

## Evaluación cuantitativa de Ocratoxina A como contaminante en el cacao ecuatoriano de exportación por cromatografía líquida de alta resolución

AMANDA CEVALLOS\*<sup>1</sup>, IVÁN SAMANIEGO<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Universidad Central del Ecuador, Facultad de Ciencias Químicas, Quito-Ecuador;

<sup>2</sup>Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias - Laboratorio de Servicio de Análisis e Investigación en Alimentos, Mejía-Ecuador

\*Correspondencia: amismon@hotmail.com

Recibido: 27 julio 2011 / Aceptado: 17 septiembre 2012

### Resumen

La Ocratoxina A (OTA) es una micotoxina, tóxico potente que puede afectar la salud humana a través de su consumo. Café, cacao y otros, representan las fuentes de contribución más importantes. El primer objetivo de esta investigación fue la validación del método analítico para la cuantificación de OTA en cacao en grano utilizando Cromatografía Líquida de Alta Resolución con detector de fluorescencia, con el uso de columnas de inmunoafinidad con anticuerpos monoclonales específicos para OTA. La toxina fue extraída con una solución de metanol - bicarbonato de sodio al 3%. La validación del método analítico se basó en criterios expuestos en la norma ISO IEC 17025:2005, estos son: selectividad, linealidad, límites de detección y cuantificación, precisión (análisis entre y dentro de niveles), recuperación, e incertidumbre. Los límites de detección y cuantificación obtenidos son 0,90 µg/kg y 1,35 µg/kg respectivamente. La recuperación obtenida fue de 84,55%, cumpliendo de esta manera con criterios de la Unión Europea para este tipo de métodos. El método demostró ser selectivo con una pureza de pico de 100%, lineal entre 1,55 a 15 µg/kg, preciso con una desviación estándar de reproducibilidad menor al 30% y una desviación estándar de repetitibilidad menor al 20%. El resultado final va asociado a una incertidumbre de 0,53 µg/kg, comprobándose así su validez. El segundo objetivo fue determinar los niveles de OTA en las muestras de cacao obtenidas de 15 exportadoras asociadas a ANECACAO, encontrando un 0% de incidencia con respecto a 2 µg/kg valor de referencia recomendado por la Unión Europea medición realizada a una actividad de agua (aw) promedio de 0,70 y un porcentaje de humedad promedio de 5,79%. Este es un resultado satisfactorio, que nos garantiza la baja contaminación del cacao producido en el Ecuador por pequeños y grandes agricultores que venden su cacao a las exportadoras estudiadas.

**Palabras clave:** Micotoxinas, Ocratoxina A, HPLC, cacao en grano, inmunoafinidad, validación.

### Quantitative evaluation of Ochratoxin A, as a contaminant in ecuadorian cocoa export liquid chromatography high resolution

#### Abstract

Ochratoxin A is a mycotoxin, a potent toxic that can affect human health through their diet. Cereals, coffee and cocoa represent, by far, the main contributors to OTA exposure. The main objective of this investigation is the analytical validation method for OTA quantification in cocoa beans with High-Performance Liquid Chromatography (HPLC), using a fluorescence detector, and immunoaffinity columns with monoclonal antibodies specifics for OTA. The validation was carried out in the Analytical Services and Food Research Laboratory (LSAIA). Toxin was extracted with a methanol- 3% sodium hydrogen carbonate and it was purified by immunoaffinity columns, previous to analysis by HPLC. The analytical method validation was based on the ISO IEC 17025:2005 norm, as well as in the criteria from the Ecuadorian Organization of Accreditation (OAE), this parameters were: selectivity,

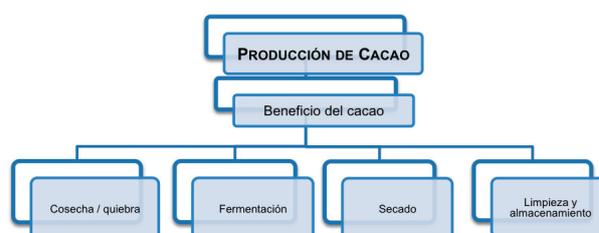
linearity, detection and quantification limits, precision, (between and within analyses), recovery, and uncertainty. The detection and quantification limits were 0,90 µg/kg and 1,35 µg/kg respectively. Recovery was 84,55%, accomplishing with the European Union's criteria for these type of methods. The method has proved: a selectivity with a 100% purity peak's, a 1,55 to 15 µg/kg of range lineal, precise with a standard deviation of reproducibility lesser than 30% and a repeatability standard deviation lesser than 20%. The final result goes associated to an uncertainty of 0,53 and so verifying its validity. The second objective was to determinate the OTA levels in cocoa samples from 15 exporters associated to ANECACAO, finding 0% of incidence in comparison with 2µg/kg recommended limits by the UE for Ochratoxin A in cocoa, this measure was realized with water activity (aw) average of 0,70 and a moisture percentage of 5,79. This result is very satisfactory and is guarantee low levels of contamination in cocoa produced in Ecuador, for little and major framings that which sell cocoa's to exporters has been studied.

**Keywords:** Mycotoxins, Ochratoxin A, HPLC, cocoa beans, immunoaffinity, validation.

## 1. Introducción

La Ocratoxina A (OTA) es una micotoxina que existe a nivel mundial en alimentos tales como: productos de cereales, frutas pasas, zumo de uva, café, cacao, vino y cerveza. Es una toxina que se produce naturalmente como metabolito secundario de las especies fúngicas del género *Aspergillus* y *Penicillium*, es cancerígena<sup>1</sup>, nefrotóxica potente, teratogénica e inmunotóxica. Químicamente es 7-(L-β-fenilalanilcarbonil)-carboxil-5-cloro-8-hidroxi-3,4-dihydro-3R-metilisocumarina, [1]. Fue estudiada por primera vez en el cacao en 1987, encontrándose que un 17.6% de 56 muestras de granos de cacao, presentaba contaminación en niveles que van desde los 100 a los 500 µg/kg [2]. Otro estudio realizado en el año 2002, en 1.220 muestras de cacao en grano en Alemania, reportó que el 14,01% de las muestras presentaron contaminación por OTA en niveles que bordean los 2 µg/kg [3]. En el año 2004, se realizó una investigación de la contaminación por Ocratoxina A en granos de cacao por región de origen, la misma que demostró que el 13,05% de 46 muestras de cacao analizadas, presentan contaminación por OTA en niveles superiores a 2 µg/kg. Estas muestras fueron importadas principalmente desde Costa de Marfil y otras regiones en las cuales no se incluyó al Ecuador [4], el mismo año se reportó que 74 de 80 muestras de licores de cacao analizadas estaban contaminadas por OTA en un rango de 0,1 a 9 µg/kg por el método de Cromatografía Líquida de Alta Resolución. Entre estas muestras, se incluyen tres

provenientes de Ecuador [5]. Los niveles en el cacao están en discusión con una propuesta establecida por los EEUU y la UE de 2 µg/kg [6;7]. El cacao puede actuar como un substrato para el crecimiento de hongos productores de Ocratoxina A principalmente por *Aspergillus carbonarius* y *Penicillium viridicatum*, a una actividad mínima de agua (aw) de 0,85 [8;9;5;10;3]. Debido a que el Ecuador es uno de los principales países exportadores de cacao (aporta con el 50% de producción de cacao fino y de aroma) y siendo los países de la UE, los principales destinos de este cacao, los exportadores corren el riesgo de que sus embarques sean devueltos por encontrarlos contaminados con OTA, lo que además generaría una pérdida de divisas para el país ya que éste representa un ingreso del 0,4% del PIB. El cacao puede actuar como un substrato para el crecimiento de hongos en condiciones climáticas húmedas favorables y en los procesos de post-cosecha (fermentación, secado, transporte y condiciones de almacenamiento).



**Figura 1.** Diagrama de producción de almendras de cacao

<sup>1</sup> La Agencia Internacional para Investigaciones en Cáncer (IARC), clasifica a ésta como un posible carcinógeno humano [grupo 2B] (7) [12]

La toxina pura es un polvo cristalino blanco con punto de fusión a 169°C. Emite fluorescencia verde que cambia al celeste en presencia de un álcali. La forma ácida es soluble en solventes orgánicos polares y la sal sódica en agua. Es inestable a la luz, sin embargo, la solución etanólica es estable por más de un año si se mantiene en la obscuridad y al frío. Es bastante estable al calor y persiste el 35% de la cantidad inicial luego de tratar cereales contaminados durante tres horas en autoclave. Los oxidantes fuertes, ácidos fuertes y bases fuertes, la destruyen. La toxicidad de la Ocratoxina A está asociada a su anillo isocumarínico (benzopirano), la ingesta semanal tolerable de OTA es de 50 ng/kg pc. La OTA se mantiene estable durante casi todas las etapas de la producción de alimentos, como: cocción, lavado y fermentación, hasta un grado apreciable que se puede detectar en los productos alimenticios manufacturados. Se ha demostrado que la OTA es estable al calor, (aplicando calor seco a 100°C durante 160 minutos). Durante el tostado del cacao, la temperatura final del grano alcanza entre 100° y 120°C con una duración de 15 a 70 minutos, por lo cual no se espera que el tostado reduzca considerablemente los niveles de OTA.

## 2. Materiales y métodos

Para la validación del método de análisis de Ocratoxina A en almendras de cacao mediante HPLC, utilizando detector fluorescencia, se trabajó con estándares certificados de Ocratoxina A, para establecer un conjunto de parámetros de calidad que aseguraron el proceso de adaptación y validación de la metodología. Se establecieron los siguientes parámetros: selectividad, exactitud, precisión, repetibilidad y reproducibilidad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad y rango lineal, e incertidumbre.

### Reactivos

Agua tipo I: conductividad 0,056  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , bicarbonato de sodio p.a., acetonitrilo grado HPLC, metanol grado HPLC, metanol grado p.a., estándar Ocratoxina A pureza > 98%, cloruro de potasio grado p.a pureza > 99.5%, cloruro de sodio grado p.a pureza > 99.5%, dihidrógeno fosfato de potasio, hidrógeno fosfato disódico anhidro, ácido acético grado p.a. pureza > 99.5%, tween 20.

### Materiales

Columnas de inmunoafinidad para purificación de OTA OCHRAPREP®, equipo de extracción en fase sólida al

vacío, agitador de tubos Vortex, baño ultrasonido, molino de café, evaporador de muestras, baño maría, sistema de filtración al vacío con filtro de vidrio poroso, equipo para microfiltración, adaptable a jeringuillas de polipropileno, licuadora, centrífuga, cronómetro digital, pipetas volumétricas de 10 mL, micropipetas automáticas de 100-1000  $\mu\text{L}$  y de 10-100  $\mu\text{L}$ , balones volumétricos de 50mL, frascos de vidrio con tapa rosca de 125 mL, embudos de filtración 12,5 cm de diámetro, tubos de polipropileno para centrífuga con tapa rosca y punta cónica de 50 mL, tubos de ensayo con punta cónica, vasos para licuadora de 500 mL, viales de polipropileno de 400  $\mu\text{L}$ , viales de polipropileno de 2 mL con tapa rosca y fondo redondo, papel filtro de 18,5 cm de diámetro Whatman No.1, membranas PVDF, 0,45 $\mu\text{m}$ , y de 0,22  $\mu\text{m}$ , jeringuillas de polipropileno de 10 mL y 60 mL, tami-z de 1,75 mm, gas nitrógeno 99.9% de pureza de 6 m<sup>3</sup>.

### Preparación de la muestra

Las muestras de cacao para el análisis de OTA, reducidas a 1,5 kg, se codificaron. Se retiró la cascarilla de forma manual (utilizando una cuchilla) y se procedió a la molienda utilizando un molino de café, hasta obtener un tamaño de partículas de 1,75 mm, éstas se almacenaron en congelación a -20°C y en fundas plásticas con cierre hermético, hasta el momento de realizar los análisis.

### Fundamento del método seleccionado

El método seleccionado está basado en la utilización de columnas de inmunoafinidad que poseen anticuerpos monoclonales específicos para OTA, tecnología que es altamente específica, sensible y rápida, en relación a las tecnologías tradicionales de purificación.

En éste método, la OTA fue extraída de la muestra con soluciones de metanol con bicarbonato de sodio, la misma que se aplicó sobre la columna de inmunoafinidad que atrapa a la toxina. La columna fue lavada para eliminar todas las interferencias y la OTA fue recuperada de la columna con una solución de metanol. La toxina recuperada fue cuantificada por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), utilizando una columna de fase reversa C18 y detector de fluorescencia.

### Procedimiento de análisis

#### Preparación de reactivos

Solución Buffer Fosfato Salino PBS 0.1%-Tween 20: Transferir cuantitativamente e individualmente 0.2 g de

dihidrógeno fosfato de potasio, 1.5 g de hidrógeno fosfato disódico dihidratado, 8.0 g de cloruro de sodio y 0.2 g de cloruro de potasio, a un balón volumétrico de 1000 mL, completar el volumen con agua purificada y homogenizar, posteriormente añadir 2 gotas de Tween 20 y volver a homogenizar vigorosamente. Solución Bicarbonato de Sodio al 3%: Pesar 30 g de bicarbonato de sodio, transferir a un balón de 1000 mL y completar el volumen con agua purificada y homogeneizar. Solución de Extracción: Adicionar 700 mL de metanol grado p.a. a 300 mL de bicarbonato de sodio al 3% y homogeneizar. Solución fase móvil. Acetonitrilo: Ácido Acético 0.2% en agua 49:51 (v/v): Mezclar 490 mL de Acetonitrilo grado HPLC, más 200 mL de agua tipo I, más 1,02 mL de ácido acético, completar el volumen con agua tipo I a 100 mL. Homogenizar y filtrar a través de membrana millipore de 0,45 µm, desgasificar la solución en un baño ultrasonido, por diez minutos. Solución de inyección. Metanol: Agua: Ácido Acético 7:3:0,1 (v/v/v): Colocar 70 mL de metanol en un balón de 100 mL, a continuación se afora con agua tipo I, y finalmente se coloca 1 mL de Ácido Acético, homogenizar y filtrar a través de membrana millipore de 0,45 µm.

#### Preparación de la muestra

Moler en el molino 1,5 kg de granos de cacao en grano, hasta obtener un tamaño de partículas de 2 mm. Colocar un frasco de vidrio de 500 mL, con número de identificación de la muestra sobre la balanza. Encerar la balanza. Homogenizar la muestra realizando movimientos envolventes de la misma dentro de la funda plástica. Pesar diez gramos de muestra previamente homogenizada en el frasco de vidrio con la ayuda de una espátula. Llevar el frasco de vidrio con la muestra hacia el lugar de extracción.

#### Extracción de la muestra

Adicionar al frasco con la muestra 200 mL de solución de metanol: bicarbonato de sodio 3% (7:3, v/v). Colocar la tapa con las cuchillas, asegurar en la base de la licuadora y licuar durante 3 minutos a alta velocidad. Colocar 50 mL del extracto en un tubo de polipropileno de 50 mL con tapa y centrifugar a 3500 rpm por 15 min. Filtrar el extracto sobrenadante usando papel filtro Wathman No. 1 (filtrado semi-rápido). Colocar el filtrado en una jeringa polipropileno de 60 mL y filtrar a través de una membrana millipore de 0,22 µm Tomar 10 mL del filtrado en un balón aforado de 50 mL, adicionar 40 mL de la solución tampón PBS 1%-Tween 20 y homogeneizar.

#### Purificación de la muestra

Adaptar una jeringa de polipropileno de 60 mL a una columna de inmunoafinidad y conectar al sistema de filtración al vacío. Pasar cuantitativamente la muestra diluida con el tampón PBS por la columna, dejar pasar a través de la columna de inmunoafinidad utilizando vacío. Lavar la columna con 10 mL PBS 1%-Tween 20 y 10 mL de agua y dejar secar la columna. Desconectar la columna del sistema de vacío y aplicar presión positiva. Sustituir la jeringa de plástico de 60 mL por una jeringa de plástico de 10 mL. Transferir 2 mL de metanol grado HPLC por la jeringa de polipropileno, realizar un efecto de contraflujo en 3 a 4 tiempos, dejar en contacto por tres minutos y eluir la Ocratoxina A utilizando presión positiva y controlando el flujo por medio del émbolo de la jeringa (2-3 ml/min). A continuación, transferir nuevamente 2 mL de metanol grado HPLC en la columna de inmunoafinidad, conectar una jeringa de plástico de 10 mL, realizar un efecto de contraflujo en 3 a 4 tiempos y dejar en contacto por tres minutos (aproximadamente), eluir la Ocratoxina A controlando el flujo por medio del émbolo de la jeringa. Evaporar el eluido a sequedad con nitrógeno, a 50°C en un baño de agua y reconstituir en 250 µL de solución de inyección (Metanol: Agua: Ac. Acético 7:3:0,1 v/v/v)

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

Colocar en un vial con inserto para 400 µL el extracto reconstituido. Inyectar 20 µL en el HPLC (Agilent 1100), bajo las siguientes condiciones:

**Tabla 1.** Condiciones de trabajo en el HPLC

Condiciones del HPLC	Columna:	Zorbax SB-C18 (150 x 4,6 mm), partícula de 5 µm
	Temperatura de Columna:	30°C
	Detector de Fluorescencia:	Longitud de Onda de Excitación 330 nm, Emisión. 475 nm
	Fase móvil:	Acetonitrilo: Ac. Acético 0.2% en agua (49:51) (v/v)
	Flujo:	1 mL /minuto
	Volumen de Inyección:	20 µL
	Tiempo de Cromatografía:	10 minutos
	Tiempo de retención de la toxina:	7,125 minutos

### 3. Resultados

#### Validación de la metodología

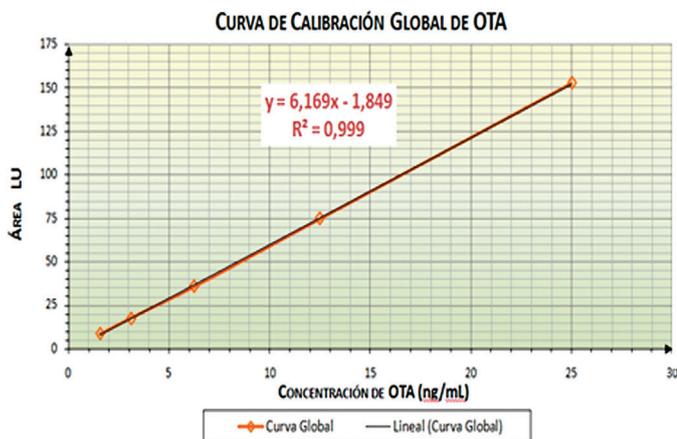
El límite de detección encontrado es de 0,90 µg de OTA por kilogramo de cacao en grano, lo cual indica, que el método es capaz de detectar cantidades muy bajas de la toxina. El límite de cuantificación encontrado para la determinación de la Ocratoxina A en cacao es 1,35 µg/kg de OTA, lo cual indica que el método puede medir concentraciones de OTA con exactitud y precisión a partir de 1,35 µg/kg.

**Tabla 2.** Limite de detección y cuantificación

Límite de detección ng/mL	Límite de detección µg/kg	Límite de cuantificación ng/mL	Límite de cuantificación µg/kg
0,90	0,45	2,70	1,35

El método tiene una alta correlación entre la concentración de OTA (ng/mL) y el área (LU), por lo tanto, es lineal entre 1,55 µg/kg y 25 µg/kg, lo que se demuestra gráficamente con un coeficiente de correlación igual a 0,999, como se observa en la figura 2, mediante la comparación del resultado por prueba t, en donde el t obtenido es mucho mayor al t tabulado, demostrando la correlación lineal entre estas dos variables.

Concentración (ng/mL)	Promedio Área LU
1,55	8,5966
3,1	17,5094
6,25	35,6970
12,5	74,7315
25	152,8370



PARÁMETROS	CURVA GLOBAL
m=	6,1698
L <sub>o</sub> =	-1,8496
S <sub>y,x</sub> =	0,8853
S <sub>m</sub> =	0,0464
SL <sub>o</sub> =	0,5989
t=	3,1824
t <sub>r</sub> =	132,9247
m <sub>min</sub> =	6,0221
m <sub>máx</sub> =	6,3175
L <sub>o min</sub> =	-3,7555
L <sub>o máx</sub> =	0,0562

**Figura 2.** Curva de calibración promedio de 5 días.

Mediante el estudio de varianza entre y dentro de los niveles (between and within) se establece que el método es preciso; debido a que se obtienen resultados repetitivos con una desviación estándar relativa de repetibilidad ≤ 20% y reproducibles con una desviación estándar relativa de reproducibilidad ≤ 30%, cumpliendo con los parámetros expuestos en la ecuación de Horwitz.

**Tabla 3.** Estudio de la precisión del método

Concentración de OTA µg/g	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
2,00	1,6786	1,721	1,8239	1,7022	2,0139
2,00	1,8491	1,413	1,6151	1,8393	1,5240
2,00	1,6965	1,428	1,9875	1,6191	1,5777
6,00	5,2171	5,548	5,3554	4,4972	4,6205
6,00	5,4389	5,894	4,4640	4,8368	4,2475
6,00	5,6602	5,042	4,8678	5,1061	4,4552
12,00	11,490	11,381	9,6032	9,3817	10,432
12,00	10,821	10,873	9,2004	9,0774	10,438
12,00	10,381	10,195	9,4713	10,652	9,5040
Concentración de OTA µg/g	SDCb	DCMb	SDCw	DCMw	
2,00	0,1379	0,0345	0,3164	0,0316	
6,00	2,3827	0,5957	1,1198	0,1120	
12,00	5,1599	1,2900	3,3914	0,3391	
Concentración de OTA µg/g	S <sub>r</sub>	RSD <sub>r</sub> %	S <sub>L</sub> <sup>2</sup>	S <sub>R</sub>	RSD <sub>R</sub> %
2,00	0,1779	8,894	0,0009	0,1805	9,025
6,00	0,3346	5,577	0,1612	0,5227	8,712
12,00	0,5824	4,853	0,3169	0,8100	6,750

Es exacto; debido a que presenta una recuperación media de  $84,55 \pm 0,33\%$ , cumpliendo con los requerimientos de recuperación expuestos por la UE (1) para este tipo de métodos que está entre 70 y 110%, debido a la distribución heterogénea de la toxina.

**Tabla 4.** Estudio de la exactitud

NIVEL ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5
2,00	87,17	76,00	89,17	85,83	85,17
6,00	90,61	91,56	81,61	80,22	73,94
12,00	90,61	90,14	78,53	83,33	84,36
<b>% RECUPERACIÓN PROMEDIO POR DÍA</b>	<b>89,46</b>	<b>85,90</b>	<b>83,10</b>	<b>83,13</b>	<b>81,16</b>
<b>% RECUPERACIÓN PROMEDIO TOTAL</b>	<b>84,55</b>				

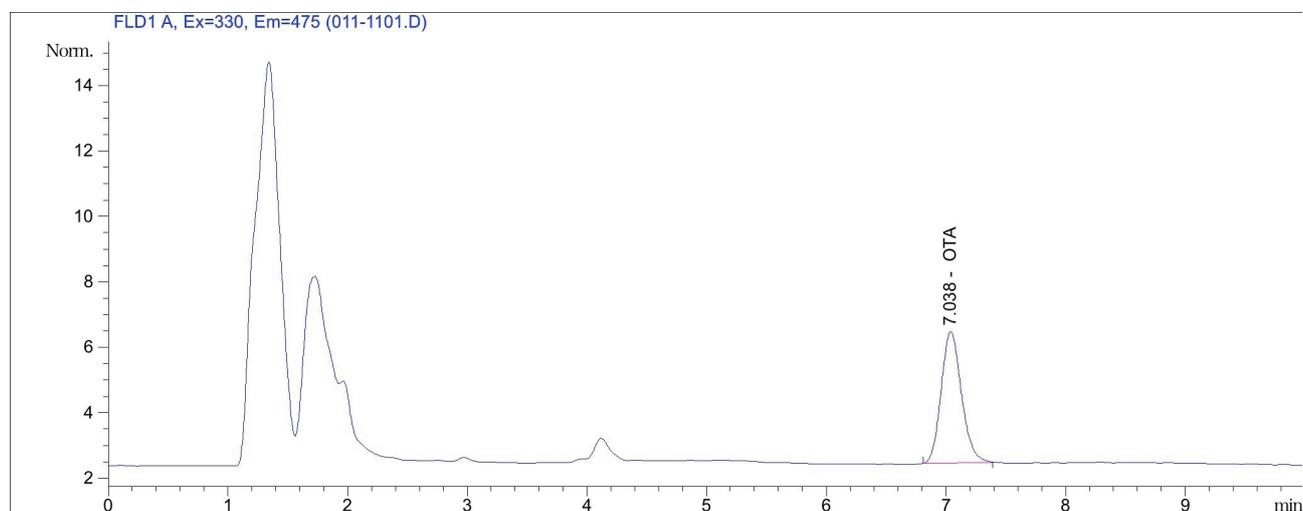
Y es selectivo; por no existir interferencia de la matriz, que se comprueba por una pureza de pico del 100%.

solución, ha sido validado experimentalmente siguiendo el protocolo de validación, en un rango de concentración de 1,35 a 15  $\mu\text{g}/\text{kg}$  y reúne todas las características para cumplir la norma ISO IEC 17025:2005 y además con los requerimientos de la UE (1) para esta determinación, lo que permite realizar controles de esta toxina en cacao, en un laboratorio dentro del país, pudiendo ofrecer un servicio garantizado al sector cacaotero.

## Estudio de los niveles de contaminación por Ocratoxina A en el cacao ecuatoriano de exportación

### Muestras

Para el control de esta micotoxina se trabajó a nivel de las exportadoras de cacao, con lotes de exportación de diferentes tamaños, y en cada cual, se estableció el sistema de muestreo y el número de muestras elementales que se tomó para establecer la muestra global.



**Figura 3.** Cromatograma de OTA

La incertidumbre expandida (U) presenta un valor de 0,53  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de OTA para un  $k=2$  correspondiente al 95% de confianza, lo cual indica que el método presenta un margen de error de  $\pm 0,53 \mu\text{g}/\text{kg}$  para cualquier medición, que representa un 39% de error en el límite de cuantificación. El método analítico para determinar Ocratoxina A en cacao en grano por Cromatografía Líquida de Alta Re-

### Muestreo

La cantidad del producto de la recolección de las muestras elementales se mezcla, y se divide en 4 partes iguales. Se eliminan dos porciones diagonalmente opuestas mientras las otras dos se mezclan de nuevo. Se repite hasta obtener el tamaño requerido de muestra reducida (1.500 gramos).

**Tabla 5.** Empresas asociadas a ANECACAO para la toma de muestras.

Número de Muestra	Provincia	Ciudad	Empresa Exportadora	
1		Daule	Transmar Ecuador	
2			Inmobiliaria Guangala	
3			Ecuacocoa S.A	
4	Guayas		Fund. Maquita Cushunchic	
5		Durán	Cofina S.A.	
6			Acmansa C.A.	
7			Casa Luker del Ecuador	
8			Triairi S.A.	
9			Quevedo	Exp. Agromanobanda
10				Pedro A. Martinetti M.
11	Los Ríos		Quelexport	
12			Gonzalo Martinetti Saltos	
13		Ventanas	Agroxven S. A.	
14	Sto. Domingo de los Tsáchilas	Sto. Domingo	Comexgar	
15			Exporcafé Cía. Ltda.	

El porcentaje de incidencia de contaminación por Ocratoxina A en la totalidad de las muestras analizadas de quince exportadoras, de tres provincias diferentes, es del 0%, con respecto al límite de cuantificación declarado para este método de 1,35 µg/kg.

**Tabla 5.** Empresas asociadas a ANECACAO para la toma de muestras

Exportadora (Nº de identificación)	Ocratoxina µg/kg	ACTIVIDAD DE AGUA (a <sub>w</sub> )	HUMEDAD PROMEDIO (%)
1	< 1,35	0,65	5,31
2	< 1,35	0,69	5,45
3	< 1,35	0,67	5,67
4	< 1,35	0,69	5,95
5	< 1,35	0,69	5,62
6	< 1,35	0,71	5,89
7	< 1,35	0,70	5,66
8	< 1,35	0,79	7,61
9	< 1,35	0,67	5,25
10	< 1,35	0,68	5,48
11	< 1,35	0,72	5,77
12	< 1,35	0,73	6,11
13	< 1,35	0,66	4,85
14	< 1,35	0,75	6,90
15	< 1,35	0,68	5,32
<b>Promedio General</b>	<b>&lt; 1,35</b>	<b>0,70</b>	<b>5,79</b>



**Figura 4.** Toma de la muestra

#### 4. Conclusiones

El límite de detección encontrado es de 0,90 µg de OTA por kilogramo de cacao en grano. El límite de cuantificación encontrado es 1,35 µg/kg de OTA. El método tiene una alta correlación entre la concentración de OTA (ng/mL) y el área (LU), por lo tanto, el método es lineal entre 1,55 µg/kg y 25 µg/kg, lo que se demuestra gráficamente con un coeficiente de correlación igual a 0,999, y mediante la comparación del resultado por prueba t de student, en donde el t obtenido es mucho mayor al t tabulado, demostrando la correlación lineal entre estas dos variables. Es preciso; debido a que se obtienen resultados repetitivos con una desviación estándar relativa de repetibilidad ≤ 20% y además reproducibles con una desviación estándar relativa de reproducibilidad ≤ 30%. Es exacto; debido a que presenta una recuperación media de 84,55 ± 0,33%. La incertidumbre expandida (U) presenta un valor de 0,53 para un k=2, expresada en porcentaje representa un 39% de error en el límite de cuantificación. La actividad de agua obtenida tiene un valor promedio de 0,70 ± 0,01 aw. El porcentaje de humedad obtenido de la

totalidad de las muestras analizadas de cacao cumple en un 91% con el requisito máximo expuesto en la Norma NTE INEN 176 para el cacao de exportación, lo que indica un buen manejo del producto dentro de las exportadoras. El porcentaje de incidencia de contaminación por Ocratoxina A en la totalidad de las muestras analizadas, de quince exportadoras, de tres provincias diferentes, es del 0%, con respecto al límite de cuantificación declarado para este método de 1,35 µg/kg.

## Agradecimientos

Al departamento de Nutrición y Calidad del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias, por permitirme llevar a cabo el presente trabajo y a todos/as quienes conforman el Laboratorio de Servicios de Análisis e Investigación en Alimentos. A los socios y técnicos/as de la Asociación Nacional de Exportadores de Cacao (ANECACAO), quienes mostraron un interés muy especial por el trabajo y por facilitar la toma de muestras.

## Referencias bibliográficas

1. UE. REGLAMENTO (UE) N° 105/2010 DE LA COMISIÓN de 5 de febrero de 2010. Bruselas, BE : Diario Oficial de la Unión, 2010.
2. Burdaspal, P. A. and Legarda, T. M. Ochratoxin A in samples of different types of chocolate and cacao powder, marketed in Spain and fifteen foreign countries. Madrid, ES : Alimentaria, 2003. 40, pp. 143-153.
3. Krogh, P. Mycotoxins in food. Ochratoxins in food. s.l. : Academic Press, 1987. pp. 97-121.
4. Miraglia, M. y Brera, C. Assessment of dietary intake of ochratoxin A by population of EU members states. Reports on tasks for Scientific Cooperation. Task 3.2.7. [En línea] 2002. [Citado el: 02 de abril de 2010.] [http://www.europa.eu.int/comm/food/fs/scoop/3.2.7\\_en.pdf](http://www.europa.eu.int/comm/food/fs/scoop/3.2.7_en.pdf).
5. Amésqueta, S., et al. Occurrence of ochratoxin A in cocoa beans: Effect of shelling. Pamplona, ES : Food Additives and Contaminants, 2005. Vol. 22, 6, pp. 590-596.
6. FAO. Discussion paper on ochratoxin A in cocoa. The Hague, NL : World Health Organization, 2008. Vol. CX/CF08/2/15.
7. IARC, International Agency for Research on Cancer. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans : some naturally occurring substances, food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. Lyon, FR : IARC Working group, World Health Organization, 1993. Vol. 56, pp. 489-521.
8. Serra Bonvehí, Josep. Occurrence of Ochratoxin A in cocoa products an chocolate. Barcelona : American Chemical Society, 9 de septiembre de 2004. Vol. 52, 20, págs. 6347-6352.
9. Aydin, G., et al. 22 Histopathologic changes en liver and renal tissues by ochratoxin A and melatonin in rats. s.l. : Human Expositions of Toxicology, 2003. pp. 383-391.
10. Moss, M. O. Mode of formation of ochratoxin A. s.l. : Food Additives and Contaminantes, 1996. 13 (supplement), págs. 5-9.
11. Brera, C., et al. High Performance liquid chromatographic. Method for the determination of Ochratoxin A in cocoa powder. Rome, IT : Journal Of Liquid Chromatography & Related Technologies, 2003. Vol. 26, 4, pp. 585-598.