**Determinación de Ocratoxina A en café producido en el Estado de Nayarit, México**

Carrillo Villalobos Regina2; Zambrano Soria M3; Bueno Durán A.Y2,3; Robledo Gutierréz R.G2; Navidad Murrieta M.S3; Ventura Ramón G.H2,3; Toledo Ibarra G.A1,3; Barcelos García R.G3; Girón Pérez M. I1,3.

Universidad Autónoma de Nayarit, 1Secreataría de Investigación y Posgrado, Laboratorio de Inmunotoxicología. 2Unidad Académica de Ciencias Químicas Biológicas y Farmacéuticas. Cd. De la Cultura Amado Nervo. C.P. 63000. Tepic, Nayarit. 3Unidad Especializada Laboratorio Nacional para la Investigación en Inocuidad Alimentaria-LANIIA-Unidad Nayarit. Centro Nayarita de Innovación y Transferencia de Tecnología A.C. Calle Tres S/N, Col. Cd. Industrial C.P. 63173. Tepic, Nayarit; México.

**RESUMEN:** La Ocratoxina A (OTA) es un metabolito fúngico producido por los hongos del género *Aspergillus* y *Penicillium*, está clasificada por la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC) como posiblemente carcinógeno para los seres humanos; grupo 2B, siendo una micotoxina neurotóxica, inmunosupresora, genotóxica, carcinógena y nefrotóxica. La presente investigación tiene como objetivo evaluar la presencia de Ocratoxina A en café producido en el Estado de Nayarit, México. Se analizó un total de 18 muestras de 6 diferentes productores de café tostado y molido en el estado. Las cuantificación de Ocratoxina A (OTA), se llevó a cabo mediante el método de inmunoafinidad ELISA. Los valores de micotoxinas están dentro de un rango de 15.51 µg/Kg a 351.28 µg/Kg. El 100% de las muestras están por arriba de los límites permisibles de OTA en café tostado y molido que es de 5 µg/Kg. Por lo que es necesario implementar prácticas para prevenir y reducir las concentraciones de OTA para evitar efectos perjudiciales por el consumo de alimentos contaminados.

1. **INTRODUCCIÓN.**
	1. Contaminación por micotoxinas.

La contaminación biológica de los alimentos se origina por la falta de higiene en algún punto de la elaboración o almacenamiento (Camean & Jiménez, 2012). Un tipo de contaminante biológico importante son las micotoxinas, las cuales son metabolitos fúngicos secundarios de bajo peso molecular, producidos por mohos filamentosos cuya ingestión, inhalación o absorción cutánea puede llegar a producir diferentes enfermedades, incluso a causar la muerte, a personas y animales y pérdidas económicas (Ramos., 2011).

* 1. Ocratoxina A.

La Ocratoxina A (OTA) es un metabolito fúngico producido por los hongos del género *Aspergillus* y *Penicillium*. Las especies principales implicados en la producción de OTA incluye *Aspergillus ochraceus, Aspergillus carbonarius, Aspergillus melleus, Aspergillus sclerotiorum, Aspergillus sulphureus, Pichia verrucossum* (Zain, 2011). La estructura química de la OTA consiste en un derivado de fenilalanina-dihidroisocumarina, compuesto de una 7-carboxi-5-cloro-8-hidroxi-3,4-dihidro-3-R-methylisocoumarina (ocratoxina α - resto OTα) y una molécula de L-β-fenilalanina (Phe), que están vinculados a través del grupo 7-carboxi mediante un enlace amida (Liuzzi & al., 2016). Es un compuesto estable que no es destruido por procedimientos comunes en la preparación de alimentos, se requiere temperaturas mayores a 250°C por varios minutos (Ramos., 2011).

* 1. Metabolismo de la Ocratoxina A y sus efectos tóxicos.

La OTA se absorbe en el tracto gastrointestinal y pasa a la circulación sistémica, detectándose en sangre y tejidos. Las concentraciones más altas se detectan en los órganos de mayor actividad metabólica como riñón, hígado, músculo y grasa (Abreu & al., 2011). Durante su distribución, tiene una alta capacidad de fijación a las proteínas plasmáticas, y presenta una vida media de eliminación larga. Tanto la OTA como sus metabolitos se excretan por vía renal y hepatobiliar, siendo la OT-α su principal metabolito (Soriano, 2007). También se han observado niveles de OTA en las secreciones lácteas lo cual constituye un riesgo para el recién nacido afectándolo de manera directa en su crecimiento y desarrollo (Abreu; et al; 2011). La OTA está clasificada por la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC) como posiblemente carcinógeno para los seres humanos; grupo 2B (IARC, 1993). Algunos de los efectos tóxicos son neurológicos, inmunosupresores, genotóxicos, carcinogénicos y teratogénicos (Abreu et. Al; 2011), además es un compuesto nefrotóxico y nefrocarcinogénico que se ha encontrado en los cereales, así también en otros productos como el café, el vino, las frutas secas, cerveza, jugo de uva (Zain, 2011) y productos de molienda (Abreu et al; 2011).

* 1. El café.

La planta del café pertenece al género *Coffea* que comprende más de 100 especies, de las cuales *Coffea arabica* y *Coffea canephora* constituyen el 99 % de la producción comercial mundial (Quintero, 2008). En el proceso de torrefacción, el café es tostado con calor seco a temperaturas entre 200 y 300° C con agitación contante. Durante este proceso las características físico-químicas son afectadas por el tostado, calidad industrial, mezclas de variedades de café y por las condiciones de almacenamiento, también la temperatura, presión y volumen de agua influyen. El contenido de agua del café verde es de aproximadamente 12.5%, por ello el grano de café es susceptible de ser contaminado por microorganismos y hongos, como consecuencia hay una alta probabilidad de que el café tostado esté contaminado por OTA dado que el tostado de café no es un proceso que asegure su total destrucción (Moraleja, 2016).

México cuenta con condiciones ideales para el cultivo del café, con zonas que se encuentran a altitudes mayores a 900 metros sobre el nivel del mar, así como temperaturas que van de los 17.5 a 25.3° C (SAGARPA, 2015). Las características geográficas adecuadas para la producción de café cereza van de una altitud de 600 a 1600 msnmm con lluvia de 1000 a 3000 mm y a una temperatura de 17 a 23 ° C. Por tal motivo, la producción está distribuida en 13 estados cafetaleros, destacando Chiapas, Veracruz, Puebla y Oaxaca como los principales productores y en donde se encuentra más del 80 % de la producción, 15% de la producción está en Guerrero, San Luis Potosí, Nayarit e Hidalgo y sólo el 1% en Jalisco, Querétaro, Colima y Tabasco (SIAP; 2016).

* 1. Normativa para OTA en café.

Actualmente, México no cuenta con normativas para ocratoxina A en alimentos. Sin embargo, existen reglamentaciones en otros países. La Unión Europea establece un límite de 5 µg/Kg para café tostado en grano y molido, excluido el café soluble (Diario Oficial de la Union Europea, 2006).

1. **ANTECEDENTES.**

Debido a la presencia de Ocratoxina en alimentos y bebidas típicas en la dieta humana, su estudio se ha convertido cada vez más importante. En el año 2000, un total de 162 muestras de granos de café verde de varios países (84 de África, 60 de América, y 18 de Asia) se analizaron para la OTA. Tanto la cantidad y la variabilidad de los niveles de OTA se ensayaron como una función de la procedencia de café verde. Los resultados mostraron que 106 de las muestras globales fueron positivos para OTA, la concentración que varió de 0 a 48 µL / kg (ppb) (Romani S, 2000).

En Costa Rica, Quintana y colaboradores (2007), estudiaron la presencia de la OTA A en 110 muestras de diferentes marcas de café tostado y molido de las 12 torrefactoras más importantes del país y de 7 supermercados. A excepción de una muestra de café que dio resultados negativos, el resto de muestras analizadas presentaron la micotoxina en cantidades menores a 4000 ng/L o kg.

Tozlovanu y Pfohl-Leszkowicz (2010) evaluaron el contenido de OTA de 30 cafés tostados comprados en los supermercados franceses, en el cual recuperaron OTA de 0,5 a 5 mg / kg. Y para el 2014, se realizó un estudio del café de exportación en 15 beneficios, ubicados en Chiriquí, región occidental de Panamá, donde se analizaron 21 muestras de café procesado (grano verde) (Pfohl-Leszkowicz, 2010 ). Mediante el método de inmunoafinidad ELISA, se encontró en la muestra, que cuatro de las 21 (19%) resultaron positivas a la presencia de OTA con un rango de 4,90-7,73 μg/kg; sólo tres de ellas superaron el límite máximo permitido por la Unión Europea para la concentración de OTA, que es de 5,0 μg/kg (Franco, 2014).

1. **JUSTIFICACIÓN.**

La presente investigación se enfocará en evaluar la presencia de Ocratoxina A en café, para establecer si el café producido y comercializado en el estado de Nayarit cumple con los límites máximos permisibles recomendadas por la comisión de la Unión Europea, y así mismo, descartar que la población está expuesta a los riesgos tóxicos, carcinogénicos y teratogénicos y como consecuencia pueda llegar a ser un problema socioeconómico y de salud importante.

1. **OBJETIVO GENERAL.**
* Evaluar la presencia de Ocratoxina A en café producido en el Estado de Nayarit, México.
	1. OBJETIVOS PARTICULARES:
* Cuantificar la Ocratoxina A en café producido en el Estado de Nayarit México.
* Aislar cepas ocratoxigénicas en las muestras de café de los diferentes beneficios para su posterior identificación
* Determinar la Humedad Relativa del café producido en el Estado de Nayarit, México.
* Evaluar la actividad de agua (aw) del café producido en el Estado de Nayarit, México.
1. **MATERIALES Y MÉTODOS.**
	1. Muestreo.

Se analizaran un total de 18 muestras de los 6 diferentes productores de café tostado en el estado de Nayarit, México; considerando los registros del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI, 2010).

* 1. Determinación de OTA.

Para la siguiente evaluación se realizará un inmunoensayo enzimático (ELISA) competitivo para el análisis cuantitativo de Ocratoxina A (RIDASCREEN FAST Ochratoxin A).

* 1. Análisis microbiológico de las muestras de café.

Se realizará de acuerdo a la norma NOM-111-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Método para la cuenta de Mohos y Levaduras en alimentos. Se pesará 10g de la muestra y se homogenizará en 90mL de solución reguladora de sulfatos, posteriormente se pasará 1 mL de esta solución a cajas Petri por duplicado y se verterá agar papa dextrosa acidificada, y de igual forma se pasará a agar Sabouraud; las cajas se incubarán a temperatura ambiente. Las colonias con características morfológicas de *Aspergillus* se pasarán al medio Czapek. Para la identificación de las especies fúngicas se observarán características macroscópicas y microscópicas de los cultivos aislados. Para el estudio microscópico se observará la morfología de los conidióforos y las dimensiones de los conidios a partir de tejido micelial teñido con azul de lactofenol.

* 1. Determinación de humedad

La determinación de humedad en granos de café tostado y molido se realizará de acuerdo con la NMX-F-013-2000. Café puro tostado, en grano o molido, sin descafeinar o descafeinado. Especificaciones y métodos de prueba.

* 1. Evaluación de actividad de agua (aw)

En cada muestra se evaluarán la aw utilizando un medidor (Aqualab®); el cual se calibrará previamente con agua destilada (aw=1.0) y soluciones de K2SO3 (aw=0.975), KCI y NaCl 6M (aw=0.760).

* 1. Análisis de datos.

La concentración de OTA en las muestras analizadas se obtuvieron por medio del software (Ridasoft Win.NET-FAST).

1. **RESULTADOS PRELIMINARES**

Se observa la curva de calibración realizada para el ensayo de cuantificación de OTA por la técnica de ELISA. El análisis de regresión lineal presentó un coeficiente de regresión de R2= 0.9812 con un límite de detección de 5 µg/Kg (Figura 1).

Figura 1: Curva estándar de Calibración para Ocratoxina A.

Se observa las concentraciones obtenidas en los 6 diferentes beneficios de café en el estado. Los valores de Ocratoxina A están dentro de un intervalo de 15.51 µg/Kg a 351.28 µg/Kg. El 100% de las muestras están por arriba de los límites permisibles de OTA en café tostado y molido que es de 5 µg/Kg (Tabla 1).

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Beneficio | Muestra | Conc. (µg/Kg) | Beneficio | Muestra | Conc. (µg/Kg) |
| A  | 1 | 93.73 | E | 10 | 351.28 |
| 2 | 65.35 | 11 | 23.56 |
| 3 | 89.83 | 12 | 109.25 |
| B | 4 | 62.66 | F | 13 | 108.68 |
| 5 | 64.14 | 14 | 116.49 |
| 6 | 64.18 | 15 | 149.05 |
| C | 7 | 28.47 | G | 16 | 124.84 |
| 8 | 85.71 | 17 | 47.50 |
| 9 | 94.55 | 18 | 15.51 |

Tabla 1: Niveles de Ocratoxina A.

 **DISCUSIÓN (AVANCES)**

Se detectó OTA en las 18 muestras analizadas (tabla 1) de los 6 beneficios, en el rango de 15.51 µg/Kg a 351.28 µg/Kg. La muestra 10 mostró el contenido más alto de OTA (351.285 µg/Kg). Todas las muestras están por arriba del límite máximo permisible por la Unión Europea de 5 µg/Kg (Diario Oficial de la Union Europea, 2006) dado que en México no hay normativa. La Ocratoxina A es reconocida internacionalmente como contaminante del café tostado, en estudios realizados en Francia (Tozlovanu y Pfohol-Leszkowicz, 2010), Reino Unido (Patel et al; 1997), España (Coronel et al; 2011) y Canadá (Lombaert et al; 2002), el alcance de OTA fue de 11.9 µg/Kg, 0.2-2.1 µg/Kg, 1.2-4.21 µg/Kg y 0.1-2.3 µg/Kg, respectivamente; mientras que en países como Chile (Galarce – Bustos et al; 2014), Brasil (Bandeira et al; 2012), Argentina (Drunday y Pacin; 2013) y México (Alvares et al; 2015), fue de 0.84 µg/Kg, 0.09-9 µg/Kg, 0.11-5.78 µg/Kg y 6.1-93.4 µg/Kg, respectivamente. De los cuales Francia, Brasil Argentina y México reportaron concentraciones que superaban el límite máximo permisible. Por lo tanto, los resultados determinados en esta investigación están por arriba de las concentraciones reportadas en otros países, sin embargo, se ha de resaltar que las concentraciones de OTA encontradas en Guerrero, México y las de esta investigación son las más altas, en comparación de otros países. Esto refleja el mal manejo o nulo de las buenas prácticas agrícolas y el manejo posterior a la cosecha, consistentes en técnicas apropiadas de secado, clasificación, transporte y almacenamiento (Malir et al. 2014).

1. **CONCLUSIÓN**

El análisis de muestras de café expendido en el estado de Nayarit muestra la presencia de Ocratoxina A en concentraciones mayores a los límites permisibles en las normas internacionales.

Con esta investigación se demuestra la necesidad de implementar prácticas para prevenir y reducir las concentraciones de OTA para evitar efectos perjudiciales por el consumo de alimentos contaminados con micotoxinas.

1. **REFERENCIAS**

Abreu, A. R., et al., e. (2011). La ocratoxina A en alimentos de consumo humano: revisión. *nutrición hospilataria*, 1215-1226.

Alvarez, P; et al (2015). Presencia de Ocratoxina A en ganos de cafpe de Atoyac de Álvarez. *Revista de Simulación y Laboratorio*. 36-40

BandeiraI, R., et al. ( 2012). Development and validation of a method for the analysis of Ochratoxin A in roasted coffee by liquid chromatography/electrospray-mass spectrometry in Tandem (LC/ESI-MS/MS). *Quím. Nova v*.

Camean, M., & Jiménez, M. R. (2012). *Toxicología alimentaria.* Madrid: Ediciones Diaz de Santos.

Diario Oficial de la Union Europea. (2006). reglamento (ce) no 1881/2006 de la comisión por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios . *Doc L364*, 16.

Drunday, V., & Pacin, A. (2013, ). Occurrence of Ochratoxin A in coffee beans, ground roasted coffee and soluble coffee and method validation. *Food Control*, 675-678.

Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura (FIRA). (2015). *Panorama Agroalimentario.* FIRA.

Franco, H. V. (2014). Niveles de Ocratoxina A y Aflatoxinas totales en cafés de exportación de Panamá por un método de ELISA. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 42-49.

Hernandez, A. G. (2010). *Tratado de nutrición. Composición y calidad nutritiva de los alimentos.* Madid: Editorial panamericana.

IARC. (1993). " Algunas sustancias de origen natural: los alimentos y constituyentes, aminas aromáticas heterocíclicas y micotoxinas ". *en CIIC Monografías sobre la evaluación de los riesgos carcinogénicos para los humanos*, 489-521.

Kabak. (2009). Ochratoxin A in cereal-derived products in Turkey: occurrence and exposure assessment. *Food Chem Toxicol.*, 348-52.

Liuzzi, V. C., & al., e. (2016). Transcriptional Analysis of Acinetobacter sp. neg1 Capable of Degrading Ochratoxin A. *Frontiers in Microbiology*.

Lombaert GA, P. P. (2002.). Survey of Canadian retail coffees for ochratoxin A. *Food Additives & Contaminants*, 869-77.

M.B. Coronel, S. M. (2011). Ochratoxin A in Spanish retail ground roasted coffee: Occurrence. *Food Control*, 414-419.

Malir, F., Ostry, V., Pfohl-Leszkowicz, A., Toman, J., Bazin, I., & Roubal., T. (2014 ). Transfer of Ochratoxin A into Tea and Coffee Beverages. *Toxins (Basel).* , 3438–3453.

Moraleja, A. G. (2016). Análisis y evaluación del riesgo de micotoxinas en café. Valencia: Universidad de Valencia.

Oscar Galarce-Bustos, M. A. (2010). Occurrence of Ochratoxin A in coffee beans, ground roasted coffee and soluble coffee and method validation. *Food Control*, 102-107.

Patel, C. H. (1997). Survey of ochratoxin A in UK retail coffees. *Food Addit Contam.*, 217-22.

Pfohl-Leszkowicz, M. T. (2010 ). Ocratoxina A en el café tostado de los supermercados franceses y transferencia en bebidas de café: Comparación de los métodos de análisis. *Toxinas*, 1928-1942.

Quintana Guzmán, E. M. (2007). Determinación de ocratoxina A en plasma humano y en café de Costa Rica por un método de ELISA. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 168-172.

Quintero, G. P. (2008). Calidad en taza de mezclas preparadas con granos de Coffea arabica y coffea canephora. *Cenicafé*, 183-203.

Ramos., A. J. (2011). *Micotoxinas y Micotoxicosis.* Madrid España: AMV ediciones.

Romani S, S. G. (2000). La detección de la presencia de ocratoxina A en los granos de café verdes de diferentes orígenes y tipos. *NCBI*, 3616-9.

Salgado, A. G. (2010). *Diagnotico y control de especies de Aspergillus productoras de ocratoxina A.* Madrid: Universidad Complutense de Madrid Facultad de Ciencias Biológicas.

Servicio De Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). (2016). *Atlas Agroalimentario 2016.* México.

Zain, M. E. (2011). Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi Chemical Society*, 129–144.