56-18.pdf>
32. International Programme on Chemical Safety (IPCS). (1979). Mycotoxins. Recuperado el 4 de 1 de 2018, de INCHEM: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc011.htm>

33. Lee, N. A., & Kennedy, I. R. (2007). Immunoassays. En Y. Picó, Food Toxicants Analysis Techniques, Strategies and Developments (Primera ed., págs. 91-145). Kidlington: Elsevier.
34. Malir, F., Ostry, V., Pfohl-Leszkowicz, A., Malir, J., & Toman, J. (2016). Ochratoxin A: 50 Years of Research. 8.
35. Marín Villa, H., & Apicella Pabón, G. (Octubre de 1994). Métodos Inmunoquímicos aplicados al análisis de Micotoxinas. Revista de la Facultad de Ciencias, 105-118.
36. Moser, A. C., & Hagecorresponding, D. S. (1 de Febrero de 2010). Immunoaffinity chromatography: an introduction to applications and recent developments. Recuperado el 21 de Abril de 2018, de National Center for Biotechnology Information: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2903764/>
37. Murray, P. R., Rosenthal, K. S., & Pfaller, M. A. (2014). Micotoxinas y micotoxicosis. En Microbiología médica. Barcelona, España: Elsevier.
38. O'Kennedy, R., & Murphy, C. (2017). Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). En Immunoassays Development, Applications and Future Trends (págs. 395-405). USA: Pan Stanford Publishing.
39. Organización de la Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). (2009). Código de prácticas para prevenir y reducir la contaminación de Ocratoxina A en el café. Recuperado el 8 de Abril de 2018, de www.fao.org/input/download/standards/11250/CXP_069s.pdf
40. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). (Diciembre de 2000). The Coffee Tree. (J. Mutua, Editor) Recuperado el 23 de Marzo de 2018, de Post Harvest Handling and processing of coffee in african countries: <http://www.fao.org/docrep/003/x6939e/x6939e01.htm>

41. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). (2006). Un café más sano. Recuperado el 14 de enero de 2018, de Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura: <http://www.fao.org/ag/esp/revista/0607sp1.htm>
42. Senyuvaa, H. Z., & Gilbert, J. (2010). Immunoaffinity column clean-up techniques in food analysis: A review. *Journal of Chromatography B(878)*, 115-132. doi:10.1016/j.jchromb.2009.05.042
43. Taniwaki, M. H. (2006). An update on ochratoxigenic fungi And Ochratoxin A in coffee. En A. D. Hocking, J. I. Pitt, & R. A. Samson, *Advances in food mycology* (págs. 196-199). United States of America: Springer.
44. United States National Toxicology Program. (2011). Ochratoxin A. Recuperado el 5 de 1 de 2018, de Department of Health and Human Services. Report On Carcinogens: Carcinogen Profiles: <https://ntp.niehs.nih.gov/ntp/roc/content/profiles/ochratoxina.pdf>
45. Vashist, S. K., & Luong, J. H. (2018). En *Handbook of Immunoassay Technologies* (págs. 8, 97-99). Academic Press.
46. Vecchio, A., Mineo, V., & Planeta, D. (2012). Ochratoxin A in instant coffee in Italy. *Food Control*, 28(2), 220-223. doi:10.1016/j.foodcont.2012.04.029
47. Velmourougane, K., Gopinandhan, T. N., & Bhat, R. (2014). Application of Hazard Analysis and Critical Control Point Principles for Ochratoxin-A Prevention in Coffee Production Chain. En R. Bhat, & V. M. Gómez-López, *Practical Food Safety: Contemporary Issues and Future Directions* (Primera ed., págs. 577-592). West Sussex, UK: John Wiley & Sons.
48. Veratox, Inserto de kit de análisis de ocratoxina por el método ELISA competitivo directo.

49. Vettorazzi, A., & López de Cerain, A. (2016). Mycotoxins as Food Carcinogens. En C. Viegas, A. C. Pinheiro, R. Sabino, S. Viegas, J. Brandão, & C. Veríssimo, Environmental Mycology in Public Health: Fungi and Mycotoxins Risk Assessment and Management (págs. 264, 281-287,372). London: Elsevier.

50. World Health Organization. (Septiembre de 2019). Preamble to the IARC Monographs (amended January 2019). Obtenido de IARC Monographs on the identification of carcinogenic hazards to humans: <https://monographs.iarc.fr/wp-content/uploads/2019/07/Preamble-2019.pdf>

GLOSARIO

Café instantáneo: El café instantáneo es el polvo o granulado que queda luego de que al extracto de café se le ha retirado el agua. A diferencia del café tostado, cuando es empacado en un recipiente hermético, es estable y puede mantener su calidad durante muchos meses e incluso años pues es menos vulnerable a procesos de oxidación. Se prepara muy fácilmente con sólo adicionarle agua o leche sin necesidad de máquinas con filtros o alta presión. ⁽²¹⁾

Carcinógeno: Causante de un carcinoma o cáncer. ⁽⁴⁾

Columna de inmunoafinidad: Es una pequeña columna de plástico en la cual generalmente se empaquetan aproximadamente 0,2-0,5 ml de gel para realizar una extracción en fase sólida basada en inmunoafinidad (inmunoextracción), su función es purificar y concentrar el analito antes de su análisis. ⁽³⁶⁾

Curva de calibración: Es una relación funcional entre la concentración de analito en los estándares (calibradores) y la respuesta medida. La curva de calibración se usa para estimar la concentración de analito en muestras de prueba por interpolación. Es un sinónimo de curva estándar. ⁽³⁸⁾

Densidad óptica: Es la medición de la cantidad de atenuación o intensidad perdida cuando la luz pasa a través de un componente óptico, la cual puede ser una suma de la absorción, dispersión y reflexión. ⁽²⁸⁾

Epítopo: Es la zona o región específica del antígeno que es capaz de activar una respuesta inmunológica, es decir, es el sitio del antígeno que se une al anticuerpo. ⁽²⁸⁾

Falso positivo: Es el resultado positivo que se obtiene al analizar una muestra que verdaderamente debería ser negativa. ⁽³⁸⁾

Hepatotóxico: Que destruye las células del hígado. ⁽⁴⁾

Inmunoensayo: Es una prueba científica cualitativa o cuantitativa para medir la cantidad, la actividad funcional o la identidad de un analito en el que se incorporan anticuerpos en pasos clave para la cuantificación del analito objetivo. ⁽³³⁾

Inmunosupresor: Actúa contra la respuesta del sistema inmunitario. Suprime el sistema inmunológico natural del cuerpo. ⁽⁴⁾

Interferencia: Presencia de entidades en muestras que impiden que el analito objetivo sea detectado o cuantificado con precisión. Es un sesgo significativo en la concentración de analito medida debido al efecto de otro componente o propiedades de la muestra o matriz. ⁽³⁸⁾

Nefrotóxico: Venenoso o dañino para las células renales. ⁽⁴⁾

Lector de microplacas: Los lectores de microplacas son los equipos que proporcionan los resultados finales de detección a través del registro de la intensidad o absorbancia según el método de detección aplicado, como por ejemplo, las técnicas colorimétricas, fluorescentes y / o luminiscentes. ⁽²⁸⁾

Límite de detección: Es la concentración más baja de analito para la cual la respuesta se puede distinguir de forma fiable del ruido de fondo. ⁽³⁸⁾

Ocratoxina A: Es una de las micotoxinas más importantes y nocivas, descrita como un metabolito tóxico producida por hongos de la especie *Penicillium* los cuales se encuentran en climas fríos, y por varias especies de *Aspergillus* en regiones con climas tropicales y subtropicales. ⁽⁴⁶⁾

Teratogénico: Que tienen la tendencia a producir trastornos físicos en un embrión o feto. ⁽⁴⁾

ANEXOS

ANEXO N° 1
MAPA DEL DISTRITO 2 DE SAN SALVADOR



Clave	Supermercado	Ubicación
▲ (Blue)	Súper Selectos	Metro Centro 6ª Etapa
▲ (Pink)	Súper Selectos	Metro Centro 8ª Etapa
▲ (Green)	Súper Selectos	Metro Sur
▲ (Yellow)	Dispensa de Don Juan	Bulevar "Los Héroes"

Figura N° 11. Mapa del distrito 2 de San Salvador tomado y modificado de Alcaldía de San Salvador (2009). (2)

ANEXO N°2
MATERIALES Y EQUIPO

Materiales

- Beakers de 100 mL, 1000 mL
- Probeta de 10 mL, 50 mL, 100 mL
- Balones de 10 mL, 50 mL
- Erlenmeyer de 125 mL
- Embudo
- Agitadores de vidrio
- Pipetas volumétricas de 5 mL
- Jeringas de 50 mL con adaptador
- Gradilla para columna de inmunoafinidad
- Columnas de inmunoafinidad para OTA Neogen (Ver Figura N°3)
- Micropipeta de 100 μ L, 1000 μ L
- Micropipeta multicanal (12 canales)
- Puntas para micropipetas
- Frascos de vidrio ambar
- Rotulador negro
- Portapozos
- Papel toalla
- Toalla pequeña
- Micro espátula
- Papel pH
- Papel Whatman MN640 W \varnothing 125mm (#5)
- Cronómetro
- Refrigerador (almacenar kit ELISA)
- Cubetas de reactivo (para contener soluciones de análisis ELISA)
- Kit de análisis de Neogen Veratox® para ocratoxina (Ver Figura N°3)
 - 48 pocillos cubiertos de anticuerpos
 - 48 pocillos de mezcla marcados en rojo

- 1 frasco con etiqueta azul de solución conjugada de ocratoxina-HRP
- 1 frasco con etiqueta verde de solución de sustrato K-Blue ®
- 1 frasco con etiqueta roja de solución Red Stop
- Estándares de Ocratoxina A Neogen
 - 5 frascos marcados en amarillo de 0, 2, 5, 10 y 25 ppb de controles de OTA

Equipos

- Balanza analítica Shimadzu AUY220
- Medidor de pH Metrohm 632 pH-meter
- Lector de microplacas BIOTEK ELx800
- Termómetro digital Traceable Fisher Scientific



Figura N° 12. Kit utilizado para el análisis de ocratoxina A en café instantáneo.

ANEXO N°3
PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Preparación de 100 mL de CH₃OH/NaHCO₃ 1% (7:3)

- Pesar 1g de NaHCO₃ (Bicarbonato de sodio) en balanza semianalítica.
- Disolver en aproximadamente 80 mL de agua destilada.
- Transferir a balón de 100.0 mL y aforar con agua destilada.
- Medir 30 mL de la solución preparada anteriormente.
- Colocar en balón de 100.0 mL.
- Aforar con CH₃OH (metanol).

Preparación de 100 mL de PBS (Buffer fosfato salino)

- Colocar en un beaker 150 mL de agua destilada y llevar a ebullición durante 5 minutos, al retirar fuente de calor tapar inmediatamente para proteger de la atmósfera (Esta agua se encuentra libre de CO₂).
- Pesar en balanza analítica los siguientes reactivos
 - 0.02 g de KCl (Cloruro de potasio)
 - 0.02 g de KH₂PO₄ (Fosfato monopotásico)
 - 0.116 g Na₂HPO₄ (Fosfato de disódio)
 - 0.8 g NaCl (Cloruro de sodio)
- Disolver en aproximadamente 80 mL de agua libre de CO₂ (Dióxido de carbono).
- Utilizando un pH-metro y una solución de HCl 0.1 N (de ser necesaria) ajustar el pH a 7.4
- Aforar con agua libre de CO₂.

Preparación de 100 mL de PBS/Tween 0.01% (7:3)

- Medir en micropipeta 100 µL de Tween 20.
- Colocar en balón de 10 mL.

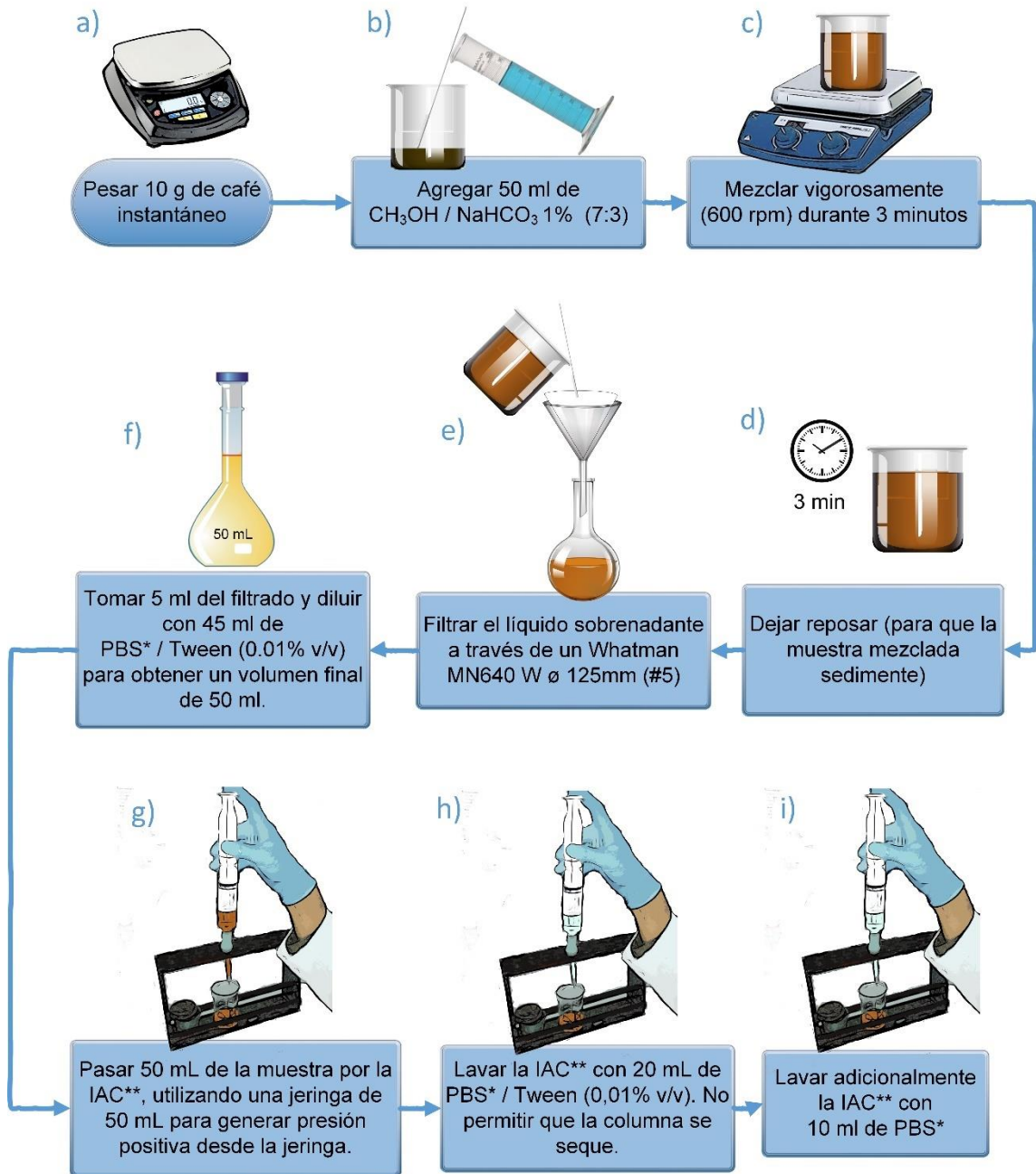
- Aforar hasta la marca con agua destilada.
- Tomar de la solución anterior 1 mL.
- Colocar en balón de 100 mL.
- Aforar con PBS.

Metanol

- Usar reactivo grado ACS

ANEXO N°4
ESQUEMAS DEL PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS DE OTA EN CAFÉ
INSTANTANEO

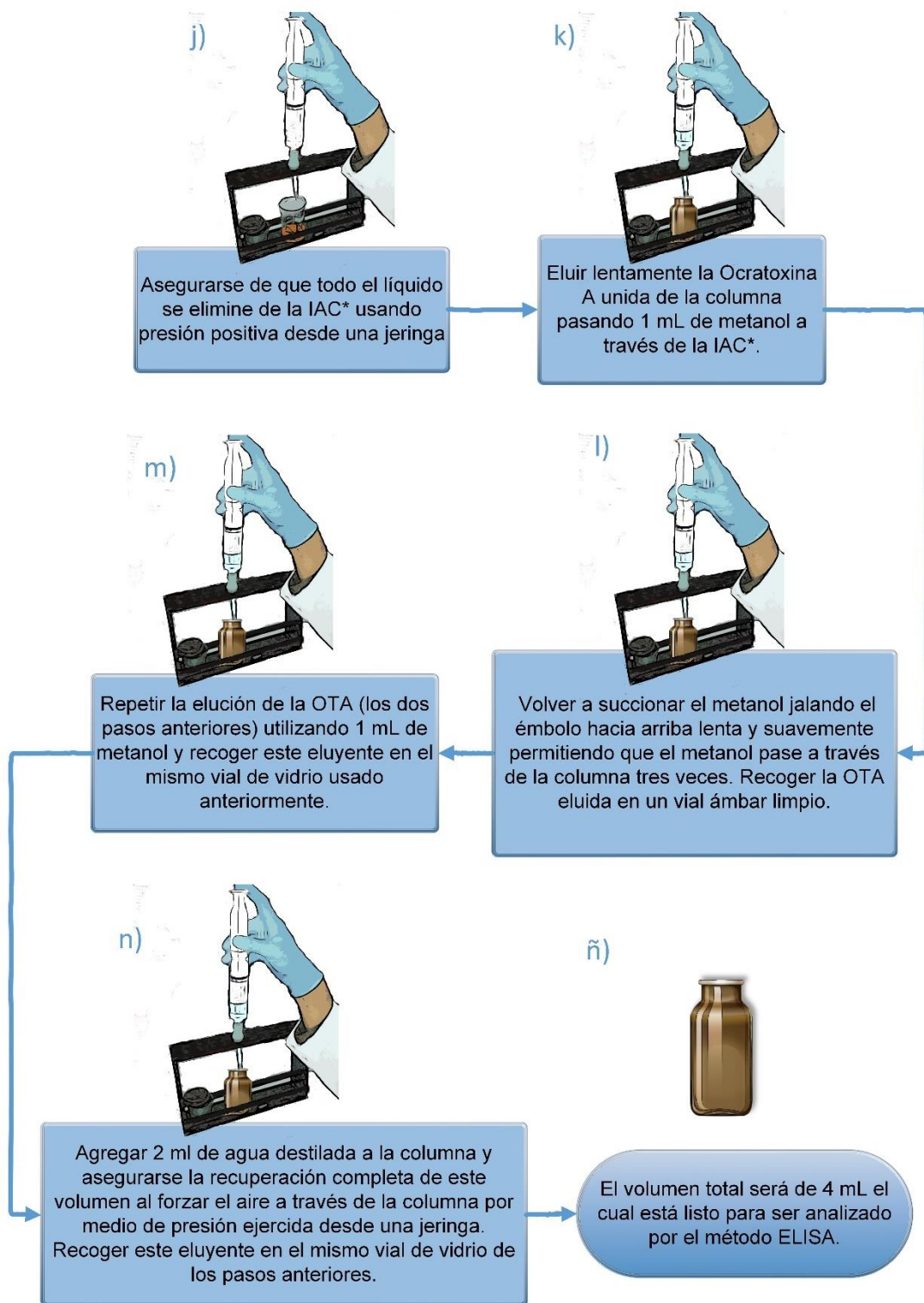
Extracción de ocratoxina A del café instantáneo



* PBS = Buffer Fosfato Salino

** IAC = Columna de Inmunofinidad

Figura N°13. Etapa de extracción y purificación de ocratoxina A en café instantáneo.



* IAC = Columna de Inmunofinidad

Figura N°13. Continuación

Determinación de ocratoxina A por el método ELISA

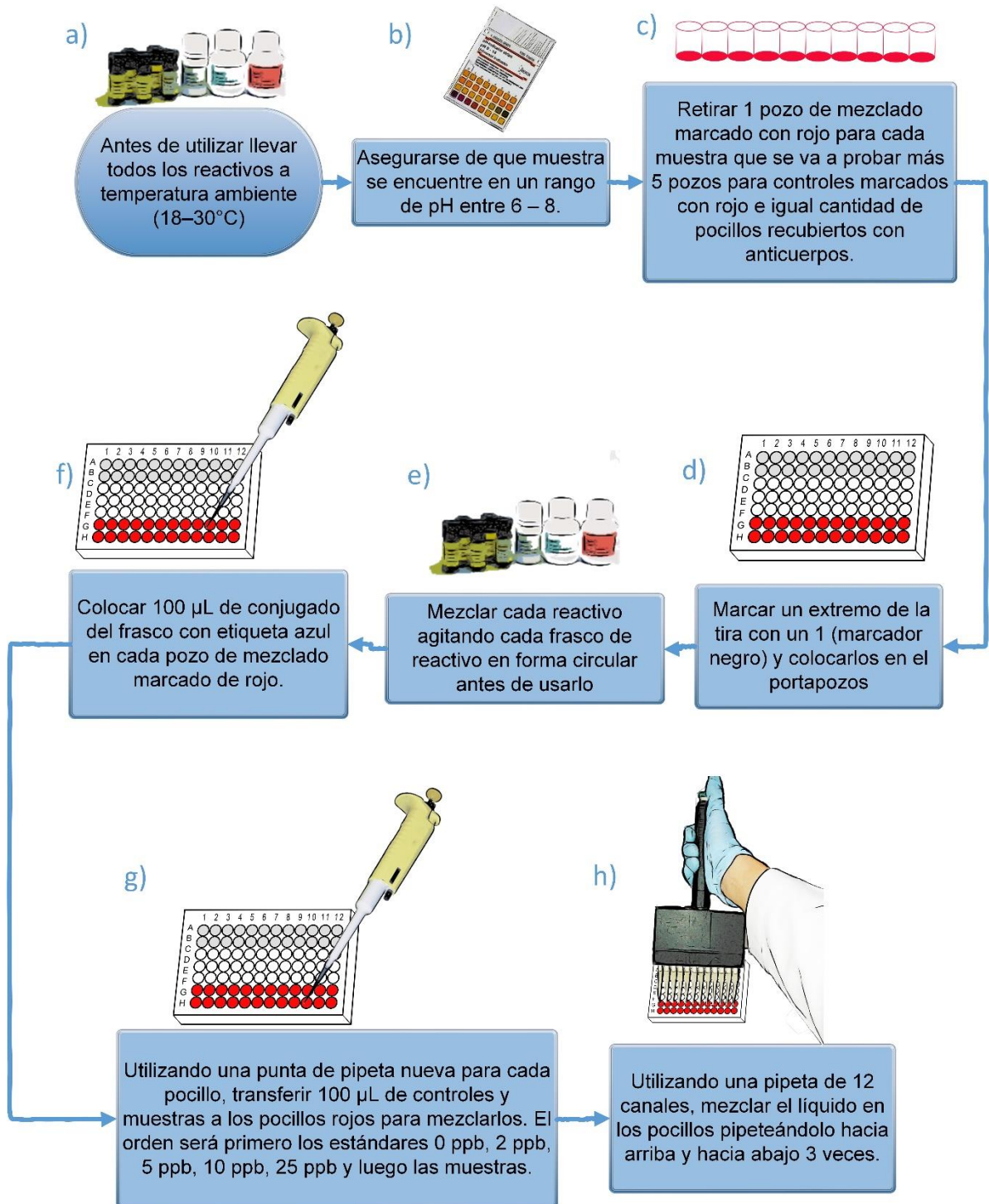


Figura N° 14. Determinación de ocratoxina A en café instantáneo.

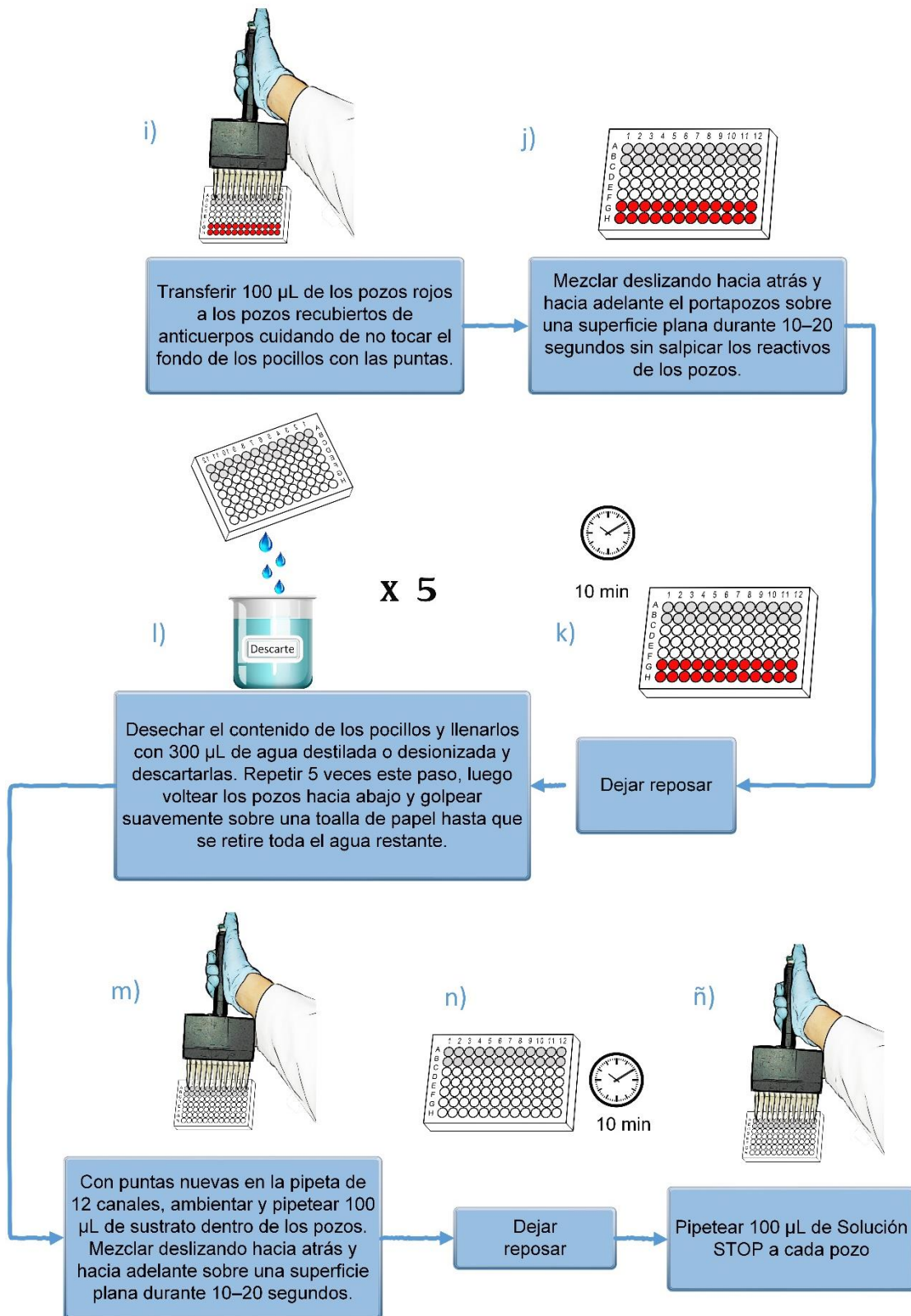


Figura N° 14. Continuación.

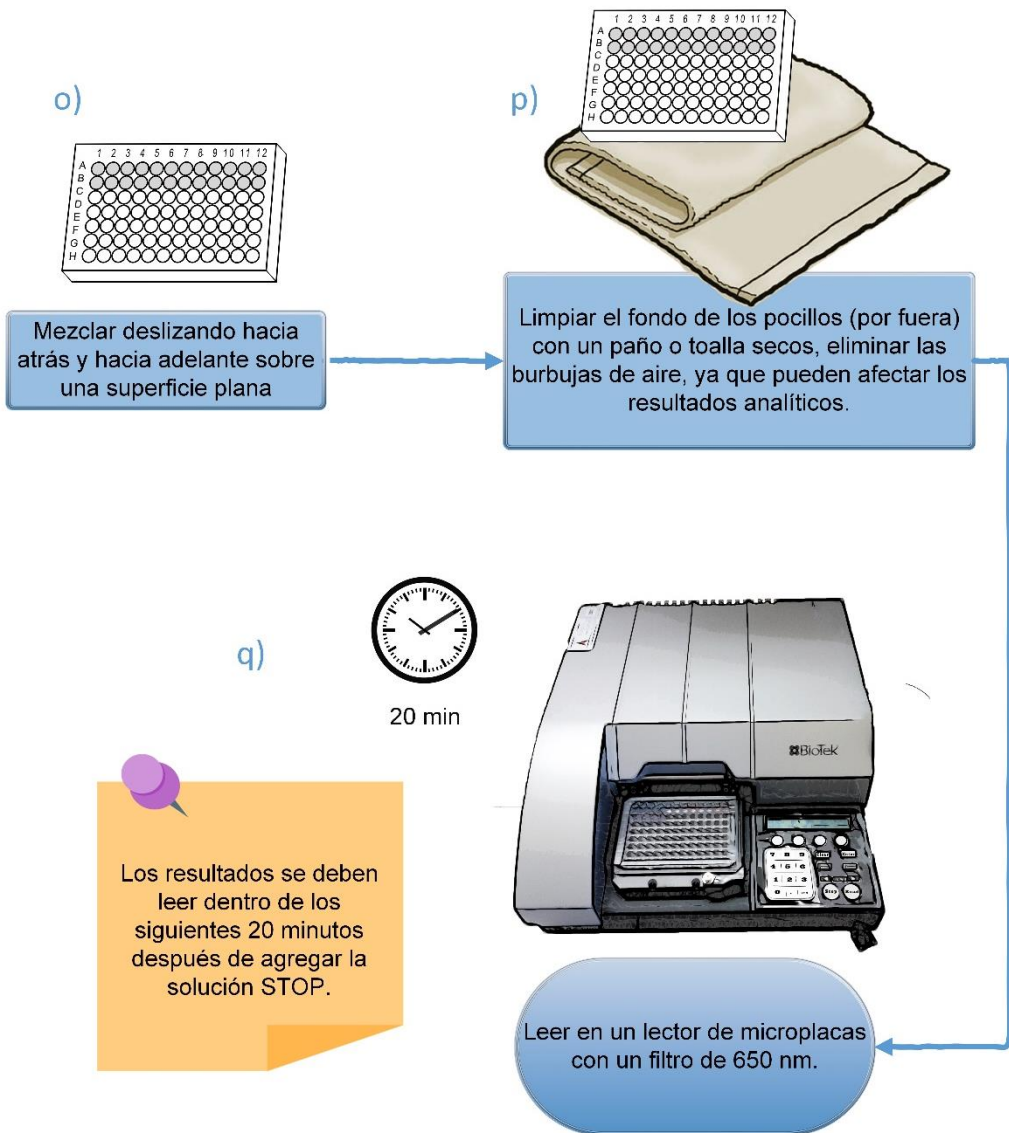


Figura N° 14. Continuación.

ANEXO N°5
FOTOGRAFIAS DEL ANÁLISIS DE OCRATOXINA A EN CAFÉ
INSTANTÁNEO

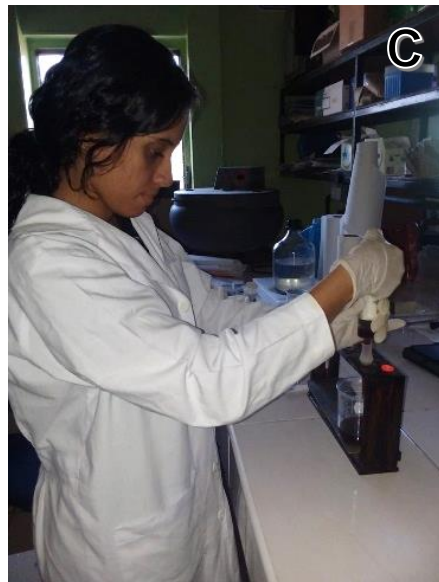
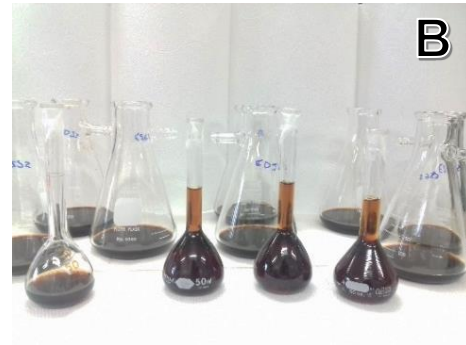


Figura N°15. Fotografías del pesado de muestras para la determinación de OTA (A), Extractos de OTA de las muestras de café instantáneo (B), Purificación del extracto en IAC (C), Obtención del pH de los extractos antes del análisis ELISA (D)



Figura N° 16. Fotografías de la microplaca utilizada para la determinación de OTA en café instantáneo (A), Ensayo ELISA para determinación de OTA (B), Pipeta multicanal utilizada en el ensayo ELISA (C) y Lector de microplacas (D).

ANEXO N°6
REGLAMENTO (CE) N° 123/2005 DE LA COMISIÓN DE LAS
COMUNIDADES EUROPEAS

REGLAMENTO (CE) Nº 123/2005 DE LA COMISIÓN
de 26 de enero de 2005
por el que se modifica el Reglamento (CE) nº 466/2001 con respecto a la ocratoxina A
(Texto pertinente a efectos del EEE)

LA COMISIÓN DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS,

Visto el Tratado constitutivo de la Comunidad Europea,

Visto el Reglamento (CEE) nº 315/93 del Consejo, de 8 de febrero de 1993, por el que se establecen procedimientos comunitarios en relación con los contaminantes presentes en los productos alimenticios⁽¹⁾, y, en particular, el apartado 3 de su artículo 2,

Considerando lo siguiente:

- (1) El Reglamento (CE) nº 466/2001 de la Comisión⁽²⁾, fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios.
- (2) Con arreglo al Reglamento (CE) nº 466/2001, la Comisión revisará las disposiciones con respecto a la ocratoxina A en las uvas pasas y con vistas a la inclusión de un límite máximo aplicable a la ocratoxina A contenida en el café verde y tostado y los productos a base de café, el vino, la cerveza, el zumo de uva, el cacao y los productos del cacao, y las especias, atendiendo a las investigaciones realizadas y las medidas preventivas aplicadas para reducir la presencia de ocratoxina A en dichos productos.
- (3) El Comité científico de la alimentación humana señaló en su dictamen sobre la ocratoxina A, emitido el 17 de septiembre de 1998, que dicha sustancia es una micotoxina con propiedades carcinógenas, nefrotóxicas, teratógenas, inmunotóxicas y, posiblemente, neurotóxicas. El Comité indicó también que se están realizando nuevos estudios para aclarar los mecanismos implicados en la carcinogenicidad de la ocratoxina A. Se prevé que el proyecto de investigación europeo sobre los mecanismos de la carcinogenicidad inducida por la ocratoxina A se concluirá como muy tarde a finales de 2004. Cuando se disponga de los resultados completos de la investigación, la Comisión pedirá a la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) que actualice el dictamen científico del Comité científico de la alimentación humana en función de los nuevos resultados.
- (4) En el marco de la Directiva 93/5/CEE del Consejo, de 25 de febrero de 1993, relativa a la asistencia a la Comisión por parte de los Estados miembros y a su cooperación en

materia de examen científico de las cuestiones relacionadas con productos alimenticios⁽³⁾, se ha evaluado la ingesta alimenticia de ocratoxina A por parte de la población de la Comunidad. Los cereales y los productos a base de cereales son los que más contribuyen a la exposición a la ocratoxina A. El vino, el café y la cerveza contribuyen significativamente a dicha exposición. Las uvas pasas y el zumo de uva contribuyen de manera importante a la exposición de determinados grupos vulnerables de consumidores, por ejemplo los niños.

- (5) El Reglamento (CE) nº 466/2001 ha fijado el contenido máximo de ocratoxina A para los cereales, los productos a base de cereales y las uvas pasas. El contenido de ocratoxina A en la cerveza está indirectamente controlado, ya que en este producto la ocratoxina A tiene su origen en la presencia de esta micotoxina en la malta, para la que se ha establecido un límite máximo. En consecuencia, no es urgente establecer un límite máximo de ocratoxina A en la cerveza para proteger la salud pública, pero deberá considerarse en el contexto de la revisión prevista.
- (6) En vista de la contribución significativa del vino y el café tostado, así como del café soluble, a la exposición humana a la ocratoxina A, y la del zumo de uva a la exposición de los niños a esta micotoxina, procede fijar, ya en esta fase, límites máximos para estos productos a fin de proteger la salud pública evitando la distribución de productos alimenticios con niveles de contaminación inaceptablemente altos.
- (7) También se ha constatado la presencia de ocratoxina A en las uvas pasas, el cacao y los productos del cacao, las especias y el regaliz. La conveniencia de fijar un contenido máximo de ocratoxina A en estos productos alimenticios, incluido el café verde, así como la revisión de los niveles máximos actuales se estudiarán cuando se disponga de la evaluación de la EFSA sobre los resultados de la investigación relativa a la toxicología de la ocratoxina A.
- (8) Debe modificarse por lo tanto el Reglamento (CE) nº 466/2001 en consecuencia.
- (9) Las medidas previstas en el presente Reglamento se ajustan al dictamen del Comité permanente de la cadena alimentaria y de sanidad animal.

⁽¹⁾ DO L 37 de 13.2.1993, p. 1. Reglamento modificado por el Reglamento (CE) nº 1882/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo (DO L 284 de 31.10.2003, p. 1).

⁽²⁾ DO L 77 de 16.3.2001, p. 1. Reglamento cuya última modificación la constituye el Reglamento (CE) nº 684/2004 (DO L 106 de 15.4.2004, p. 6).

⁽³⁾ DO L 52 de 4.3.1993, p. 18. Directiva modificada por el Reglamento (CE) nº 1882/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo.

HA ADOPTADO EL PRESENTE REGLAMENTO:

Artículo 1

El Reglamento (CE) nº 466/2001 quedará modificado como sigue:

- 1) La letra b) del apartado 2 del artículo 4, «y 2.2.2» se sustituirá por «2.2.2, 2.2.3, 2.2.4 y 2.2.5».
- 2) El apartado 2 bis del artículo 5, se sustituirá por el texto siguiente:

«2. bis. Sobre la base de una determinación del riesgo actualizada de la ocratoxina A efectuada por la EFSA y teniendo en cuenta las medidas preventivas aplicadas para reducir el contenido de ocratoxina A, la Comisión revisará lo dispuesto en el punto 2.2 de la sección 2 del anexo I para el 30 de junio de 2006 a más tardar. Dicha revisión se referirá en particular al contenido máximo de ocratoxina A de las uvas pasas y el zumo de uva y considerará el establecimiento de un límite máximo de esta micotoxina en el café verde, los frutos secos distintos de las uvas pasas, la cerveza, el cacao y los productos del cacao, los vinos de licor, la carne y los productos cárnicos, las especias y el regaliz.

A tal fin, los Estados miembros y las partes interesadas deberán comunicar cada año a la Comisión los resultados de las investigaciones realizadas y los avances registrados en la aplicación de medidas preventivas para evitar la contaminación por ocratoxina A. La Comisión difundirá estos resultados entre los Estados miembros.».

- 3) El anexo I quedará modificado de conformidad con el anexo del presente Reglamento.

Artículo 2

El presente Reglamento entrará en vigor el vigésimo día siguiente al de su publicación en el *Diario Oficial de la Unión Europea*.

Se aplicará a partir del 1 de abril de 2005.

El presente Reglamento no se aplicará a los productos comercializados antes del 1 de abril de 2005 de conformidad con las disposiciones aplicables. La carga de la prueba relativa a cuándo se han comercializado los productos recaerá sobre el operador económico de la empresa alimentaria.

El presente Reglamento será obligatorio en todos sus elementos y directamente aplicable en cada Estado miembro.

Hecho en Bruselas, 26 de enero de 2005.

Por la Comisión
Markos KYPRIANOU
Miembro de la Comisión

ANEXO

En el anexo I, sección 2 (Micotoxinas), el punto 2.2 (Ocratoxina A) se sustituirá por el texto siguiente:

Productos	Ocratoxina A: contenido máximo	Método de toma de muestras	Método de análisis de referencia
*2.2. OCRATOXINA A			
2.2.1. Cereales (incluido el arroz y el alforfón) y productos derivados de los mismos			
2.2.1.1. Cereales en grano sin transformar (incluido el arroz sin transformar y el alforfón)	5,0	Directiva 2002/26/CE de la Comisión (*)	Directiva 2002/26/CE
2.2.1.2. Productos derivados de los cereales (incluidos los productos transformados a base de cereales y los cereales en grano destinados al consumo humano directo)	3,0	Directiva 2002/26/CE	Directiva 2002/26/CE
2.2.2. Uvas pasas (pasas de Corinto, sultanas y otras variedades de pasas)	10,0	Directiva 2002/26/CE	Directiva 2002/26/CE
2.2.3. — Café tostado en grano y café tostado molido, con excepción del café soluble	5,0	Directiva 2002/26/CE	Directiva 2002/26/CE
— Café soluble (café instantáneo)	10,0		
2.2.4. — Vino (tinto, blanco y rosado) (**) y otras bebidas a base de vino y/o mosto de uva (**)	2,0 (***)	Directiva 2002/26/CE	Directiva 2002/26/CE
2.2.5. — Zumo de uva, ingredientes de zumo de uva en otras bebidas, incluido el néctar de fruta y el zumo de uva concentrado reconstituido (****)	2,0 (***)	Directiva 2002/26/CE	Directiva 2002/26/CE
— Mosto de uva y mosto de uva concentrado reconstituido, destinados al consumo humano directo (****)	2,0 (***)	Directiva 2002/26/CE	Directiva 2002/26/CE
2.2.6. Alimentos elaborados a base de cereales y alimentos infantiles para lactantes y niños de corta edad (*****)	0,50	Directiva 2002/26/CE	Directiva 2002/26/CE
2.2.7. Alimentos dietéticos destinados a usos médicos especiales (*****) dirigidos específicamente a los lactantes	0,50	Directiva 2002/26/CE	Directiva 2002/26/CE
2.2.8. Café verde, frutos secos distintos de las uvas pasas, cerveza, cacao y productos del cacao, vinos de licor, productos cárnicos, especias y regaliz	—		

(*) DO L 75 de 16.3.2002, p. 38. Directiva cuya última modificación la constituye la Directiva 2004/43/CE (DO L 113 de 20.4.2004, p. 14).

(**) Vinos, incluidos los vinos espumosos, pero excluidos los vinos de licor y los vinos con un grado alcohólico volumétrico no inferior al 15% vol., tal como se definen en el Reglamento (CE) nº 1493/1999 (DO L 179 de 14.7.1999, p. 1), y los vinos de fruta.

(***) Vinos aromatizados, bebidas aromatizadas a base de vino y cócteles aromatizados de productos vitivinícolas, tal como se definen en el Reglamento (CEE) nº 1601/91 del Consejo (DO L 149 de 14.6.1991, p. 1). El contenido máximo de ocratoxina A aplicable a estas bebidas está en función de la proporción de vino y/o mosto de uva presente en el producto acabado.

(****) El contenido máximo se aplica a los productos procedentes de la cosecha de 2005 en adelante.

(*****) Zumos de frutas, incluidos los zumos de frutas a base de concentrado, los zumos de frutas concentrados y el néctar de frutas, tal como se definen en los anexos 1 y 2 de la Directiva 2001/112/CE del Consejo, de 20 de diciembre de 2001, relativa a los zumos de frutas y otros productos similares destinados a la alimentación humana (DO L 10 de 12.1.2002, p. 58), y los productos derivados de la uva.

(******) Alimentos elaborados a base de cereales y alimentos infantiles para lactantes y niños de corta edad, tal como se definen en el artículo 1 de la Directiva 96/5/CE de la Comisión, de 16 de febrero de 1996, relativa a los alimentos elaborados a base de cereales y alimentos infantiles para lactantes y niños de corta edad (DO L 49 de 28.2.1996, p. 17). Directiva cuya última modificación la constituye la Directiva 2003/13/CE (DO L 41 de 14.2.2003, p. 33).

El contenido máximo relativo a los alimentos elaborados a base de cereales y los alimentos infantiles para lactantes y niños de corta edad se refiere a la materia seca, que se determina con arreglo a lo dispuesto en la Directiva 2002/26/CE.

(******) Alimentos dietéticos destinados a usos médicos especiales, tal como se definen en el apartado 2 del artículo 1 de la Directiva 1999/21/CE de la Comisión, de 25 de marzo de 1999, sobre alimentos dietéticos destinados a usos médicos especiales (DO L 91 de 7.4.1999, p. 29).

El contenido máximo relativo a los alimentos dietéticos para usos médicos especiales dirigidos específicamente a los lactantes se refiere:

— en el caso de la leche y los productos lácteos, a los productos listos para el consumo (comercializados como tales o reconstituidos de acuerdo con las instrucciones del fabricante).

— en el caso de los productos distintos de la leche y los productos lácteos, a la materia seca, que se determina con arreglo a lo dispuesto en la Directiva 2002/26/CE.

ANEXO N°7
CLASIFICACIÓN DE LOS CARCINÓGENOS ⁽⁵⁰⁾

Sección traducida del Preámbulo de las monografías de la IARC

El agente es cancerígeno para los humanos (Grupo 1)

Esta categoría se aplica siempre que haya evidencia suficiente de carcinogenicidad en humanos.

Además, esta categoría puede aplicarse cuando existen pruebas contundentes (en humanos expuestos) de que el agente exhibe características clave de carcinógenos y evidencia suficiente de carcinogenicidad en animales de experimentación.

El agente es probablemente cancerígeno para los humanos (Grupo 2A)

Esta categoría generalmente se aplica cuando se han realizado al menos dos de las siguientes evaluaciones, incluida al menos una que involucra humanos o células o tejidos humanos expuestos:

- Evidencia limitada de carcinogenicidad en humanos,
- Evidencia suficiente de carcinogenicidad en animales de experimentación.
- Fuerte evidencia de que el agente exhibe características clave de carcinógenos.

Si hay evidencia inadecuada con respecto a la carcinogenicidad en humanos, debe haber una fuerte evidencia en células o tejidos humanos de que el agente exhibe características clave de carcinógenos.

Si hay evidencia limitada de carcinogenicidad en humanos, entonces la segunda evaluación individual puede ser de sistemas experimentales (es decir, evidencia

suficiente de carcinogenicidad en animales experimentales o evidencia fuerte en sistemas experimentales de que el agente exhibe características clave de carcinógenos).

Se aplican consideraciones adicionales cuando existe una fuerte evidencia de que el mecanismo de carcinogenicidad en animales experimentales no opera en humanos para uno o más sitios tumorales. Específicamente, los sitios tumorales restantes aún deben respaldar una evaluación de evidencia suficiente en animales experimentales para que esta evaluación se pueda utilizar para apoyar una clasificación general en el Grupo 2A.

Por separado, esta categoría generalmente se aplica si existe una fuerte evidencia de que el agente pertenece, en base a consideraciones mecanicistas, a una clase de agentes para los cuales uno o más miembros han sido clasificados en el Grupo 1 o Grupo 2A.

El agente es posiblemente cancerígeno para los humanos (Grupo 2B)

Esta categoría generalmente se aplica cuando se ha realizado solo una de las siguientes evaluaciones:

- Evidencia limitada de carcinogenicidad en humanos,
- Evidencia suficiente de carcinogenicidad en animales de experimentación.
- Fuerte evidencia de que el agente exhibe características clave de carcinógenos.

Debido a que esta categoría se puede basar en la evidencia de estudios en animales de experimentación solos, no es necesario que la fuerte evidencia mecanicista esté en humanos expuestos o en células o tejidos humanos. Esta

categoría puede basarse en pruebas sólidas en sistemas experimentales de que el agente exhibe características clave de carcinógenos. Al igual que con el Grupo 2A, se aplican consideraciones adicionales cuando existe una fuerte evidencia de que el mecanismo de carcinogenicidad en animales experimentales no opera en humanos para uno o más sitios tumorales. Específicamente, los sitios tumorales restantes aún deberían respaldar una evaluación de evidencia suficiente en animales experimentales para que esta evaluación se pueda utilizar para respaldar una clasificación general en el Grupo 2B.

El agente no es clasificable en cuanto a su carcinogenicidad para los humanos (Grupo 3)

Los agentes que no pertenecen a ningún otro grupo generalmente se colocan en esta categoría.

Esto incluye el caso cuando existe una fuerte evidencia de que el mecanismo de carcinogenicidad en animales experimentales no opera en humanos para uno o más sitios tumorales en animales experimentales, los sitios tumorales restantes no respaldan una evaluación de evidencia suficiente en animales experimentales, y otros. Las categorías no están respaldadas por datos de estudios en humanos y estudios mecanicistas.

Una evaluación en el Grupo 3 no es una determinación de no carcinogenicidad o seguridad general. A menudo significa que el agente tiene un potencial carcinogénico desconocido y que existen importantes lagunas en la investigación. Si la evidencia sugiere que el agente no exhibe actividad carcinogénica, ya sea por evidencia que sugiere falta de carcinogenicidad tanto en humanos como en animales experimentales, o por evidencia que sugiere falta de carcinogenicidad en animales experimentales complementada por una fuerte

evidencia mecanicista negativa en ensayos relevantes para el cáncer humano, entonces se puede agregar una oración a la evaluación para caracterizar al agente como bien estudiado y sin evidencia de actividad cancerígena.

Tabla N° 11. Clasificación de carcinógenos de acuerdo a la IARC.

Evidencias de cáncer en humanos	Evidencias de cáncer en animales de experimentación	Evidencia del mecanismo	Evaluación
Suficiente			Carcinogénico (Grupo 1A)
	Suficiente		
Limitada	Suficiente		Probablemente carcinogénico (Grupo 2A)
Limitada		Alta	
	Suficiente	Alta (Células humanas o tejidos)	
		Alta (clase mecanista)	
Limitada			Posiblemente carcinogénico (Grupo 2B)
	Suficiente		
		Alta (sistemas experimentales)	
	Suficiente	Alta (no opera en humanos)	No clasificable (Grupo 3)
Otras situaciones no listadas			