

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SEDE DE OCCIDENTE

Práctica dirigida para optar al grado de
Licenciatura en Laboratorista Químico

**Implementación de un método analítico para la
cuantificación de ocratoxina A, mediante la técnica de
cromatografía líquida de alta resolución con detección de
fluorescencia (HPLC-FLD) en café verde**

Nicole Ariana Rodríguez Alvarado

Alajuela, Costa Rica

HOJA DE APROBACIÓN

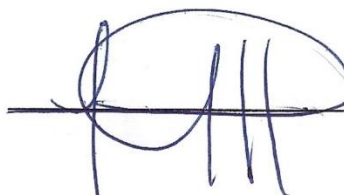
Esta práctica dirigida fue aceptada por la Comisión del Programa de Trabajos Finales de Graduación del Departamento de Ciencias Naturales de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar por el grado de Licenciatura en Laboratorista Químico.

Implementación de un método analítico para la cuantificación de ocratoxina A mediante la técnica de cromatografía líquida de alta resolución con detección de fluorescencia (HPLC-FLD) en café verde.

Mag. Esteban Pérez López
Presidente del tribunal



Mag. Laura Vindas Angulo
Miembro del tribunal



Lic. Diana Salas Cortés
Directora de tesis



Lic. Ing. Marvin Bogantes Jiménez
Miembro lector



M.Sc. Fabio Granados Chinchilla
Miembro lector



Nicole Ariana Rodríguez Alvarado
Sustentante

17 de enero de 2023

M.Ed. Maynor Badilla Vargas
Director
Sede Occidente
Universidad de Costa Rica

Carta de aprobación de cambios en TFG

Estimado director:

Reciba un cordial saludo.

Mediante la presente, yo Diana Salas Cortés, cédula 206010457, en mi condición de directora de la Práctica Dirigida titulada: **Implementación de un método analítico para la cuantificación de Ocratoxina A mediante la técnica de cromatografía líquida de alta resolución con detección de fluorescencia (HPLC-FLD) en café verde**, desarrollada por la estudiante de la carrera Bach. y Lic. en Laboratorista Químico, Nicole Rodríguez Alvarado, cédula 207200557, carné B25601, confirmo que se han incorporado las correcciones y sugerencias señaladas el día de la defensa pública (realizada el 14 de diciembre del 2022) al trabajo final de graduación.

Sin más, se suscribe atentamente:



Lic. Diana Salas Cortés

Directora TFG

Analista Químico NIRS-HPLC

Icafe

dsalas@icafe.cr

Constancia de revisión de la filóloga

23 de enero de 2023

Señores
Comisión de Trabajos Finales de Graduación
Universidad de Costa Rica
Sede de Occidente

Estimados señores:

La estudiante Nicole Ariana Rodríguez Alvarado, con cédula 2-0720-0557, me ha presentado para efectos de corrección de estilo, en mi calidad de profesional graduada en Filología Española de la Universidad de Costa Rica, el Trabajo Final de Graduación llamado *Implementación de un método analítico para la cuantificación de ocratoxina A, mediante la técnica de cromatografía líquida de alta resolución con detección de fluorescencia (HPLC-FLD) en café verde*, el cual ha elaborado para optar por el grado académico de Licenciatura en Laboratorista Químico de la Universidad de Costa Rica, Sede de Occidente.

De acuerdo con los lineamientos de la corrección de estilo señalados por la universidad, he revisado los aspectos de estructura gramatical, acentuación, ortografía, puntuación y los vicios de dicción que se trasladan al escrito, y he verificado que se han realizado todas las correcciones indicadas en el documento.

Por consiguiente, este trabajo se encuentra listo para ser presentado oficialmente a la universidad.

Atentamente,

CAROLINA
BERROCAL
SABORIO (FIRMA)

Firmado digitalmente por
CAROLINA BERROCAL
SABORIO (FIRMA)
Fecha: 2023.01.23 14:08:13
-06'00'

Máster Carolina Berrocal Saborío
Filóloga Española
Camé del Colypro 25046 - Acfil 057
berrocal.caro@gmail.com / 8861-5768

Dedicatoria

A mis padres: Damaris Alvarado y Luis Carlos Rodríguez, por su amor incondicional y por demostrarme siempre que, a pesar de las adversidades, el trabajo y el esfuerzo son valiosos para emprender en la vida.

Agradecimientos

Al espíritu infinito, por dirigirme a lo largo de esta aventura llamada vida y enseñarme que todo tiene una razón de ser.

A mi directora de TFG Diana Salas, por su comprensión, consejo, dirección, ánimo y apoyo sobre todo en los momentos más difíciles.

A las compañeras de Laboratorio del ICAFE: Yorleny Alpízar y Dylana Madrigal, por su disponibilidad, paciencia y apoyo.

A Roberto González, por la oportunidad de realizar esta práctica dirigida para el ICAFE.

A Fabio Granados, por sus valiosas recomendaciones y su gran aporte como lector.

Al profesor Marvin Bogantes, por su aporte como lector y su vocación docente, apoyo, consejo y guía a lo largo de la carrera.

A la profesora Laura Vindas, por animarme y encender una luz en el momento que consideré más crítico.

Al profesor Hans Zamora, por su apoyo, vocación docente y asesoría sobre cuestiones teóricas del presente trabajo.

Al profesor Luis Jiménez, por su invaluable seguimiento, buena disponibilidad y tiempo dedicado.

A todos los profesores que tuve a lo largo de la carrera, por todas las enseñanzas brindadas.

Mi amigo y compañero de carrera Andrés Navarro, por animarme siempre a ser perseverante e ir hacia adelante sin reparar en los obstáculos.

A mis padres Damaris Alvarado y Luis Carlos Rodríguez, por su apoyo y amor incondicionales a pesar de los tiempos difíciles.

A mi tía Flor Rodríguez, por todo el amor, apoyo, ánimos, comprensión, consejo y acogida bajo su techo mientras realizaba la presente práctica dirigida.

Implementación de un método analítico para la cuantificación de ocratoxina A, mediante la técnica de cromatografía líquida de alta resolución con detección de fluorescencia (HPLC-FLD) en café verde.

Directora: Diana Salas Cortés.

Palabras clave: ocratoxina A, café verde, HPLC, FLD, validación analítica.

Resumen

El café es una de las bebidas más consumidas en Costa Rica, lo cual hace que sea de vital importancia que este grano consumido a nivel nacional se encuentre libre de contaminantes, tal es el caso de las micotoxinas como la ocratoxina A (OTA), producida por hongos de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* (Panneerselvam *et al.*, 2002). Dado que el ICAFE como ente rector de la caficultura en Costa Rica tiene la responsabilidad de controlar y regular la seguridad del café que se consume en el país, en el presente trabajo se implementó un método de análisis de OTA en el laboratorio químico del ICAFE, mediante la técnica de HPLC-Fluorescencia en café verde y se realizó su validación. Para ello se buscó optimizar las condiciones analíticas del proceso de extracción y purificación de la OTA mediante dos pruebas: una de efecto de la matriz de café verde en el análisis y otra de verificación de la capacidad de extracción de las columnas de inmunoafinidad empleadas. También se realizó una prueba de idoneidad del sistema cromatográfico empleado en el análisis (comprobación de este sistema). En los resultados se encontró que la calidad (nivel limpieza y uniformidad de los granos) de la matriz de café verde no interfiere en el análisis, además de que la etapa de extracción de la OTA con columnas de inmunoafinidad genera bajas recuperaciones de esta (se obtuvo un valor promedio de 58%) debido al inadecuado control del goteo en la columna. Por otro lado, para la prueba de idoneidad se alcanzó un factor de capacidad de 6,19, un número de platos teóricos de 14297, un factor de asimetría de 1,3 y una precisión de la prueba de idoneidad de 1,3. De acuerdo con la validación, se encontró que el método es robusto y selectivo. Además, que no es veraz porque se obtuvo un porcentaje de recuperación promedio de 59%. También, para la repetibilidad se logró una desviación estándar relativa de 6,70, y límites de detección y cuantificación de 0,05 y 0,18 $\mu\text{g/L}$, respectivamente.

Índice general

Índice de figuras	xii
Índice de cuadros	xiii
Índice de ecuaciones	xiv
1. Introducción.....	1
1.1. Planteamiento del problema y justificación	1
1.2. Antecedentes	3
1.3. Objetivos.....	7
1.3.1. Objetivo general	7
1.3.2. Objetivos específicos.....	7
2. Marco Teórico.....	8
2.1. El café.....	8
2.1.1. Obtención del café verde.....	8
2.1.2. Variedades de café.....	9
2.2. Ocratoxina A	9
2.2.1. Absorción y toxicidad de la ocratoxina A en el organismo	11
2.2.2. Contaminación de la planta de café con ocratoxinas	11
2.2.3. Ocratoxina A en café y legislación pertinente	12
2.2.4. Métodos de determinación de ocratoxina A	13
3. Marco Metodológico.....	18
3.1. Ubicación geográfica del proyecto y método de análisis de ocratoxina en café verde.....	18
3.1.1. Descripción de la ubicación geográfico-temporal del proyecto	18
3.1.2. Descripción del método de análisis de ocratoxina A en café verde empleado en el laboratorio químico del ICAFE.....	18

3.1.3. Técnica de análisis empleada para el análisis de ocratoxina A en café verde	18
3.1.4. Equipo e instrumentación empleados para el análisis de ocratoxina A en café verde mediante HPLC.....	19
3.1.5. Preparación de las muestras y determinación por HPLC para el método de análisis de ocratoxina A en café verde	20
3.2. Optimización de las condiciones analíticas del proceso de extracción y purificación de ocratoxina A para su determinación en café verde a partir de las condiciones existentes en el laboratorio químico del ICAFE	22
3.2.1. Prueba del efecto de la matriz de café verde en el análisis de ocratoxina A por HPLC	22
3.2.2. Prueba de verificación de la capacidad de extracción de las columnas de inmunoafinidad empleadas en el análisis de ocratoxina A en café verde..	22
3.3. Optimización las condiciones instrumentales del HPLC para el análisis de ocratoxina A en café verde	23
3.3.1. Prueba de idoneidad del sistema cromatográfico	23
3.4. Validación del método de cuantificación de ocratoxina A en café verde de acuerdo con los parámetros de desempeño establecidos por el Ente Costarricense de Acreditación (ECA)	25
3.4.1. Selectividad.....	25
3.4.2. Veracidad y recuperación	26
3.4.3. Precisión	27
3.4.4. Límites de detección y cuantificación	29
3.4.5. Linealidad y sensibilidad.....	30
3.4.6. Robustez	31
3.4.7. Incertidumbre	34
4. Resultados.....	36

4.1. Resultados de la optimización de las condiciones analíticas del proceso de extracción y purificación de ocratoxina A para su determinación en café verde a partir de las condiciones existentes en el laboratorio químico del ICAFE.....	36
4.1.1. Resultados de la prueba del efecto de la matriz de café verde en el análisis de ocratoxina A por HPLC	36
4.1.2. Resultados la verificación de la capacidad de extracción de las columnas de inmunoafinidad empleadas en el análisis de ocratoxina A en café verde, mediante el método de HPLC-Fluorescencia.....	37
4.2. Resultados de la optimización de las condiciones instrumentales del HPLC para el análisis de ocratoxina A en café verde.....	39
4.2.1. Resultado de la prueba de idoneidad del sistema cromatográfico	39
4.3. Resultados de la validación del método de cuantificación de ocratoxina A en café verde de acuerdo con los parámetros de desempeño establecidos por el ente costarricense de acreditación (ECA).....	40
4.3.1. Resultados de la verificación de la selectividad del método de análisis de ocratoxina A en café verde, mediante la técnica de HPLC con detección de fluorescencia	40
4.3.2. Resultados de la verificación de veracidad del método de análisis de ocratoxina A en café verde, mediante la técnica de HPLC con detección de fluorescencia	41
4.3.3. Resultados de la verificación de la linealidad, sensibilidad y límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) del método de análisis de ocratoxina A en café verde, mediante la técnica de HPLC con detección de fluorescencia	42
4.3.4. Resultados de la verificación de precisión del método de análisis de ocratoxina A en café verde, mediante la técnica de HPLC con detección de fluorescencia	45
4.3.5. Resultado de la verificación de la robustez del método de análisis de ocratoxina A en café verde, mediante la técnica de HPLC con detección de fluorescencia	47

4.3.6. Resultado del cálculo de incertidumbre del método de análisis de ocratoxina A en café verde, mediante la técnica de HLPC con detección de fluorescencia	49
5. Discusión	50
5.1. Optimización de las condiciones analíticas del proceso de extracción y purificación de ocratoxina A para su determinación en café verde a partir de las condiciones existentes en el laboratorio químico del ICAFE	50
5.1.1. Prueba efecto de la matriz de café verde en el análisis de ocratoxina A por HLPC	50
5.1.2. Verificación de la capacidad de extracción de las columnas de inmunoafinidad empleadas en el análisis de ocratoxina A en café verde, mediante el método de HPLC-fluorescencia.....	50
5.2. Optimización las condiciones instrumentales del HPLC para el análisis de ocratoxina A en café verde	51
5.2.1. Prueba de idoneidad del sistema cromatográfico	51
5.3. Validación del método de cuantificación de ocratoxina A en café verde de acuerdo con los parámetros de desempeño establecidos por el ente costarricense de acreditación (ECA).....	53
5.3.1. Verificación de la selectividad del método de análisis de ocratoxina A en café verde, mediante la técnica de HLPC con detección de fluorescencia	53
5.3.2. Verificación de veracidad del método de análisis de ocratoxina A en café verde, mediante la técnica de HLPC con detección de fluorescencia	54
5.3.3. Verificación de la linealidad, sensibilidad y límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) del método de análisis de ocratoxina A en café verde, mediante la técnica de HLPC con detección de fluorescencia.....	54
5.3.4. Verificación de precisión del método de análisis de ocratoxina A en café verde, mediante la técnica de HLPC con detección de fluorescencia	56

5.3.5. Verificación de la robustez del método de análisis de ocratoxina A en café verde, mediante la técnica de HPLC con detección de fluorescencia	57
5.3.6. Incertidumbre del método de análisis de ocratoxina A en café verde, mediante la técnica de HPLC con detección de fluorescencia.....	57
6. Conclusiones.....	59
7. Recomendaciones.....	60
Referencias	61
Anexos.....	73

Índice de figuras

Figura 1. Secciones que constituyen el fruto del café, cáscara, mucílago, pergamino, grano. Elaboración en base a adaptación de Wang (2014), dicha autora a su vez hace referencia a Wintgens (2004b).	8
Figura 2. Apariencia de una muestra de café trillada (café verde) (Boyacá, 2018).	9
Figura 3. Fórmula estructural de la ocratoxina A (Gallo <i>et al.</i> , 2012), conformada por un anillo 3,4- dihidro metil isocumarina con una fenilamina, que a su vez se une a un grupo amino a través de un grupo carboxilo (Ravelo <i>et al.</i> , 2011).....	10
Figura 4. Cromatogramas obtenidos para la verificación de la Selectividad. A. Cromatograma del estándar de ocratoxina A. B. Cromatograma del blanco de la matriz de café verde. C. Cromatograma de la muestra de café verde enriquecida.	41
Figura 5. Gráfico del promedio de las Áreas contra Concentración de las tres curvas de calibración de Ocratoxina A realizadas para la verificación de la linealidad y sensibilidad del método de análisis de Ocratoxina A en café verde mediante la técnica de HLPC-FLD.	43
Figura 6. Gráfico de la prueba de igualdad de varianzas para las tres curvas de calibración de Ocratoxina A realizadas en la verificación de la linealidad y sensibilidad del método de análisis de Ocratoxina A en café verde mediante la técnica de HLPC-FLD. Elaboración propia con Minitap 19.....	44
Figura 7. Gráfico del estudio de reproducibilidad basado en los Z-Score pertenecientes a los laboratorios participantes en el estudio interlaboratorial realizado por FAPAS dónde se muestra que el rango de $-2 \leq x \leq 2$ deben encontrarse el 95% de los Z-scores obtenidos para dichos laboratorios (FAPAS, 2018). 47	

Índice de cuadros

Cuadro 1. Parámetros de operación del equipo de HPLC para cuantificación de ocratoxina A mediante la técnica de HPLC-Fluorescencia, ICAFE (2020). ..	19
Cuadro 2. Preparación de la curva de calibración de Ocratoxina A.....	21
Cuadro 3. Experimentos realizados para la prueba de robustez realizada para la validación del método de análisis de ocratoxina A en café verde mediante la técnica de HPLC-FLD.	33
Cuadro 4. Resultados obtenidos del efecto de la matriz de café verde de menor y mayor calidad en el análisis de Ocratoxina A mediante HPLC-FLD.	37
Cuadro 5. Resultados de la prueba de verificación de la capacidad de extracción de las columnas de inmunoafinidad mediante la técnica de HPLC-FLD.....	38
Cuadro 6. Verificación de la capacidad de extracción de las columnas de inmunoafinidad comparando los resultados de porcentajes de recuperación obtenidos entre réplicas de enriquecidas de 10,2 µg/L y las réplicas del estándar de 12,2 µg/L.....	39
Cuadro 7. Resultados de la prueba de idoneidad del sistema cromatográfico empleada para la optimización de las condiciones instrumentales del cromatógrafo líquido de alta resolución para el análisis de ocratoxina A en café verde.	40
Cuadro 8. Resultados de las recuperaciones relativas de diez muestras enriquecidas (10,2 µg/L) del mismo control de café verde obtenidos para la prueba de veracidad del método de Ocratoxina A mediante HPLC-FLD.....	42
Cuadro 9. Resultados obtenidos de límites de detección y límite de cuantificación obtenidos para la validación del método de Ocratoxina A con HPLC-FLD. ..	45
Cuadro 10. Resultados de repetibilidad obtenidos para la prueba precisión del método de Ocratoxina A en café verde con HPLC-FLD.	46
Cuadro 11. Resultados obtenidos de la verificación de la robustez realizada para la validación del método de Ocratoxina A en café verde con HPLC-FLD.....	48
Cuadro 12. Resultado de incertidumbre expandida con un 95% de confianza calculada en base al coeficiente de variación de Hortwitz, para el método de análisis de Ocratoxina A en café verde mediante la técnica de HPLC-FLD.	49

Índice de ecuaciones

Ecuación 1. Cálculo del factor de capacidad (k') (Aguirre <i>et al</i> , 2001).	23
Ecuación 2. Cálculo del porcentaje de recuperación relativa empleado en las muestras enriquecidas de OTA en café verde para la verificación de la veracidad mediante el método de HPLC-Fluorescencia. (Magnusson y Örnemark, 2014). ..	26
Ecuación 3. Cálculo de la desviación estándar relativa de la repetibilidad para la verificación de la precisión del método de análisis de ocratoxina en café verde mediante la técnica de HPLC-FLD (Quezada, 2009).	27
Ecuación 4. Cálculo de Z-Score empleado por FAPAS (2018) para el medir la reproducibilidad de la prueba interlaboratorial del análisis de ocratoxina A en café verde.....	29
Ecuación 5. Cálculo del límite de detección para validación del método de análisis de ocratoxina A en café verde (Skoog <i>et al.</i> , 2015).....	30
Ecuación 6. Cálculo del límite de cuantificación para validación del método de análisis de ocratoxina A en café verde (Herrera <i>et al.</i> , 2008).....	30
Ecuación 7. Ecuación para el cálculo del coeficiente de variación de Horwitz (Duffau <i>et al.</i> , 2010).	35
Ecuación 8. Ecuación empleada para el cálculo de la incertidumbre expandida con un 95% de confianza del método de análisis de ocratoxina A en café verde mediante la técnica de HPLC con detección de Fluorescencia (Rivera y Rodríguez, 2010). 35	

1. Introducción

1.1. Planteamiento del problema y justificación

El café es una bebida de alto consumo a nivel mundial y Costa Rica como país productor no se ve exento de dicha tendencia. La Organización Mundial del Café, conocida por sus siglas en inglés como OIC, en su más reciente estudio (en el año 2016), lo colocó como el segundo país de Latinoamérica donde más se consume café, antecedido solo por Brasil (Barquero, 2017).

Esta situación asegura que el café consumido en el país se encuentre libre de contaminantes como las micotoxinas, las cuales son toxinas secretadas por hongos. Una de las micotoxinas que más destaca es la ocratoxina A (OTA), que es relevante debido a su presencia común en diversos alimentos y su toxicidad (Luna *et al.*, 2010). Es común encontrar restos de esta en el café cosechado (Díaz *et al.*, 2018).

La ocratoxina A se caracteriza por ser una sustancia resistente a la descomposición debido a que es estable a altas temperaturas y a la acidez (ELIKA, 2013). Además, se destaca por sus propiedades nefrotóxicas, teratogénicas, inmunotóxicas y cancerígenas (Davidovich *et al.*, 2019). En cuanto a sus propiedades bioquímicas, se absorbe con facilidad en el tracto gastrointestinal y al integrarse a la sangre, debido a su alta afinidad por las proteínas plasmáticas, se vuelve persistente en el organismo, su descarte se realiza por medios renales, hepatobiliares y secreciones lácteas (López de Cerain *et al.*, 2000).

La OTA es producida principalmente por hongos de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* (Panneerselvam *et al.*, 2002), siendo *Aspergillus* el más frecuente en regiones tropicales (Ravelo *et al.*, 2011), tales como Centroamérica, dado que, generalmente, los hongos que la producen suelen desarrollarse a temperaturas entre 25 y los 40 °C (Cruceiro *et al.*, 2013).

Dicha toxina puede encontrarse comúnmente en café, vino, jugo de uva, pan, cerveza, cereales y carnes (Davidovich *et al.*, 2019). En lo que respecta al café, debe tenerse en cuenta que durante todas las etapas de producción hasta su

consumo puede contaminarse con hongos productores de la OTA (Davidovich *et al.*, 2019).

Debido a la propensión del café a contaminarse con OTA, es verdaderamente importante evaluar los niveles de esta en el café que se comercializa en el mundo. Esto ocasionó que muchos países buscaran establecer valores máximos de OTA en café, de modo tal que la Unión Europea establece un valor máximo de 3 µg/kg de OTA para el café tostado y molido (Reglamento UE, 2022/1370). Otro ejemplo es Brasil, que ha establecido para el mismo tipo de café un valor máximo de 10 µg/kg (Resolução ANVISA, RDC No 7).

De hecho, la mayoría de los países han determinado niveles máximos permisibles para el café tostado, pero no para el café verde; sin embargo, el Centro de Comercio Internacional (2011) recomienda que el café verde no exceda los 15 µg/kg. En Costa Rica, según Davidovich *et al.* (2019), aún no se definen niveles máximos para la presencia de dicha micotoxina en café verde (tampoco en café tostado), de modo que no existe en el país legislación o reglamentación al respecto.

Ahora bien, en cuanto a las metodologías analíticas empleadas para verificar los niveles de OTA en café, se ha empleado variedad de metodologías analíticas, tales como la cromatografía líquida de alta resolución acoplada a detectores de masas (Nielsen *et al.*, 2015; Kokina *et al.*, 2016), cromatografía líquida de alta resolución acoplada a detector de fluorescencia (Barcelo *et al.*, 2017), ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (Garrido-Ramírez *et al.*, 2018), transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (Tang *et al.*, 2020), fluorimetría (Díaz *et al.*, 2018), transformada de Fourier (Bozza *et al.*, 2013), y técnicas que emplean aptámeros (Liu *et al.*, 2020).

De las anteriores, la técnica analítica más aceptada es la establecida por la Asociación Oficial de Química Analítica (conocida como AOAC por sus siglas en inglés) en su método 2004.10, el cual señala el uso de columnas de inmunoafinidad para la purificación de la muestra y de la cromatografía líquida de alta resolución con espectroscopía de fluorescencia para su detección (AOAC, 2016).

Por otro lado, la presente práctica dirigida se llevó a cabo en el Instituto del Café de Costa Rica (ICAFFE), el cual es una institución pública no gubernamental

que funge como rectora en el país en materia de caficultura. Entre sus objetivos están: la promoción de un modelo de producción único y equitativo entre productores, beneficiarios, tostadores y exportadores nacionales; el apoyo a la producción, procesado, exportación y comercialización del café de Costa Rica; la promoción del consumo nacional e internacional del café costarricense; la investigación y desarrollo de tecnologías agrícolas e industriales en el campo y la aprobación de un precio mínimo que debe pagar el beneficio de café al productor (Icafe, 2015).

El ICAFE, como ente rector, posee la responsabilidad de controlar y regular también la calidad y seguridad del café que se consume en el país; gracias a esto, dicho ente pretende implementar un método de análisis que permita la cuantificación del nivel de ocratoxina A en café verde y realizar la respectiva validación de este. Es así como mediante el presente trabajo se implementó una metodología de análisis cuantitativa de ocratoxina A en café verde, por medio de la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en el Instituto del Café de Costa Rica (Icafe) ubicado en Barva de Heredia, Costa Rica.

1.2. Antecedentes

Existe gran cantidad de información sobre ensayos de cuantificación de OTA que puede dividirse en dos grandes grupos: ensayos cromatográficos e inmunoensayos. Sin embargo, antes de realizar cualquiera de estos ensayos, la muestra debe prepararse mediante procesos de extracción y purificación, los cuales se llevan a cabo con disolventes orgánicos y columnas de purificación. Entre las columnas más comunes se encuentran las de inmunoafinidad (conocidas por sus siglas en inglés como IAC), las multifuncionales (tanto de succión como de presión), cartuchos de extracción en fase sólida y cartuchos de equilibrio lipofílico (Prelle *et al.*, 2013).

En Italia, Prelle *et al.* (2013) realizaron un análisis comparativo al emplear columnas de inmunoafinidad, columnas multifuncionales, cartuchos de extracción en fase sólida, cartuchos de equilibrio lipofílico y columnas de cartucho de polímero

molecularmente impreso (conocidas por sus siglas en inglés como MIP), con el fin de optimizar la purificación de distintos alimentos, para lo cual cuantificaron el porcentaje de recuperación de OTA. Estos autores encontraron que las columnas más adecuadas para analizar muestras de café son las columnas MIP.

En cuanto a las IAC, Barcelo *et al.* (2017), en Filipinas, extrajeron muestras de granos de café empleando una de estas columnas, donde la extracción previa fue llevada a cabo por medio del remojo del café en metanol y bicarbonato de sodio en disolución acuosa, luego estas fueron eluidas en la columna IAC.

Entre los métodos de detección empleados para analizar OTA se encuentran: HPLC, ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (conocido como ELISA por sus siglas en inglés), la fluorimetría y los novedosos aptámeros asociados a diversas técnicas de detección. En cuanto a los métodos cromatográficos mencionados, se han empleado: HPLC-FLD y HPLC-Masas.

Es importante resaltar que al comparar ELISA con la técnica convencional de HPLC-FLD para ensayos de OTA en café verde se han encontrado resultados equivalentes en cuanto a su sensibilidad. Por ejemplo, Fujii *et al.* (2006) realizaron una comparación de este tipo, y obtuvieron una correlación entre HPLC-FLD y ELISA de 0.90, con límites de detección de 0.80 ngg⁻¹ y 3.75 ngg⁻¹, respectivamente.

A nivel centroamericano, se encuentra el estudio de Vallejos (2006) en Nicaragua, mediante el cual se compararon tres métodos de análisis de OTA en café verde, con el objetivo de evaluar cuál de ellos resultaba más eficaz, de amplio alcance y de bajo costo. Los métodos empleados fueron: la cromatografía de capa fina, HPLC-fluorescencia y fluorimetría por medio de un VICAM Ochratest. El autor concluyó que el método de cromatografía de capa fina no es óptimo debido a su carácter cualitativo y al alto precio de los reactivos utilizados, por lo cual VICAM Ochratest resultó ser una muy buena alternativa, ya que es barata y brinda resultados equiparables a los obtenidos por medio de HPLC.

Ahora bien, existen los inmunoensayos dentro de los cuales ELISA es el más utilizado para el análisis de OTA. Por su parte, Quintana *et al.* (2007), en Costa Rica, analizaron muestras de café tostado y molido en busca de OTA, por medio de la técnica de ELISA en la UCIMED. Las muestras de café fueron obtenidas de doce

principales torrefactores del país y de siete supermercados en lo que se se encontró que la mayoría de las muestras contenían OTA en cantidades menores a 4000 ngL^{-1} .

Mientras tanto, Kokina *et al.* (2016), en Letonia, desarrollaron un método utilizando HPLC acoplado a un espectrómetro de masas con trampa de triple cuadrupolo (HPLC-MS/MS), para analizar muestras de granos de café y café expreso. Para la extracción, en este ensayo se utilizó una mezcla de metanol y agua, y la purificación se llevó a cabo a través de una IAC. Dichos autores obtuvieron una buena correlación lineal ($r^2 > 0.998$), gran precisión con una desviación estándar relativa menor de 2,9% y un porcentaje de recuperación del 94%.

Por otro lado, se han creado fluorómetros específicos para el análisis de OTA. Por ejemplo, Díaz *et al.* (2018) analizaron OTA en granos de café verde en Perú, empleando uno de estos fluorómetros. Los autores evaluaron la relación entre la OTA y las buenas prácticas de higiene (BHP) en varios establecimientos cafetaleros y encontraron concentraciones más altas de OTA en café con mayor contenido de humedad y que, de igual modo, donde había un mayor cumplimiento de las BHP, había menor contenido de ocratoxinas.

También, se han empleado ácidos nucleicos de cadena sencilla llamados aptámeros en el análisis de ocratoxina A (Ha, 2015). Estos se diseñan sintéticamente y requieren de un marcador con tinte fluorescente, enzimas, biotina, o compuestos aminados, según sea el caso (Barthelmebs *et al.*, 2011). Por su parte, Liu *et al.* (2020), en China, analizaron muestras de café. El ensayo consistió en la incubación del aptámero con ADN complementario (ADNc), se añadió una solución horquilla H para hibridar, y con una exonucleasa se separó el ADN de cadena sencilla del ADNc, luego añadieron óxido de grafeno y cuantificaron con el espectrofotómetro de fluorescencia. El ensayo tuvo muy buena sensibilidad al obtener un límite de detección de 0.96 nm.

Es importante mencionar que pese a la existencia del trabajo de Quintana *et al.* (2007) con la técnica de ELISA, no existen en el país más estudios que involucren ensayos de detección de OTA en café, así como tampoco existe

información de que hayan empleado el método de cromatografía líquida de alta resolución con detección de fluorescencia.

La técnica de análisis para OTA en café verde con mayor aceptación es la especificada en el método oficial AOAC 2004.10, el cual requiere columnas de inmunoafinidad acopladas a un colector de vacío (Manifold) para la extracción de la OTA (AOAC, 2016). Aunado a esto, la técnica de HPLC-FLD para el análisis de OTA en café verde brinda un buen poder de separación, pues se obtienen cromatogramas bien definidos sin interferencias en el tiempo de retención de la OTA (Santos y Vargas, 2002).

1.3. Objetivos

1.3.1. *Objetivo general*

Implementar un método de cuantificación de ocratoxina A en café verde, mediante la técnica de cromatografía líquida de alta resolución con detección de fluorescencia (HPLC-FLD), en el Instituto del Café de Costa Rica (ICAFFE).

1.3.2. *Objetivos específicos*

- Optimizar las condiciones analíticas del proceso de extracción y purificación de ocratoxina A para su determinación en café verde a partir de las condiciones existentes en el Laboratorio Químico del ICAFFE.
- Optimizar las condiciones instrumentales requeridas por el HPLC para el análisis de ocratoxina A en café verde.
- Validar el método de cuantificación de ocratoxina A en café verde de acuerdo con los parámetros de desempeño establecidos por el Ente Costarricense de Acreditación (ECA).

2. Marco Teórico

2.1. El café

Se denomina café al grano contenido en los frutos cosechados a partir de plantas del género *Coffea* (Sánchez, 2020). Dichos frutos, tal como lo menciona Toledo (2015), están constituidos por las siguientes secciones (véase Figura 1): cáscara, mucílago (cubierta resbalosa y azucarada), pergamino (cobertura cartilaginosa) y grano.

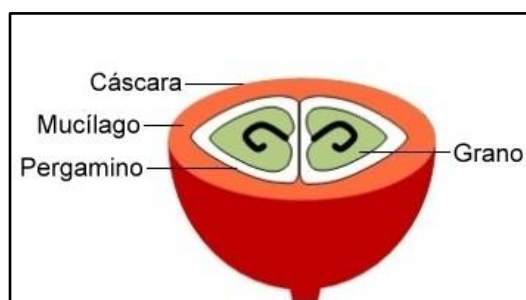


Figura 1. Secciones que constituyen el fruto del café, cáscara, mucílago, pergamino, grano. Elaboración en base a adaptación de Wang (2014), dicha autora a su vez hace referencia a Wintgens (2004b).

2.1.1. Obtención del café verde

Ahora bien, luego de la cosecha y tal como lo indica Boyacá (2018), mediante el proceso conocido como beneficio húmedo, los frutos se someten a fermentación con la finalidad de eliminar el mucílago del café. El producto resultante se conoce como café en pergamino, el cual posteriormente se somete a un proceso de trilla (donde se retira mecánicamente el pergamino que recubre el café) para obtener lo que se conoce como el café verde (véase Figura 2). Este café, a su vez, se clasifica para seleccionar los granos más uniformes y luego se lleva a cabo el proceso de tostado (Chugá, 2018). Dicho café tostado es empleado en la preparación de la bebida del café.



Figura 2. Apariencia de una muestra de café trillada (café verde) (Boyacá, 2018).

2.1.2. **Variedades de café**

El género *Coffea* cuenta con más de cien especies diferentes que se han desarrollado de acuerdo con las características propias de cada región y clima. Sin embargo, únicamente se comercializan las especies *Coffea arabica* y *Coffea canephora*, donde cada una de estas cuenta con diferentes variedades, siendo las pertenecientes a *C. canephora* las que producen una bebida de menor calidad y, por ende, su cultivo no es tan extenso como *C. arabica*, la cual abarca un 60% de la producción mundial (Anacafé, 2019).

En la región centroamericana, la especie más cultivada es la *C. arabica*, de la cual, tradicionalmente, se han cultivado la variedad Borbón y mutaciones naturales de este como lo son: Caturra, Pacas, Villa Sarchí; así como también su variedad típica y mutaciones naturales como Maragogipe, además de variedades híbridas, por ejemplo, el Catuai (híbrida entre Borbón y Típica), Costa Rica 95 Catimor (híbrida entre Caturra y Timor), Centroamericano (híbrida de Sarchimor y Rume de Sudan), Casiopea (híbrida de Caturra y una variedad etíope conocida como ET41) entre otros (World Coffee Research, 2018).

2.2. **Ocratoxina A**

Las ocratoxinas son micotoxinas, es decir, metabolitos secundarios secretados por hongos de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*, que se dividen en cinco tipos, a saber: las ocratoxinas A, B, C, α y β ; de las cuales la A es la más relevante, debido a que resulta ser la más tóxica del grupo (Serrano-Coll y Cardona-Castro, 2015).

En lo que respecta a la estructura de la OTA, en la Figura 3 se aprecia su fórmula estructural, la cual evidencia que es un compuesto orgánico conformado por un anillo 3,4- dihidro metil isocumarina con una fenilamina, que a su vez se une a un grupo amino a través de un grupo carboxilo (Ravelo *et al.*, 2011). La OTA es una sustancia moderadamente soluble en disolventes orgánicos como el cloroformo, metanol y acetonitrilo, además de ser soluble por completo en disoluciones acuosas de bicarbonato de sodio e insoluble en agua (AFHSE, 2015; Ravelo *et al.*, 2011).

Entre otras características fisicoquímicas, su molécula posee una masa molar de 403 g/mol y una estabilidad térmica hasta los 180 °C (Silupu *et al.*, 2021). Además, es una sustancia incolora, con propiedades de ácido débil, emisión de fluorescencia bajo la luz ultravioleta (Ravelo *et al.*, 2011) y gran estabilidad a altas temperaturas y acidez (ELIKA, 2013).

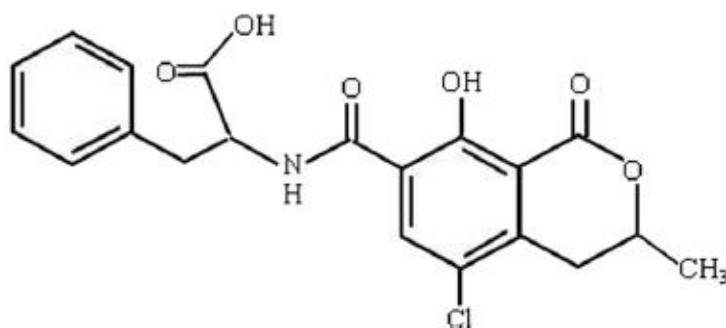


Figura 3. Fórmula estructural de la ocratoxina A (Gallo *et al.*, 2012), conformada por un anillo 3,4- dihidro metil isocumarina con una fenilamina, que a su vez se une a un grupo amino a través de un grupo carboxilo (Ravelo *et al.*, 2011).

2.2.1. Absorción y toxicidad de la ocratoxina A en el organismo

La ocratoxina A se absorbe con facilidad en el tracto gastrointestinal y al ser afín a las proteínas plasmáticas se disuelve con facilidad en la sangre y es persistente en el organismo, y este la desecha por medios renales, hepatobiliares y secreciones lácteas (López de Cerain *et al.*, 2000).

La ingesta de OTA provoca daño tubular renal y fibrosis en aves, peces y mamíferos; así mismo, se conoce que es teratógena gracias a observaciones realizadas en roedores y pollos. Se le atribuyen propiedades inmunosupresoras, genotóxicas y cancerígenas (Cameán y Repetto, 2012). En humanos ha demostrado ocasionar incremento de las enfermedades de riñón y nefropatías (Karoki *et al.*, 2018). También, ha sido clasificada por la Agencia Interamericana del Cáncer (IARC), desde 1993, como posible cancerígeno (grupo 2B) (Kocsubé *et al.*, 2013). La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria, conocida como EFSA por sus siglas en inglés, ha definido una ingesta semanal tolerable de ocratoxina A de 120 ng/kg de peso corporal (ELIKA, 2020).

2.2.2. Contaminación de la planta de café con ocratoxinas

La ocratoxina A puede ser encontrada comúnmente en cereales, carne, leche, queso, uva, vino, especias, café y derivados de estos (Kocsubé *et al.*, 2013), donde la contaminación por ocratoxina A se da por medio de la secreción de los entes fúngicos en el producto vegetal. El café con frecuencia se ve afectado por dicha contaminación, donde los hongos secretan las micotoxinas en sus frutos o granos. Los hongos no suelen crecer en la planta, sino en el sustrato y variedad de elementos presentes en él, tales como hojas y frutas caídas, sin embargo, sus esporas se esparcen por medio del viento en el ambiente (Couceiro *et al.*, 2013).

Las plantas de café en el campo están expuestas a gran variedad de factores de contaminación y en cualquier momento pueden ocurrir salpicaduras de fuente animal e inclusive humana, aunado a esto, durante la poda puede suceder contaminación cruzada (de los hongos productores de OTA entre plantas), y una

vez la fruta está lista para cosechar, el hecho de que sea recogida manualmente implica exposición al contacto humano (Vaughan *et al.*, 2015). Después, las frutas se someten a procesos de secado para separarlas del grano durante varios días, donde un secado deficiente y húmedo fomenta su fermentación, lo cual puede dar cabida al crecimiento de organismos productores de micotoxinas (Barcelo *et al.*, 2017).

La contaminación del café, principalmente, se atribuye a *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus westerdijkiae* y *Aspergillus steynii* (Gallo *et al.*, 2012), con la particularidad de que en cualquiera de las etapas de manipulación del producto, desde el momento de la siembra, pasando por su cosecha, secado, procesamiento, transporte, almacenamiento y las condiciones adecuadas de temperatura y humedad, puede dar cabida a la contaminación del producto (Reverberi *et al.*, 2012). Al tomar en cuenta que la temperatura promedio anual propicia para el café está comprendida entre los 17 y 23° C y que la humedad relativa de sobrepasar el 85% puede originar el crecimiento de entes fúngicos (Icafe, 2011), tales como *Aspergillus*, que crece entre los 12-37 °C y se asocia a climas tropicales; y *Penicillium*, que crece entre los 4-31 °C, se encuentra comúnmente en regiones con climas más templados o fríos (Ravelo *et al.*, 2011).

2.2.3. Ocratoxina A en café y legislación pertinente

La OTA, al ser termoestable, es una sustancia difícil de eliminar aún en alimentos que ya han sido tratados a altas temperaturas, como el caso del café (Ravelo *et al.*, 2011) quienes indican que ni con los procesos de tostado y preparación de la infusión de café se asegura la destrucción de dicha toxina. En cuanto a la reducción de la OTA, según López de Cerain y Soriano del Castillo (2007), después del tostado del café verde numerosos estudios han observado reducciones mayores o iguales al 80% y luego de la preparación de la infusión de café tostado se han encontrado reducciones no superiores al 50%.

El hecho de que la OTA sea una sustancia difícil de erradicar hace evidente la importancia de asegurar un correcto control de la higiene en la producción del

café verde para disminuir la exposición de los consumidores a esta (López de Cerain y Soriano del Castillo, 2007). Lo anterior, también hace que sea necesario asegurar mediante análisis cuantitativos los niveles de OTA en el café verde.

Actualmente, Costa Rica carece de reglamentos que regulen los niveles máximos de ocratoxina A tanto en café verde como en tostado café, sin embargo, la Unión Europea ha establecido valores máximos permisibles de 3 µg/kg para el café tostado y molido y 5 µg/kg para el café soluble (Reglamento UE, 2022/1370). En el continente americano, en Brasil, se ha establecido tanto para el tostado como para el café soluble un valor de 10 µg/kg (Resolução ANVISA, RDC No 7). Además, Colombia ha establecido valores de hasta 5 µg/kg en café tostado y 10 µg/kg en café soluble (Resolución Ministerio de Salud y Protección Social, 004506).

Por otro lado, VICAM, (2017) señala que a nivel internacional no hay un consenso sobre una normativa para café verde y que algunos países han ido estableciendo sus propios valores. No obstante, el Centro Internacional de Comercio, por sus siglas en inglés ITC, desaconseja el uso de café verde con niveles de OTA superiores a los 15 µg/kg (Centro de Comercio Internacional, 2011).

2.2.4. Métodos de determinación de ocratoxina A

Existen diversos métodos empleados para la detección de ocratoxina A en café, entre los cuales pueden clasificarse dos grupos tradicionalmente distintivos: los ensayos cromatográficos y los inmunoensayos. Aunado a esto, hay otras técnicas que no pertenecen a las dos categorías mencionadas, las cuales surgieron de los esfuerzos realizados por los investigadores para poder lograr detecciones más rápidas, baratas y sencillas. Sin embargo, sigue prefiriéndose los métodos cromatográficos dictados por la AOAC para el análisis de dichas micotoxinas en café, tal es el caso del método AOAC 2004.10 para el análisis de OTA en café verde (AOAC, 2016).

2.2.4.1. Ensayos cromatográficos. Con el fin de llevar a cabo ensayos cromatográficos, es indispensable realizar previamente extracciones y limpiezas que garanticen la obtención de la ocratoxina A pura, es decir, libre de sustancias interferentes ligadas a la matriz de las muestras analizadas, para lo cual se han diseñado varios métodos especializados que se basan en columnas de extracción de fase sólida (denominadas columnas SPE), las cuales pueden ser “de paso” o “columnas de captura del analito”, donde las primeras retienen las sustancias interferentes por medio de un material adsorbente y dejan pasar el analito, y las segundas retienen en dicho material adsorbente el analito y las moléculas interferentes se eluyen al lavar la columna (Prelle *et al.*, 2013). Aunado a esto, es común el uso de columnas de inmunoafinidad (IAC), las cuales contienen un anticuerpo específico que se liga con la OTA (Bucheli *et al.*, 2000).

Una vez extraída la muestra, se aplica el ensayo cromatográfico de preferencia, donde los más comunes han sido la cromatografía de capa fina (TLC) (Batista y Chalfoun de Souza, 2009), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Nganou *et al.*, 2014) y la cromatografía líquida de ultra alta resolución (UHPLC) (Nielsen *et al.*, 2015).

En cuanto a la cromatografía de capa fina, esta fue una técnica básica utilizada en un principio para detectar OTA en café, la cual, pese a su bajo costo, (Pittet y Royer, 2002) y naturaleza cualitativa, ha sido desplazada por los métodos cromatográficos instrumentales cuantitativos desarrollados posteriormente, tales como HPLC. Estos últimos conllevan normalmente el uso de detectores de fluorescencia (Karako *et al.*, 2018) o espectroscopía de masas (Sueck *et al.*, 2019). Por otro lado, los métodos que conllevan la utilización de UHPLC con espectrometría de masas, poseen la gran ventaja de permitir la una separación eficiente y muy superior a otras técnicas cromatográficas (Sieber *et al.*, 2009).

2.2.4.2. Inmunoensayos. Los inmunoensayos funcionan bajo el principio de las reacciones de conjugación antígeno anticuerpo y se emplean en la detección de determinados analitos (Andrade, 2006). En el caso de la ocratoxina A, este tipo de ensayos surgieron como una alternativa rápida de detección (Azofeifa, 2003). Entre los métodos empleados en inmunoensayos para el análisis de OTA en café están: plasma acoplado inductivamente con espectrómetro de masas (ICP-MS) (Giesen *et al.*, 2010), transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) (Tang *et al.*, 2020) y ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) (Fujii *et al.*, 2006).

Respecto a la detección con plasma de acoplamiento inductivo asociado a un espectrómetro de masas en inmunoensayos, no ha sido un método muy utilizado para analizar OTA, debido a que en un principio su sensibilidad para analizar trazas en compuestos orgánicos no resultaba ser buena, sin embargo, con la introducción de derivatizaciones con heteroátomos (Pérez *et al.*, 2017), los cuales son moléculas distintas al carbono e hidrógeno, se obtienen resultados precisos al analizar OTA por medio de ensayos competitivos indirectos, los cuales contemplan la incubación de anticuerpos secundarios con elementos como el oro (Giesen *et al.*, 2010).

Por otro lado, la transferencia por resonancia de fluorescencia, conocida también como resonancia de Förster, es una técnica novedosa para el análisis de OTA en café, que consiste en transferir energía de una molécula a otra. Estas moléculas se encuentran emparejadas e interactúan en un campo dipolo-dipolo, de modo que una de las moléculas, conocida como la donadora, absorbe la luz, se excita y transfiere su energía a la otra molécula conocida como la receptora (Basham *et al.*, 2010). Como ejemplo de esta técnica se ha diseñado un método con un inmunosensor, que utiliza nanocuerpos y puntos cuánticos (moléculas donadora y receptora), donde la OTA compite con la molécula donadora para asociarse a la receptora y así poder ser cuantificada (Tang *et al.*, 2020), este método ha sido empleado en cereales, pero podría ser optimizado para su uso en matrices de café.

Finalmente, el inmunoensayo más empleado para analizar OTA tanto en café como en otros alimentos es ELISA, debido a que genera resultados con buena

sensibilidad, comparables a los obtenidos por medio del método HPLC-fluorescencia y a la sencilla preparación de las muestras (Fujii *et al.*, 2006). El principio de los análisis de OTA con ELISA se basa en añadir la muestra y un conjugado de la OTA con peroxidasa a un anticuerpo monoclonal que se encuentra fijado en un pocillo, de modo que se da una competencia entre las moléculas de OTA y el conjugado para ligarse al anticuerpo, esto provoca que la cantidad de ocratoxina aumente y disminuya la del conjugado, provocando un cambio de color característico y permitiendo la construcción de una curva de calibración y su consecuente interpolación para la obtención de las concentraciones de las muestras (Azofeifa, 2003).

2.2.4.3. Otras técnicas. Existen algunas técnicas que han sido empleadas para la detección de OTA en café, las cuales han surgido alternativamente a las técnicas convencionales con el fin de lograr la obtención de resultados prácticos, en menos tiempo y con un costo menor, entre las cuales pueden mencionarse la transformada de Fourier (FT) (Bozza *et al.*, 2013), fluorometría (Díaz *et al.*, 2018) y el uso de aptámeros (Liu *et al.*, 2020).

En cuanto a la transformada de Fourier, se ha desarrollado un método con espectroscopía infrarroja (FT-IR) para analizar OTA en café, sin embargo, pese a que esta técnica es ampliamente utilizada para el análisis de moléculas pequeñas o complejos moleculares, los estudios en el campo expuesto no son numerosos. El principio de FT-IR se basa en las vibraciones moleculares de los grupos funcionales, los cuales pueden estar asociados a bandas de absorción infrarrojas (Berthomieu y Hienerwadel, 2009), de modo que la idea es identificar esas bandas de absorción infrarroja asociadas a las moléculas que componen la ocratoxina A. No obstante, dicho método, a pesar de ser práctico, antes de poder asegurar que es completamente confiable, debe ser estudiado más a fondo (Bozza *et al.*, 2013).

En contraste, la técnica de fluorometría es muy utilizada para analizar OTA en alimentos, tanto así que se han diseñado fluorómetros especiales para poder cuantificarla. FT-IR y esta técnica, al igual que los ensayos cromatográficos,

necesitan que las muestras sean purificadas previo a su análisis por medio del uso, por ejemplo, de columnas de inmunoafinidad (Díaz *et al.*, 2018).

Por otro lado, una de las técnicas más novedosas para el análisis de ocratoxinas es el uso de los aptámeros, los cuales son ácidos nucleicos de cadena sencilla que tienen la facilidad de unirse a anticuerpos, dichos anticuerpos van a ser posteriormente las moléculas reporteras que indiquen la presencia de la OTA, por lo que a esta solución debe añadirse un marcador, el cual puede ser un tinte fluorescente, una enzima, biotina o un compuesto aminado, lo que convierte al uso de aptámeros en una técnica versátil, que permite el uso de variedad de métodos de detección (Barthelmebs *et al.*, 2011). Los estudios de OTA en café por medio de métodos con aptámeros son escasos debido a su reciente aplicación en el análisis de toxinas en alimentos, pero con el tiempo, tal como mencionan Liu *et al.* (2020) debido a su alta sensibilidad y sencilla aplicación, podrían llegar a generarse variedad de estudios relacionados.

3. Marco Metodológico

3.1. Ubicación geográfica del proyecto y método de análisis de ocratoxina en café verde

3.1.1. *Descripción de la ubicación geográfico-temporal del proyecto*

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio Químico del Icafe en San Pedro de Barva, Heredia, donde se realizaron pruebas de optimización al método para cuantificación de ocratoxina A en café verde, mediante la técnica de cromatografía líquida de alta resolución con detección de fluorescencia (HPLC-FLD). Posteriormente, se realizó la validación según los parámetros de desempeño establecidos por el Ente Costarricense de Acreditación (ECA). Esta práctica dirigida se llevó a cabo del 12 de julio al 3 de diciembre del 2021.

3.1.2. *Descripción del método de análisis de ocratoxina A en café verde empleado en el laboratorio químico del ICAFE*

3.1.2.1. Muestreo y preparación previa de las muestras para el método de análisis de OTA en café verde mediante HPLC. El laboratorio Químico recibió muestras de café en grano sin tostar (café verde) de 100 g para el respectivo análisis de OTA mediante HPLC. Más adelante, las muestras fueron colocadas en la estufa a 50 °C de tres a cinco días. Luego fueron molidas y se conservaron a temperatura ambiente en recipientes de plástico (poliestireno) para impedir el ingreso de humedad, hasta que realizaron los ensayos respectivos.

3.1.3. *Técnica de análisis empleada para el análisis de ocratoxina A en café verde*

Durante la presente práctica, los recursos con los que contaba el Laboratorio Químico del ICAFE no eran suficientes para aplicar la metodología de determinación de OTA en café verde especificada por la AOAC, por lo que se optó

por la metodología del laboratorio Trilogy Analytical Latinoamérica (2010), la cual emplea la técnica de cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un espectroscopio de fluorescencia (HPLC-FLD). Esta metodología ya se venía experimentado en el ICAFE desde el 2017, aproximadamente, y consta de tres pasos: la extracción de la muestra, su introducción en un equipo de HPLC y su detección por medio de espectroscopía fluorescente. En el Cuadro 1 se muestran los parámetros de operación que se emplearon en el equipo de HPLC.

Cuadro 1

Parámetros de operación del equipo de HPLC para cuantificación de ocratoxina A, mediante la técnica de HPLC-Fluorescencia, ICAFE (2020).

Parámetro	Especificación
Columna	C18
Fase móvil	Acetonitrilo – Agua - Ácido acético (45 + 54 +1)
Flujo	0,7 mL/min
Temperatura del horno de la columna	40 °C
Volumen de inyección	50,0 µL
Detector	Fluorescencia
Longitud de onda de excitación	333 nm
Longitud de onda de emisión	460 nm

3.1.4. *Equipo e instrumentación empleados para el análisis de ocratoxina A en café verde mediante HPLC*

Los materiales e instrumentación que se emplearon fueron: cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC) Thermo Scientific/Dionex Ultimate 3000 con detector de fluorescencia, columnas de inmunoafinidad OCHRAPREP de R-BIOPHARM, balanza granataria, vórtex, licuadora casera Oster. También se utilizó una bomba de presión positiva que no cumple con las condiciones de monitoreo adecuado de

goteo recomendado, lo ideal es emplear un sistema de vacío acoplado a un colector de vacío (conocido por su nombre en inglés como Manifold).

Por otro lado, en cuanto a materiales y reactivos, se utilizaron agua desionizada tipo 1, metanol y acetonitrilo (ambos, grado HPLC), ácido acético glacial, estándar de OTA (marca Trilogy) de 10,2 µg/mL. Disolución salina tamponada con fosfato (conocida como PBS por sus siglas en inglés) marca Tween, 5X concentrado al 2%.

3.1.5. *Preparación de las muestras y determinación por HPLC para el método de análisis de ocratoxina A en café verde*

Para la determinación de las muestras se realizó lo siguiente: primero, se pesaron 25 g de las muestras de café verde molido y se licuaron (en una licuadora casera Oster) con metanol y agua en proporción 3:1 respectivamente; luego se filtraron y se diluyeron en una disolución PBS, en este punto se monitoreó el pH de cada muestra para garantizar una buena recuperación del analito por medio de la columna de inmunoafinidad, por lo cual se comprobó que el pH se encontraba entre 6 y 9. Luego, las muestras se pasaron a través de dicha columna aplicando una presión positiva. Se eluyeron primero las muestras con metanol y luego con agua.

Es importante resaltar que Trilogy Analytical Laboratory (2010) en su procedimiento analítico para la OTA mediante HPLC-Fluorescencia, indica que la velocidad de goteo al realizar dicha elución debe ser de 1-2 gotas por segundo. Sin embargo, debido a que el Laboratorio Químico del ICAFE no contaba con los recursos para obtener el equipo de vacío con manifold (como el recomendado en el método AOAC 2004.10), dicha velocidad de goteo no fue monitoreada adecuadamente. Posteriormente las muestras fueron homogenizadas en un vórtex y colocadas en viales para HPLC y se llevaron al equipo de HPLC, donde fueron detectadas por espectroscopía de fluorescencia.

3.1.5.1. Preparación de la disolución del estándar de ocratoxina A para la elaboración de la curva de calibración (0,102 µg/mL = 102 µg/L). La disolución del estándar de OTA para la realización de la curva de calibración se preparó a partir de una ampolla de 5 mL que contenía una concentración de 10,2 µg/mL del estándar de OTA marca Trilogy disuelto en metanol, dicha ampolla se diluyó con metanol puro en un balón aforado de 500 mL.

3.1.5.2. Curva de calibración. Se preparó una curva de calibración con concentraciones de los estándares entre 0,80 µg/L y 25,50 µg/L. Específicamente, se tomaron 2,5 mL de la solución madre del estándar (102 µg/L), y se diluyó con metanol/agua 50/50 en un balón de 10 mL, este fue el estándar 6 (25,50 µg/L), de este estándar se tomaron 5 mL y se diluyeron en un balón de 10 mL, este fue el estándar 5 (12,75 µg/L), sucesivamente de los consiguientes se fueron tomando también 5 mL y diluyendo en balones de 10 mL (ver Cuadro 2 para consultar las concentraciones de cada estándar).

Cuadro 2

Preparación de la curva de calibración de ocratoxina A.

Estándar	Concentración (µg/L)
1	0,80
2	1,59
3	3,19
4	6,38
5	12,75
6	25,50

3.1.5.3. Preparación de muestras enriquecidas con estándar de ocratoxina A con concentración de 10,2 µg/L. Para la preparación de muestras enriquecidas de la disolución de estándar de OTA de 102 µg/L se tomaron 2,5 mL y se llevaron a un balón aforado de 25 mL, para luego añadirlo en su totalidad a una muestra de 25 g café verde molido previamente pesada con 75 mL de metanol puro y se licuó, a partir de este punto, fueron tratadas de igual forma que las muestras comunes.

3.2. Optimización de las condiciones analíticas del proceso de extracción y purificación de ocratoxina A para su determinación en café verde a partir de las condiciones existentes en el laboratorio químico del ICAFE

3.2.1. *Prueba del efecto de la matriz de café verde en el análisis de ocratoxina A por HPLC*

Se procedió a realizar esta prueba de efecto matriz con el fin de conocer si la calidad del café afecta la extracción de las muestras. Para evaluar esto, se realizaron enriquecimientos de la muestra, por lo cual se agregó una concentración de 10,2 µg/L de estándar de OTA a dos muestras de café verde, una de alta calidad (muestra de granos homogéneos y tamaño uniforme) y una de calidad baja (muestra conformada por granos heterogéneos: quebrados, de diversos tamaños, negros y restos de pergamino). De cada muestra se analizaron tres réplicas enriquecidas y se compararon los resultados obtenidos de ambas muestras.

3.2.2. *Prueba de verificación de la capacidad de extracción de las columnas de inmunoafinidad empleadas en el análisis de ocratoxina A en café verde*

Para esta prueba se eluyó 1 mL de un estándar de OTA con una concentración de 12,2 µg/L a través de una columna de inmunoafinidad. Dicha prueba se realizó por duplicado. Los duplicados se inyectaron en el equipo de HPLC

en conjunto con una curva de calibración de OTA. Esto, con el fin de verificar la capacidad de extracción de las columnas de inmovilización empleadas para el análisis de OTA en café verde. Finalmente, los resultados obtenidos se compararon con los de muestras de café enriquecidas con estándar de OTA.

3.3. Optimización las condiciones instrumentales del HPLC para el análisis de ocratoxina A en café verde

3.3.1. Prueba de idoneidad del sistema cromatográfico

Según Rayo y Rivera (2014), una prueba de idoneidad corresponde a un grupo de ensayos que en su conjunto permiten, en el momento de la utilización de un método, verificar que el sistema (compuesto por el analista, los reactivos y el instrumento) es adecuado para llevar a cabo la determinación y su respectiva validación. En una prueba de idoneidad se evalúan el factor de capacidad, el número de platos teóricos, el factor de asimetría (cola) y la resolución.

Al realizar la prueba de idoneidad se obtuvo su coeficiente de variación con el fin de conocer la precisión del sistema cromatográfico (Aguirre *et al.*, 2001).

La prueba de idoneidad se realizó corriendo el método de análisis normalmente e inyectando 6 réplicas del estándar 3 de la curva de calibración, el cual contenía una concentración de 3,2 µg/L, el número de platos teóricos y el factor de asimetría fueron obtenidos directamente de los resultados dados por el equipo al analizar las réplicas.

3.3.1.1. Factor de capacidad. Al factor de capacidad (k'), se le conoce también como velocidad de migración de un soluto, tal como menciona Skoog *et al.* (2020) se emplea para describir la velocidad de migración de los solutos en las columnas. El factor de capacidad se calculó mediante la Ecuación 1.

Ecuación 1. Cálculo del factor de capacidad (k') (Aguirre *et al.*, 2001).

$$k' = \frac{t_r - t_0}{t_0}$$

Donde:

k' : factor de capacidad

t_0 : tiempo en que el compuesto no retenido pasa por el interior del sistema.

t_r : tiempo de retención del compuesto considerado.

3.3.1.2. Número de platos teóricos. El número de platos teóricos se calcula con base en la columna empleada; en el presente caso según la columna de fase reversa (C18) designada para el método, pues tal como menciona González (2010) un plato teórico es la longitud de la columna en la cual el soluto alcanza un equilibrio entre la fase móvil y la fase estacionaria, definiendo a su vez la eficacia de separación de la columna.

3.3.1.3. Factor de asimetría. En cromatografía la identificación y cuantificación de los componentes presentes en las muestras analizadas se realiza mediante cromatogramas (Gismera *et al.*, 2009). Un cromatograma es el gráfico de picos de elución producidos por cada analito presente en una muestra (Forbes *et al.*, 2009). Dichos picos de elución son conocidos también como picos cromatográficos, bajos los cuales según la señal obtenida se encuentra lo que se conoce como el área bajo el pico, que permite la valoración cuantitativa de la cantidad relativa de las sustancias analizadas (Gismera *et al.*, 2009).

Cuando un pico cromatográfico es ideal, muestra semejanza a una curva Gaussiana, sin embargo, en un ensayo cromatográfico dentro de la columna unas moléculas se desplazan más rápido y otras se retrasan, lo que genera una dispersión simétrica de las velocidades alrededor del valor medio, y esto se traduce en colas con mayor o menor asimetría dependiendo del analito (Legaz *et al.*, 2011). La evaluación de dicha asimetría se conoce como factor de asimetría.

3.3.1.4. Resolución. La resolución es la medida de separación que hay entre dos picos y que resulta muy útil para controlar el comportamiento de posibles interferencias (Rodríguez, 2014). A su vez, Aguirre *et al.* (2001) mencionan que la resolución es la línea base que se obtiene cuando la señal cromatográfica correspondiente a las últimas trazas del analito (para el cual se realiza la prueba) llegan a la línea base antes que las primeras trazas del siguiente analito a eluir sean detectadas. Dado que la resolución sirve para conocer la medida entre dos picos de interés en un análisis y el pico de la OTA, es el único pico de interés en el análisis referido en el presente trabajo, una medida de resolución no era aplicable para la prueba de la idoneidad del método en estudiado.

3.4. Validación del método de cuantificación de ocratoxina A en café verde de acuerdo con los parámetros de desempeño establecidos por el Ente Costarricense de Acreditación (ECA)

En este trabajo se evaluaron los parámetros de desempeño especificados según el ECA (2019) para aquellos laboratorios de ensayo que utilicen métodos no normalizados o desarrollados por los mismos laboratorios, dichos parámetros de desempeño fueron: selectividad, veracidad (y recuperación), precisión, límites de detección y cuantificación, linealidad, sensibilidad, robustez e incertidumbre. Sin embargo, no fue posible medir la precisión.

3.4.1. Selectividad

La selectividad es el grado en que un método analítico puede cuantificar un analito en presencia de interferencias que frecuentemente se encuentran en la matriz empleada (Duffau *et al.*, 2010), tal es el caso de la OTA en la matriz de café verde.

Para la selectividad se realizó la lectura tanto de un blanco de la matriz de café verde como del estándar 3 de la curva de calibración y una muestra enriquecida. Luego se comprobaron y compararon los cromatogramas obtenidos.

3.4.2. Veracidad y recuperación

La veracidad de un método analítico es la capacidad que posee este para proporcionar resultados lo más próximos posibles al valor verdadero (Zumbado, 2004). Dicha veracidad puede ser determinada según la guía de la Eurachem dada por Magnusson y Örnemark (2014) mediante el análisis por material de referencia, experimentos de recuperación con muestras enriquecidas y comparación con los resultados obtenidos mediante otro método.

La recuperación es la fracción de la sustancia agregada a la muestra (muestra enriquecida) previo al análisis e implica el análisis tanto de muestras enriquecidas como no enriquecidas (Duffau *et al.*, 2010).

Es importante señalar que el Laboratorio Químico del ICAFE no cuenta con una muestra certificada de OTA, por lo cual la veracidad se evaluó según la Eurachem midiendo 10 muestras enriquecidas de OTA en café verde con concentraciones de 10,2 µg/L y un blanco del mismo control de café verde, y calculando sus respectivos valores de porcentaje de recuperación relativa, tal como se muestra en la Ecuación 2 (Magnusson y Örnemark, 2014).

Ecuación 2. Cálculo del porcentaje de recuperación relativa empleado en las muestras enriquecidas de OTA en café verde para la verificación de la veracidad mediante el método de HPLC-Fluorescencia. (Magnusson y Örnemark, 2014).

$$\%Recuperación = \frac{\bar{x}' - \bar{x}}{x_{adición}} * 100$$

Donde:

\bar{x}' es el valor medio de las muestras adicionadas.

\bar{x} es el valor de la adicionada.

$x_{adición}$ es la concentración añadida en la adición.

Las muestras enriquecidas de OTA empleadas en la verificación de veracidad se prepararon según se describe en el apartado 3.1.5.3: realizando 10

disoluciones de 10,2 µg/L partir de la disolución estándar de ocratoxina A de 102 µg/L, dichas disoluciones se adicionaron a 10 muestras del mismo control de café verde molido, las cuales luego fueron extraídas con 75:25 metanol/agua y filtradas. La OTA que les fue adicionada fue recuperada mediante columnas de inmunoafinidad para OTA y posteriormente fueron analizadas mediante el equipo de HPLC con detección de fluorescencia.

3.4.3. *Precisión*

La precisión es el valor que expresa la cercanía de coincidencia (grado de dispersión) entre una serie de varias mediciones obtenidas de múltiples muestreos de una misma muestra homogénea bajo las condiciones analíticas establecidas por el método empleado en cuestión. (Ministerio de Salud, 2014). La precisión según Magnusson y Örnemark, (2014) puede medirse en términos de repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad de medición.

La repetibilidad es el parámetro que expresa la precisión obtenida a partir de un grupo de resultados de un ensayo, el cual se realizó bajo iguales condiciones de operación: mismo equipamiento, mismo operador en un intervalo corto de tiempo (Quezada, 2009). En la Eurachem Magnusson y Örnemark, (2014) indican que el mínimo de repeticiones a realizar está entre las 6 y 15 réplicas, tal es el caso de la presente práctica dirigida donde se determinó la repetibilidad a partir de seis réplicas (enriquecimientos de 10,2 µg/L de OTA) de la misma muestra de café verde homogénea. A los datos obtenidos se les realizó un análisis de varianza de un solo factor, con base en este se obtuvieron la desviación estándar de la prueba de repetibilidad y la desviación estándar relativa de la repetibilidad (Ecuación 3).

Ecuación 3. Cálculo de la desviación estándar relativa de la repetibilidad para la verificación de la precisión del método de análisis de ocratoxina en café verde mediante la técnica de HPLC-FLD (Quezada, 2009).

$$RSD_r = \left(\frac{S_r}{\bar{X}} \right) * 100$$

Donde:

RSD_r: Desviación estándar relativa de la repetibilidad.

S_r: desviación estándar de la repetibilidad.

\bar{x} : Valor promedio de las mediciones.

Ahora bien, la reproducibilidad es el parámetro que expresa la precisión en condiciones reproducibles a partir de los resultados obtenidos de estudios interlaboratoriales para el mismo método de ensayo. (Quezada, 2009). Por otro lado, la precisión intermedia se realiza a nivel de un solo laboratorio, con el objetivo, según Magnusson y Örnemark (2014), de obtener una estimación de la precisión que se encuentre asociada a todas las fuentes de variación que se producirán en el laboratorio en condiciones rutinarias.

Se omitió la prueba de la precisión intermedia debido a las limitaciones en el tiempo, pues por la pandemia del COVID-19 durante el primer semestre del 2021, el Laboratorio Químico del ICAFE dejó de recibir pasantías de forma presencial, lo cual causó que el presente estudio se llevara a cabo sólo durante un semestre y no durante los dos semestres que usualmente conllevan los trabajos finales de graduación en la UCR. Por otro lado, también debido al COVID-19, el laboratorio no ha podido participar en una prueba interlaboratorial desde el 2018 para medir la reproducibilidad. Por tanto, en el presente trabajo se mencionan a modo de referencia los resultados obtenidos de la última prueba interlaboratorial en la cual se participó (dicha prueba fue realizada en el 2018 por el proveedor de estudios interlaboratoriales acreditado FAPAS) con el fin de conocer un estimado de la reproducibilidad del análisis.

Por su parte, FAPAS (2018) midieron la reproducibilidad basados en el valor conocido como Z-Score, que consiste en tomar la diferencia entre la medida obtenida para cada laboratorio y el valor teórico asignado en el estudio y dividirla entre la desviación estándar obtenida a partir de todas las medidas obtenidas por los laboratorios participantes en el estudio interlaboratorial. Mediante la Ecuación 4, F FAPAS calculó los Z-score para cada laboratorio participante en dicho estudio interlaboratorial.

Ecuación 4. Cálculo de Z-Score empleado por FAPAS (2018) para el medir la reproducibilidad de la prueba interlaboratorial del análisis de ocratoxina A en café verde.

$$ZScore = \frac{(x - x_a)}{(\sigma_p)}$$

Donde:

x: resultado informado por el laboratorio participante.

x_a : Valor asignado de X.

σ_p : desviación estándar.

3.4.4. Límites de detección y cuantificación

El límite de detección de un método analítico (conocido también como LOD por sus siglas en inglés) tal como menciona Huber (2010) al citar a la guía ICH, es la menor cantidad de analito en una muestra que puede ser detectada (no necesariamente cuantificada). A su vez, el límite de cuantificación de un método analítico (conocido por sus siglas en inglés como LOQ) según Magnusson y Örnemark, (2014) es el nivel mínimo del analito que puede ser determinado con un desempeño aceptable.

Para evaluar el LOD y el LOQ según lo especificado en la Eurachem por Magnusson y Örnemark (2014), se emplearon los datos correspondientes a 10 curvas de calibración del estándar de OTA (marca Trilogy), con el fin de construir una curva respuesta de los resultados contra la concentración. Las áreas de los picos cromatográficos obtenidos fueron promediadas según su nivel de concentración. Luego, los datos de las concentraciones y de las áreas promediadas fueron colocados en la Hoja de Cálculo de Validación de Curvas del ICAFE, en ella se graficó la curva de calibración y calcularon los parámetros de LOD y LOQ mediante las Ecuaciones 5 y 6 respectivamente.

Ecuación 5. Cálculo del límite de detección para validación del método de análisis de ocratoxina A en café verde (Skoog *et al.*, 2015).

$$\text{LOD} = \frac{(k * S_b)}{(m)}$$

Donde:

k: factor de confianza se utilizó un valor de 3, el cual corresponde a un 98,3% de confianza.

S_b: desviación estándar del intercepto (b).

m: es la sensibilidad de la calibración, es decir, la pendiente de la recta lineal.

Ecuación 6. Cálculo del límite de cuantificación para validación del método de análisis de ocratoxina A en café verde (Herrera *et al.*, 2008).

$$\text{LOQ} = \frac{(10 * S_b)}{(m)}$$

Donde:

10: factor multiplicador, según la Eurachem se basa en los criterios de adecuación al uso, usualmente, es 10 (Magnusson y Örnemark, 2014).

S_b: desviación estándar del intercepto (b).

m: pendiente de la recta lineal.

3.4.5. Linealidad y sensibilidad

Según Huber (2010) la linealidad es la habilidad analítica de un procedimiento dentro de un rango de obtener resultados directamente proporcionales a la cantidad de concentración de un analito en una muestra.

La sensibilidad es el parámetro que permite conocer la relación que puede medir un método entre la variable dependiente con respecto a la independiente (Castro *et al.*, 2020). En términos prácticos, la sensibilidad, según Duffau *et al.* (2010), permite observar la capacidad de respuesta instrumental a determinada cantidad del analito y corresponde a la pendiente (medida de inclinación) de la recta de calibración (m).

Para evaluar la linealidad se calculó el promedio de tres curvas de calibración de OTA de 6 estándares (con concentraciones entre los 0,797 y 25,5 $\mu\text{g/L}$), esto de conformidad con lo indicado por el Ministerio de Salud (2014), que indica evaluar la regresión lineal del sistema trabajando con disoluciones estándar de al menos cinco niveles de concentración. Los resultados obtenidos se promediaron, fueron graficados y se evaluó la respuesta de la concentración del analito contra el área promedio obtenida a cada nivel. En cuanto a la sensibilidad del método, se analizó la pendiente de la función lineal correspondiente a la curva de calibración de OTA realizada (la misma curva empleada para evaluar la linealidad).

Para la linealidad se realizó también una prueba de homogeneidad varianzas para evaluar la variabilidad entre las tres curvas de calibración analizadas. Se empleó la prueba de Levene, que tal como menciona Mongay (2005), implicó que para cada dato experimental el cálculo de la diferencia absoluta entre su valor y la mediana de su grupo, y se realizó sobre estas diferencias un análisis de varianza (ANOVA) de un factor, obteniéndose un valor P-valor con una significancia (α) de 0,05. Para dicha prueba se plantearon las siguientes hipótesis:

Hipótesis nula (H_0) = Todas las varianzas de las tres curvas de calibración analizadas son semejantes entre sí.

Hipótesis alterna (H_a) = Por lo menos una de las varianzas de las tres curvas de calibración analizadas es diferente.

Para tomar la decisión acerca de H_0 se utilizó el p valor dado por el ANOVA de la prueba de Levene. Dicho p valor (valor de probabilidad) es el mayor nivel de significación para el que no se acepta H_a (Delgado de la Torre, 2004).

3.4.6. Robustez

La robustez es un parámetro que busca desafiar la estabilidad de un método analítico, es decir, es la medida de la capacidad de un procedimiento analítico de permanecer inalterado ante pequeñas, pero deliberadas variaciones de una o más condiciones de trabajo (Crubellati y Di Risio, 2009). Mediante las pruebas de robustez se busca demostrar que el método en estudio, al ser empleado

rutinariamente es capaz de ser efectivo, aunque sufra algún cambio durante su desempeño. Al respecto, Karageorgou y Samanidou (2014) mencionan que al obtenerse mediante la prueba de robustez resultados satisfactorios puede establecerse, entonces, que la robustez del método es aceptable y puede procederse con la validación respectiva y cuando los resultados de dicha validación sean satisfactorios, el método puede ser aplicado de forma rutinaria.

3.4.6.1. Test Youden y Steiner. Al determinar la robustez de un método de análisis se toman en cuenta los errores típicos dentro de las variables del método que podrían afectar su desempeño, dichos errores pueden ser del tipo instrumental o humano, y pueden suponer una seria afectación a la aplicación del método en forma rutinaria. De modo que, para probar la robustez del método, se utilizó el test de Youden y Steiner, el cual busca evaluar el efecto de dichas variables por medio del diseño de ocho análisis o pruebas diferentes, de forma que cada variable se estudia mediante un valor alto (A, B, C,...,G) y un valor bajo (a, b, c,..., g) (Duffau *et al.*, 2010).

Para evaluar la robustez del método de análisis de OTA en café verde mediante HPLC-Fluorescencia fueron diseñados ocho experimentos y se identificaron cinco variables que podrían afectar el desempeño del método, tal y como se muestra en el Cuadro 3 que fueron: temperatura horno de la columna, fase móvil, velocidad del flujo, volumen de inyección y tiempo de agitación de la muestra. Los cambios fueron introducidos a la vez para que los efectos de los cambios individuales pudieran identificarse mediante la diferencia obtenida de los cuatro análisis que contenían la variable en su valor alto y de las cuatro con la variable en su valor bajo (Bedregal *et al.*, 2008). Dichas diferencias se denotan según Duffau *et al.*, (2010) de la siguiente manera:

$$(A - a), (B - b), (C - c), (D - d), (E - e), (F - f), (G - g).$$

Cuadro 3

Experimentos realizados para la prueba de robustez realizada para la validación del método de análisis de ocratoxina A en café verde mediante la técnica de HPLC-FLD.

Variable	Clave	Valor Alto	Valor Bajo	Normal	1	2	3	4	5	6	7	8
Temperatura horno de columna (°C)	A,a	45	35	40	45	45	45	45	35	35	35	35
Fase móvil (Acetonitrilo: ácido acético)	B,b	45:55	60:40	45:55	45:55	45:55	45:55	60:40	45:55	60:40	60:40	60:40
Flujo (mL/min)	C,c	0,8	0,6	0,7	0,8	0,6	0,8	0,6	0,8	0,6	0,8	0,6
Volumen de Inyección (µL)	D,d	55,0	45,0	50,0	55,0	55,0	45,0	45,0	45,0	45,0	55,0	55,0
Tiempo de agitación de la muestra	E,e		1:30 min	2 min	2:30 min	1:30 min	1:30 min				1:30 min	1:30 min
		2:30 min						2:30 min	2:30 min			2:30 min

Para evaluar la robustez, como criterio de aceptación se requiere que las diferencias entre las variables altas y bajas obtenidas sean menores a $\sqrt{2}S$ (dónde S es la desviación estándar de la precisión del método) (Duffau *et al.*, 2010). Para evaluar dicho criterio de aceptación de la robustez se multiplicó $\sqrt{2}$ por la desviación estándar de la precisión del análisis de robustez efectuado.

3.4.7. Incertidumbre

La incertidumbre tal como indican Magnusson y Örnemark (2014), es un intervalo asociado con un resultado de medida que expresa el intervalo de valores razonables atribuidos a la cantidad medida y que debe tomar en cuenta todos los efectos reconocidos que afectan el resultado. Comúnmente, para calcular la incertidumbre se emplea el valor de varianza de Horwitz (S_{Horwitz}^2) obtenido a partir estudios de reproducibilidad, el cual se origina del valor de la desviación estándar de Horwitz (S_{Horwitz}) resultante en dichos estudios. Según Rivera y Rodríguez (2010), en 1980 Horwitz *et al.* expusieron que el comportamiento de la dispersión de los datos en pruebas interlaboratoriales puede presentarse como un gráfico del coeficiente de variación (CV_{Horwitz}) expresado en potencia de 2 contra la concentración medida expresada en potencia de 10, esto se denomina ecuación de Horwitz, la cual puede apreciarse en la Ecuación 7.

De igual manera, Rivera y Rodríguez (2010) mencionan que a partir del CV_{Horwitz} se obtiene la S_{Horwitz} y desde esta el valor de S_{Horwitz}^2 . En el presente trabajo no se realizó la verificación de la incertidumbre debido a que en el momento en que se abordó el tema de la determinación de la incertidumbre no se contaba con el tiempo suficiente para realizar un cálculo complejo de incertidumbre, el cual requería contemplar todas las fuentes de error asociadas al análisis.

De modo que para calcular un valor de referencia de incertidumbre expandida se utilizó el dato S_{Horwitz} obtenido en el estudio interlaboratorial en el cual participó el ICAFE y que fue realizado por FAPAS. En dicho estudio obtuvieron un $S_{\text{Horwitz}} = 1,22$ (FAPAS, 2018). Posteriormente, se calculó la varianza de Horwitz (S_{Horwitz}^2) al elevar el dicho valor S_{Horwitz} al cuadrado y posteriormente el S_{Horwitz}^2

obtenido se sustituyó en la ecuación de cálculo de incertidumbre expandida expresada en la Ecuación 8.

Ecuación 7. Ecuación para el cálculo del coeficiente de variación de Horwitz (Duffau *et al.*, 2010).

$$CV_h = 2^{(1-0,5 \cdot \log c)}$$

Donde:

CV_h = Coeficiente de variación de Horwitz.

C = Concentración del analito expresado en potencia de 10.

Ecuación 8. Ecuación empleada para el cálculo de la incertidumbre expandida con un 95% de confianza del método de análisis de ocratoxina A en café verde mediante la técnica de HPLC con detección de Fluorescencia (Rivera y Rodríguez, 2010).

$$U'_{\text{método}} = S^2_{\text{Horwitz}} * 2$$

Donde:

U' : incertidumbre expandida.

S^2_{Horwitz} : Varianza de Horwitz.

4. Resultados

4.1. Resultados de la optimización de las condiciones analíticas del proceso de extracción y purificación de ocratoxina A para su determinación en café verde a partir de las condiciones existentes en el laboratorio químico del ICAFE

4.1.1. *Resultados de la prueba del efecto de la matriz de café verde en el análisis de ocratoxina A por HLPC*

Para la prueba del efecto de la matriz de café verde, al enriquecer tres muestras con estándar de OTA a una concentración de 10,2 µg/L tanto de café verde de mayor calidad, como tres muestras de café verde de menor calidad, se obtuvieron, según se observa en el Cuadro 4, para las muestras de café verde de mayor calidad promedios de la concentración y de porcentaje de recuperación de 5,79 µg/L y 57% respectivamente, encontrándose por debajo del valor de aceptación de 60-115% para muestras enriquecidas entre los 10-100 µg/L (Duffau *et al.*, 2010).

Por otro lado, para las muestras de café verde de menor calidad se obtuvo un promedio de la concentración de 6,58 µg/L y un promedio del porcentaje de recuperación del 64%. Esto indica que las muestras tienen un porcentaje de recuperación dentro de dicho rango de aceptación establecido.

Cuadro 4

Resultados obtenidos del efecto de la matriz de café verde de menor y mayor calidad en el análisis de ocratoxina A mediante HPLC-FLD.

Controles	Concentración* ($\mu\text{g/L}$)	% Recuperación**
Café verde mayor calidad	5,79	57
Café verde menor calidad	6,58	64
Valor aceptado de recuperación***		60-115%

* Concentración promedio recuperada de ocratoxina A en las muestras enriquecidas con $10,2 \mu\text{g/L}$.

** Porcentaje de recuperación promedio de ocratoxina A en las muestras enriquecidas con $10,2 \mu\text{g/L}$.

*** En muestras enriquecidas con concentraciones entre los $10-100 \mu\text{g/L}$ (Duffau *et al.*, 2010).

4.1.2. Resultados la verificación de la capacidad de extracción de las columnas de inmunoafinidad empleadas en el análisis de ocratoxina A en café verde, mediante el método de HPLC-Fluorescencia

En cuanto a los resultados de la prueba de verificación de la capacidad de extracción de columnas de inmunoafinidad empleadas en el análisis de OTA en café verde mediante el método de HPLC-fluorescencia, se obtuvo un promedio de concentración de $7,10 \mu\text{g/L}$ y un porcentaje de recuperación del 58% (con base en dos réplicas del estándar de $12,2 \mu\text{g/L}$). Dicho resultado, se encuentra por debajo del límite de aceptación indicado por Duffau *et al.*, (2010) de 60-115% para muestras enriquecidas entre los $10-100 \mu\text{g/L}$. Dichos resultados se muestran en el Cuadro 5.

Cuadro 5

Resultados de la prueba de verificación de la capacidad de extracción de las columnas de inmunoafinidad mediante la técnica de HPLC-FLD.

Réplica*	Concentración recuperada ($\mu\text{g/L}$)	% Recuperación
1	6,80	56
2	7,40	60
Promedio	7,10	58
	Valor aceptado de recuperación**	60-115%

*Réplicas del estándar preparado con una concentración de 12,2 $\mu\text{g/L}$.

**En muestras enriquecidas con concentraciones entre los 10-100 $\mu\text{g/L}$ según Duffau *et al.*, (2010).

Al comparar los resultados entre los porcentajes de recuperaciones obtenidas en réplicas enriquecidas 10,2 $\mu\text{g/L}$ y las réplicas del estándar de 12,2 $\mu\text{g/L}$ (estas últimas preparadas según la sección 3.2.2 de la metodología) empleados para la prueba del estado de las columnas de inmunoafinidad, se obtuvieron promedios de 60% de recuperación para las réplicas enriquecidas con 10,2 $\mu\text{g/L}$ y un porcentaje de recuperación un poco menor del 58% para las réplicas del estándar de 12,2 $\mu\text{g/L}$, siendo el promedio de recuperación de las muestras de menor calidad un poco mayor que el de las muestras de mayor calidad. Dichos resultados se encuentran en el Cuadro 6.

Cuadro 6

Verificación de la capacidad de extracción de las columnas de inmunoafinidad comparando los resultados de porcentajes de recuperación obtenidos entre réplicas de enriquecidas de 10,2 µg/L y las réplicas del estándar de 12,2 µg/L.

Réplicas	% Recuperación de muestras enriquecidas con 10,2 µg/L	% Recuperación del estándar 12,2 µg/L
1	63	56
2	56	60
Promedio	60	58
Valor aceptable de recuperación*		
	60-115%	

*En muestras enriquecidas con concentraciones entre los 10-100 µg/L según Duffau *et al.* (2010).

4.2. Resultados de la optimización de las condiciones instrumentales del HPLC para el análisis de ocratoxina A en café verde.

4.2.1. Resultado de la prueba de idoneidad del sistema cromatográfico

En lo referente a los resultados de la prueba de idoneidad del sistema cromatográfico el factor de capacidad, el número de platos teóricos, el factor de asimetría y el coeficiente de variación porcentual obtenidos se encuentran dentro de los valores aceptados según lo especificado por la Guía de Validación AEFI (Aguirre *et al.*, 2001). Los resultados descritos se muestran en el Cuadro 7.

Cuadro 7

Resultados de la prueba de idoneidad del sistema cromatográfico empleada para la optimización de las condiciones instrumentales del cromatógrafo líquido de alta resolución para el análisis de ocratoxina A en café verde.

Parámetro	Resultado	Criterio de Aceptación*
Factor de capacidad (k')	6,19	> 2
Número de platos teóricos	14297	> 2000
Factor de asimetría	1,3	0,8 – 1,5
CV (%)	1,35	≤ 2%

* Criterios de aceptación tomados de la Guía de Validación de la AEFI (Aguirre *et al.*, 2001).

4.3. Resultados de la validación del método de cuantificación de ocratoxina A en café verde de acuerdo con los parámetros de desempeño establecidos por el ente costarricense de acreditación (ECA)

4.3.1. *Resultados de la verificación de la selectividad del método de análisis de ocratoxina A en café verde, mediante la técnica de HPLC con detección de fluorescencia*

En cuanto a la verificación de la selectividad del método de análisis de OTA en café verde mediante la técnica de HPLC-fluorescencia, se obtuvieron los tres cromatogramas mostrados en la Figura 4. El primer cromatograma (A) representa la medición del estándar (3,2 µg/L) de OTA. El cromatograma (B) representa la medición realizada para el blanco de la matriz de café verde empleada en el análisis. El cromatograma (C) representa la medición realizada a una muestra enriquecida

con OTA de 10,2 µg/L. El resultado de esta verificación de la selectividad es positivo para el análisis de OTA en café verde.

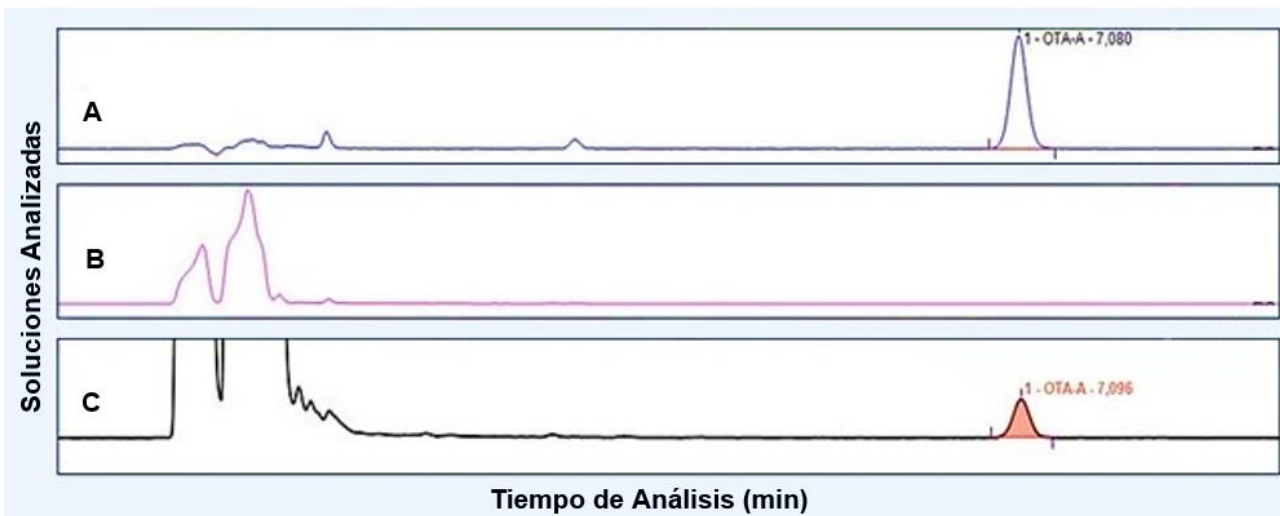


Figura 4. Cromatogramas obtenidos para la verificación de la Selectividad. A. Cromatograma del estándar de ocratoxina A. B. Cromatograma del blanco de la matriz de café verde. C. Cromatograma de la muestra de café verde *enriquecida*.

4.3.2. **Resultados de la verificación de veracidad del método de análisis de ocratoxina A en café verde, mediante la técnica de HPLC con detección de fluorescencia**

Para los resultados de la verificación de veracidad se obtuvo un porcentaje de recuperación relativa promedio de 59%, esto en 10 muestras enriquecidas con disolución estándar de OTA a 10,2 µg/L. El resultado obtenido promedio de la recuperación relativa es una unidad por debajo del criterio de aceptación de 60-115% para muestras enriquecidas entre los 10-100 µg/L (Aguirre *et al.*, 2001). Dichos resultados se muestran en el Cuadro 8.

Cuadro 8

Resultados de las recuperaciones relativas de diez muestras enriquecidas (10,2 µg/L) del mismo control de café verde obtenidos para la prueba de veracidad del método de ocratoxina A mediante HPLC-FLD.

Muestras enriquecidas	% Recuperación relativa
1	59
2	59
3	58
4	61
5	61
6	63
7	56
8	56
9	60
10	59
Promedio	59
Desviación estándar	2,2
Criterio de aceptación*	60-115%

*En muestras enriquecidas con concentraciones entre los 10-100 µg/L según Duffau *et al.*, (2010).

4.3.3. Resultados de la verificación de la linealidad, sensibilidad y límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) del método de análisis de ocratoxina A en café verde, mediante la técnica de HLPC con detección de fluorescencia

En cuanto a la linealidad del método de análisis de ocratoxina A en café verde, mediante la técnica de HLPC con detección de fluorescencia, se obtuvo un coeficiente de determinación de 1. Por otro lado, para los resultados de sensibilidad

se obtuvo un valor de la pendiente (m) de 34771 y un punto de corte con el eje Y (b) de 1196. Dichos resultados pueden observarse en la Figura 5.

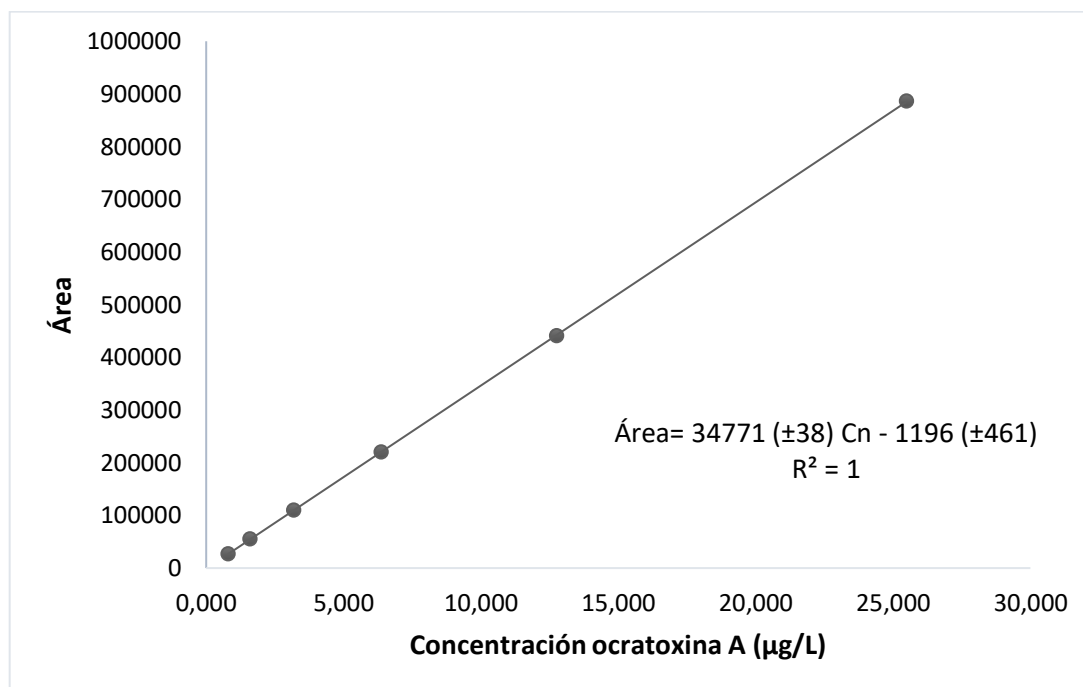


Figura 5. Gráfico del promedio de las Áreas contra Concentración de las tres curvas de calibración de ocratoxina A realizadas para la verificación de la linealidad y sensibilidad del método de análisis de ocratoxina A en café verde, mediante la técnica de HPLC-FLD.

Para la prueba de homogeneidad de varianzas realizada en la verificación de la linealidad se evaluaron las siguientes hipótesis mediante la prueba de Levene:

H_0 = Todas las varianzas de las tres curvas de calibración analizadas son semejantes entre sí.

H_a = Por lo menos una de las varianzas de las tres curvas de calibración analizadas es diferente.

En esta prueba de homogeneidad de varianzas se obtuvo que las tres líneas de las curvas estudiadas en la Figura 6 se sobreponen entre sí, lo cual denota que dichas curvas de calibración poseen semejanza entre sí. Aunado a esto, según el

criterio de aceptación, se rechaza H_0 cuando el valor $p < \alpha$ (0,05) (Ramachandran y Tsokos, 2015). Sin embargo, para la prueba de Levene realizada p valor obtenido (0,997) $> \alpha$ (0,05). Por tanto, se acepta H_0 (las varianzas de las tres curvas analizadas son semejantes).

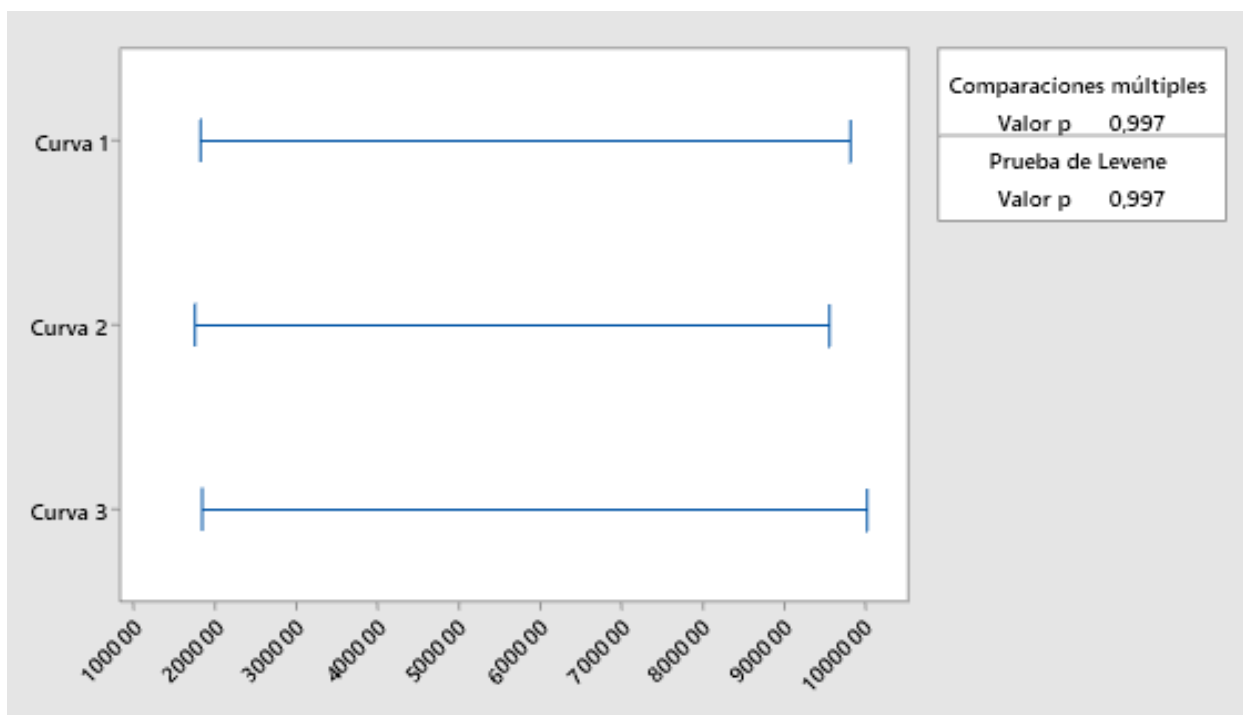


Figura 6. Gráfico de la prueba de igualdad de varianzas para las tres curvas de calibración de ocratoxina A, realizadas en la verificación de la linealidad y sensibilidad del método de análisis de Ocratoxina A en café verde mediante la técnica de HPLC-FLD. Elaboración propia con Minitap 19.

En cuanto a los resultados de los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ), los cuales se calcularon con base en los promedios de la respuesta obtenida en el equipo de diez curvas de calibración, se obtuvo 0,05 $\mu\text{g/L}$ para el LOD y 0,18 $\mu\text{g/L}$ para el LOQ. Dichos resultados pueden visualizarse en el Cuadro 9.

Cuadro 9

Resultados obtenidos de límites de detección y límite de cuantificación obtenidos para la validación del método de ocratoxina A con HPLC-FLD.

Límite	Valor Obtenido ($\mu\text{g/L}$)
Límite de detección (LOD)	0,05
Límite de cuantificación (LOQ)	0,18

4.3.4. *Resultados de la verificación de precisión del método de análisis de ocratoxina A en café verde, mediante la técnica de HLPC con detección de fluorescencia*

4.3.4.1. Resultados de la verificación de la precisión en términos de la repetibilidad. En cuanto a los resultados de la repetibilidad se obtuvo un promedio de 5,83 $\mu\text{g/L}$ y un S_r de 0,39 y un RSD_r (Desviación estándar relativa porcentual) de 6,70%, esto al analizar 6 réplicas enriquecidas con estándar de OTA a 10,2 $\mu\text{g/L}$. El RSD_r obtenido 5,64 es menor al 20 % especificado por la Comunidad Europea (RSD_r debe ser $\geq 20\%$) como criterio exigible a todos los métodos de análisis de OTA cuando el rango de concentración en que se evalúa es de 1 a 10 $\mu\text{g/L}$ (Quezada, 2009). Dichos resultados se encuentran en el Cuadro 10.

Cuadro 10

Resultados de repetibilidad obtenidos para la prueba precisión del método de ocratoxina A en café verde con HPLC-FLD.

Réplica	Concentración medida
1	6,06
2	5,32
3	5,99
4	6,38
5	5,50
6	5,72
Promedio	5,83
S_r^*	0,39
RSD_r^{**}	6,70
Criterio de aceptación***	$RSD_r \leq 20\%$

* S_r : desviación estándar de la repetibilidad.

** RSD_r : Desviación estándar relativa porcentual.

*** Criterio de aceptación de repetibilidad cuando el rango de concentración del analito es de 1 a 10 $\mu\text{g/L}$ según la Comunidad Europea (Quezada, 2009).

4.3.4.2. Resultados de reproducibilidad obtenidos en el estudio interlaboratorial realizados por FAPAS. Para conocer un estimado de la reproducibilidad del método se emplearon como referencia los resultados del estudio interlaboratorial realizado por FAPAS en el año 2018. Tal como puede observarse en la Figura 7, la comparación de los resultados se realiza mediante los Z-Scores calculados para cada uno de los 34 laboratorios participantes. En dicha figura se identifica el rango especificado por FAPAS (2018) de $-2 \leq x \leq 2$ dentro del cual debe encontrarse el 95% de los Z-scores obtenidos. Además, el Laboratorio Químico del ICAFE es el laboratorio número 23, el cual es uno de los tres laboratorios que obtuvieron resultados de Z-Score fuera del rango ya mencionado.

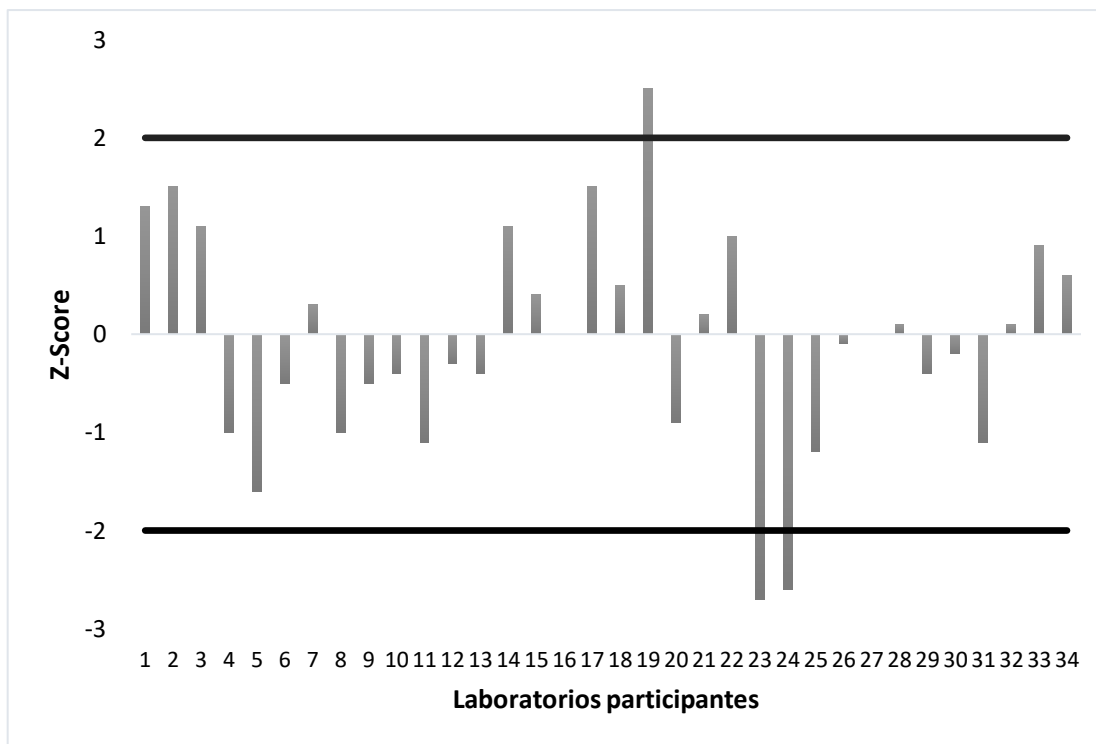


Figura 7. Gráfico del estudio de reproducibilidad basado en los Z-Score pertenecientes a los laboratorios participantes en el estudio interlaboratorial realizado por FAPAS, donde en el rango de $-2 \leq x \leq 2$ debe encontrarse el 95% de los Z-scores obtenidos para dichos laboratorios (FAPAS, 2018).

4.3.5. **Resultado de la verificación de la robustez del método de análisis de ocratoxina A en café verde, mediante la técnica de HPLC con detección de fluorescencia**

Para la prueba de robustez se realizaron ocho experimentos, los cuales consistieron en el cambio de cinco variables principales que podían afectar el desempeño del método (temperatura horno de la columna, fase móvil, velocidad del flujo, volumen de inyección y tiempo de agitación de la muestra). Se obtuvo que las diferencias entre las cinco variables al ser comparados con el criterio de aceptación ($\sqrt{2} S$) no tienen influencia en el método de análisis, lo cual implica que el método de OTA en café verde mediante HPLC-fluorescencia es robusto ante pequeños cambios en dichas variables. Los resultados de robustez pueden verificarse en el Cuadro 11.

Cuadro 11

Resultados obtenidos de la verificación de la robustez realizada para la validación del método de ocratoxina A en café verde con HPLC-FLD.

Condición Variable		Resultados		Diferencia	Criterio de aceptación	Decisión
Valor Alto X	Valor Bajo x	Promedio X	Promedio x	$\Delta(X-x)$	$\Delta(X-x) < \sqrt{2} S^*$	
A ¹	a ¹	4,55	4,55	0,00		Método
B ²	b ²	4,61	4,50	0,11		no sensible
C ³	c ³	4,65	4,46	0,19	$\Delta(X-x) < 0,24$	a variables
D ⁴	d ⁴	4,60	4,50	0,10		estudiadas
E ⁵	e ⁵	4,51	4,59	-0,08		

* Valor $S_r=0,24$ obtenido para la precisión de los resultados perteneciente a los ocho experimentos realizados.

1: A, a: variables mayor y menor de la temperatura del horno.

2: B, b: variables mayor y menor de fase móvil.

3: C, c: variables mayor y menor de la velocidad del flujo.

4: D, d: variables mayor y menor de volumen de inyección.

5: E, e: variables mayor y menor de tiempo de agitación de la muestra.

4.3.6. Resultado del cálculo de incertidumbre del método de análisis de ocratoxina A en café verde, mediante la técnica de HPLC con detección de fluorescencia

La incertidumbre de la medición se calculó empleando el coeficiente de variación de Horwitz brindado con base en el último ensayo interlaboratorial realizado por FAPAS (2018), de modo que se obtuvo una incertidumbre expandida de la medición de $\pm 3 \mu\text{g/L}$ a un 95% de confianza (véase Cuadro 12).

Cuadro 12

Resultado de incertidumbre expandida con un 95% de confianza calculada en base al coeficiente de variación de Horwitz, para el método de análisis de ocratoxina A en café verde mediante la técnica de HPLC-FLD.

Coeficiente de varianza de Horwitz*	Factor de cobertura al 95% de confianza	Incertidumbre expandida de la medición
1,48	2	$\pm 3 \mu\text{g/L}$

* Coeficiente de variación de Horwitz tomado del ensayo interlaboratorial realizado por FAPAS (2018).

5. Discusión

5.1. Optimización de las condiciones analíticas del proceso de extracción y purificación de ocratoxina A para su determinación en café verde a partir de las condiciones existentes en el laboratorio químico del ICAFE

5.1.1. *Prueba efecto de la matriz de café verde en el análisis de ocratoxina A por HLPC*

De acuerdo con los resultados obtenidos en el Cuadro 4, y partiendo de que las muestras fueron enriquecidas con una concentración de 10,2 µg/L, el café verde control de menor calidad presenta una concentración recuperada de 6,58 µg/L, y que el café verde control de mayor calidad una concentración de 5,79 µg/L.

Esto representa en promedio de recuperación de un 64% y un 57% para el café verde de mayor y menor calidad, respectivamente. Lo anterior denota que no hay gran diferencia en el efecto de las calidades de las muestras, es decir, si una muestra contiene granos más uniformes o limpios que otra, esto no representa un factor determinante que altere las recuperaciones obtenidas a través del método de análisis de OTA mediante HPLC-Fluorescencia.

5.1.2. *Verificación de la capacidad de extracción de las columnas de inmunoafinidad empleadas en el análisis de ocratoxina A en café verde, mediante el método de HPLC-fluorescencia*

Con respecto al resultado de la verificación de columnas de inmunoafinidad empleadas en el análisis de OTA en café verde mediante el método de HPLC-fluorescencia, se obtuvo un porcentaje de recuperación de OTA de (Cuadro 5). Se concluye que dicho resultado no cumple con el criterio de aceptación, el cual debería estar para concentraciones de 10 µg/L de 60-115% (Duffau *et al.*, 2010). Las recuperaciones de las columnas de inmunoafinidad están por debajo del límite inferior, de modo que las bajas recuperaciones obtenidas pueden estar muy

relacionadas con el proceso de extracción dentro de las columnas inmunoafinidad empleadas.

En el Cuadro 6 se realiza una comparación del promedio de recuperación de la prueba (Cuadro 5), con promedio de recuperación del estándar de 12,2 µg/L. Con esto se observa que no existe diferencia entre ambos promedios.

Existe gran diferencia entre la preparación de una muestra enriquecida y de un estándar. El estándar, una vez elaborado, se eluye en la columna de inmunoafinidad, contrario a la muestra enriquecida que tiene un tratamiento de extracción de OTA previo. De modo tal que el problema de las bajas recuperaciones obtenidas radicaría en la extracción de OTA en las columnas de afinidad, lo cual puede deberse a que el laboratorio no cuenta con un colector de vacío (manifold), el cual permite además del procesamiento de varias muestras de forma simultánea, un control adecuado de la velocidad del flujo del sistema de vacío.

El control de dicha velocidad de goteo podría ser factor determinante para obtener buenas recuperaciones al emplear las columnas de inmunoafinidad para ocratoxina A, dado que Trilogy Analytical Laboratory (2010) especifica en su procedimiento conservar el goteo a 1-2 gotas/segundo. Además, Naegele (2014) indica que no debe excederse una velocidad de flujo de 5 mL/min del sistema de vacío y, a su vez, La Pera *et al.* (2008), en su investigación, emplearon un flujo de 3 mL/min.

5.2. Optimización las condiciones instrumentales del HPLC para el análisis de ocratoxina A en café verde

5.2.1. Prueba de idoneidad del sistema cromatográfico

Como puede apreciarse en el Cuadro 7, para la prueba de idoneidad del sistema cromatográfico se obtuvo un factor de capacidad (k') de 6,19, lo cual se encuentra acorde a lo especificado por la Guía de Validación AEFI. Esta guía recomienda una óptima resolución con valores mayores a 2 (Aguirre *et al.*, 2001).

Del mismo modo, Morantes *et al.*, (2010) obtuvieron valores mayores a 2 para el factor de capacidad (2,11 y 3,32) de los dos analitos examinados en su trabajo.

En cuanto al número de platos teóricos obtenido de 14297, cumple con el valor recomendado por la Guía de Validación AEFI, el cual implica que debe ser mayor a los 2000 platos teóricos (Aguirre *et al.*, 2001). Partiendo del hecho de que la cromatografía será tanto mejor cuánto más puedan separarse los componentes de una mezcla (González, 2010), se deduce a partir del alto número de platos teóricos obtenido que la columna empleada para el análisis de OTA en café verde mediante HPLC-FLD en el Laboratorio Químico del ICAFE asegura una alta eficacia de separación y, por ende, es óptima para ser empleada en dicho análisis.

Otros trabajos como el de Martínez *et al.* (2018), señala que obtuvieron un valor de 10512; de igual modo, Sanabria *et al.* (2017) lograron un valor de 7725, siendo ambos valores mayores al igual que el alcanzado en el presente estudio mayores a los 2000 platos teóricos.

Por otro lado, el factor de asimetría obtenido de 1,3 se encuentra entre los valores aceptados de 0,8-1,5 dados por la Guía de Validación AEFI (Aguirre *et al.*, 2001). Dicho resultado evidencia que el pico cromatográfico de la OTA obtenido es simétrico, es decir, posee semejanza con una curva Gaussiana (Legaz *et al.*, 2011), por lo cual se demuestra que se ven minimizadas las impresiones en la detección del inicio y del final del pico cromatográfico de la OTA por parte de la integración empleada por el equipo de HPLC (Aguirre *et al.*, 2001), lo cual permite la cuantificación precisa del área bajo la curva del pico cromatográfico. Aunado a esto, en otros estudios se han obtenido valores similares y acordes con el valor aceptado expuesto, de modo que Ruiz (2019) obtuvo un factor de asimetría de 1,04 y Martínez *et al.* (2018) uno de 1,22.

Así las cosas, en cuanto a la precisión durante prueba de idoneidad se obtuvo un coeficiente de variación de 1,35%. Según Aguirre *et al.* (2001), la USP 24 establece como criterio de aceptación un coeficiente de variación igual o menor al 2% con el que se acepta la precisión de la prueba idoneidad realizada al sistema HPLC para el análisis de OTA en café verde optimizado en el presente trabajo. Además, trabajos donde se obtuvieron también resultados menores al 2% son los

realizados por Ruiz (2019), quien obtuvo un valor de 0,32, mientras que Bustillo *et al.* (2014) alcanzaron un valor de 0,35.

El hecho de que los parámetros de la prueba de idoneidad hayan cumplido con los especificados indica que las condiciones instrumentales del análisis de OTA en café verde mediante la técnica de HPLC-FLD son óptimas, por lo cual se tiene la certeza de que dicha técnica es ideal para la cuantificación de OTA mediante el método optimizado.

5.3. Validación del método de cuantificación de ocratoxina A en café verde de acuerdo con los parámetros de desempeño establecidos por el ente costarricense de acreditación (ECA)

5.3.1. Verificación de la selectividad del método de análisis de ocratoxina A en café verde, mediante la técnica de HLPC con detección de fluorescencia

De acuerdo con la verificación de la selectividad del método de análisis de OTA en café verde, mediante la técnica de HPLC-fluorescencia, se obtuvieron los tres cromatogramas mostrados en la Figura 4. Así, el cromatograma A pertenece al estándar 3 de la curva de calibración de OTA, que tiene una concentración de 3,2 µg/L. En este se observa que el sistema tiene la capacidad de detectar OTA debido a la presencia de un solo pico cromatográfico, esto demuestra que no hay presencia de otras señales que puedan interferir en la determinación de OTA. Además, en el cromatograma B, que pertenece al blanco de la matriz de café verde, se evidencia la ausencia de señal relacionada a la OTA, lo cual es esperable por tratarse de la medición de un blanco. Aunado a esto, en el cromatograma C que pertenece a una muestra enriquecida de OTA a 10.2 µg/L, se ve claramente la respuesta equipo ante dicha concentración. Por tanto, se demuestra que el método empleado es selectivo y está capacitado para cualificar y cuantificar al analito en cuestión (OTA) (Duffau *et al.*, 2010).

5.3.2. Verificación de veracidad del método de análisis de ocratoxina A en café verde, mediante la técnica de HPLC con detección de fluorescencia

Para confirmar la veracidad del método de análisis se obtuvo un porcentaje de recuperación promedio de 59% al analizar 10 muestras enriquecidas con disolución estándar de OTA a 10,2 µg/L. Según Duffau *et al.* (2010), con una concentración de 10 µg/L deben obtenerse recuperaciones entre 60 a 115%. Dicho rango de recuperación es bastante amplio y, sin embargo, el valor obtenido (59%) se encuentra justo en el límite inferior. Lo cual permite afirmar que el rendimiento del método analítico en cuanto a su proceso de extracción y la cantidad de OTA encontrada en las muestras enriquecidas se encuentra en el límite de la especificación y, por ende, no es del todo óptimo (Duffau *et al.*, 2010). Esto último se ve afianzado con los resultados discutidos en la sección 5.1.2, donde se evidenció que el método presenta problemas para recuperar la OTA.

Del mismo modo, el porcentaje de recuperación obtenido de 59% es bajo al compararse con estudios de validaciones similares, tal es el caso de Milla (2022), quien realizó una validación a un método de análisis de OTA en café mediante el método HPLC-Fluorescencia y obtuvo una concentración de 10,0 µg/L y un porcentaje de recuperación de 74,94. También, Vallejos (2006), empleando el mismo método y la misma concentración de muestra enriquecida, alcanzó un porcentaje de recuperación del 74%.

5.3.3. Verificación de la linealidad, sensibilidad y límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) del método de análisis de ocratoxina A en café verde, mediante la técnica de HPLC con detección de fluorescencia

En lo que respecta a la verificación de la linealidad del método de análisis de ocratoxina A en café verde, mediante la técnica de HPLC, el coeficiente de determinación obtenido es de 1. Según el criterio establecido, el coeficiente de

determinación (r^2) debe ser mayor o igual a 0,999 (cercano a 1). De hecho, el resultado de coeficiente de determinación obtenido (1) es similar al de 0,999 obtenido tanto por Milla (2022) como por Alves (2004) en sus respectivos estudios.

Además, a través de la prueba de Levene se determinó que las tres líneas de las curvas estudiadas se sobrepone entre sí, y al comparar el valor p (0,997), el cual es mayor al nivel de significancia empleado de 0,05, se concluye que no hay evidencia estadística significativa para rechazar H_0 , por tanto, se acepta que las tres curvas son semejantes entre sí. Esto sumado al resultado del coeficiente de determinación obtenido demuestra que el método de análisis empleado posee una óptima linealidad, es decir, que posee la capacidad de dar una respuesta proporcional a la cantidad de OTA analizada dentro de un intervalo definido (curva de calibración) (Duffau *et al.*, 2010).

A propósito de la sensibilidad del método, al analizar el gráfico en la Figura 5, este posee una pendiente de la recta (m) de 34771, y tomando lo indicado por Castro *et al.* (2020) de que cuanto más próxima al eje X sea la recta, la medida de la inclinación (m) será mayor y se deduce que la pendiente (m) obtenida es alta y, por ende, el método posee una excelente respuesta analítica para la ocratoxina A. A su vez, esto se traduce en menores variaciones en los resultados pertenecientes a grandes cambios en las concentraciones esperadas de OTA (Duffau *et al.*, 2010).

Para los límites de detección y cuantificación tabulados en el Cuadro 9, se determinó un LOD de 0,05 $\mu\text{g/L}$ y LOQ de 0,18 $\mu\text{g/L}$. Dichos valores son muy importantes para el laboratorio en cuestión, debido a que 0,05 $\mu\text{g/L}$ representa la menor cantidad del OTA que el método de análisis empleado puede detectar sin problemas (Huber, 2010), y 0,18 $\mu\text{g/L}$. Así pues, representa el mínimo del analito que puede ser cuantificado con un desempeño aceptable mediante dicho método (Magnusson y Örnemark, 2014). Dichos límites de detección obtenidos en el presente estudio son similares a los obtenidos por Vecchio *et al.* (2012) en Italia usando la misma técnica de análisis de HPLC-Fluorescencia con un límite de detección de 0,05 $\mu\text{g/L}$ y un límite de cuantificación de 0,2 $\mu\text{g/L}$.

5.3.4. Verificación de precisión del método de análisis de ocratoxina A en café verde, mediante la técnica de HLPC con detección de fluorescencia

5.3.4.1. Verificación de la precisión en términos de la repetibilidad.

Para la verificación de la precisión en términos de repetibilidad, tal y como puede apreciarse en el Cuadro 10, se obtuvo una desviación estándar relativa (RSD_r) de 6,70% al analizar 6 réplicas enriquecidas con una concentración de 10,2 $\mu\text{g/L}$. Según la especificación dada por la CE (Comunidad Europea) para los métodos de OTA en concentraciones de 1 a 10 $\mu\text{g/L}$, el valor de RSD_r debe ser menor o igual al 20% (Quezada, 2009). Por lo anterior, se determina que el método estudiado en cuestión es repetible. Similar al resultado de RSD_r obtenido en la presente práctica dirigida, Quezada (2009) obtuvo un RSD_r de 5,04 al evaluar una concentración de OTA de 2,66 $\mu\text{g/L}$.

5.3.4.2. Verificación de la recisión en términos de la reproducibilidad.

No se realizó una prueba capaz de medir la precisión intermedia debido a la pandemia del COVID-19, pues en el primer semestre del 2021 el ICAFE no estaba recibiendo pasantes de forma presencial, lo cual ocasionó que la presente práctica dirigida solo pudiera llevarse a cabo durante un semestre y el consumo de insumos fuera limitado para realizar esta prueba.

Ahora bien, antes de la pandemia, el laboratorio químico del ICAFE participó en el interlaboratorial de FAPAS en el 2018 (es importante resaltar que debido al COVID 19 no ha vuelto participar en estas comparaciones). Los resultados de este estudio se tomaron solo como referencia para el cálculo de la reproducibilidad en esta práctica dirigida.

En lo que se refiere a los resultados de reproducibilidad de la prueba interlaboratorial de FAPAS, se basaron en la medición del Z-Score (véase sección 3.4.3, Ecuación 4) para cada uno de los 34 laboratorios participantes. FAPAS (2018), en su informe de ensayo interlaboratorial, señala que en circunstancias normales un 95% de los Z-Score deben caer dentro del rango de $-2 \leq z \leq 2$ y apunta que la

importancia de que existan resultados que se salgan de ese solo puede ser decidido al ser considerarlos en el contexto de los resultados de los demás laboratorios.

Los resultados obtenidos por FAPAS se encuentran representados mediante el gráfico de barras de la Figura 7, el laboratorio químico del Icafe es el laboratorio 23, el cual se observa menor a -2 y, por tanto, se sale del rango contemplado por FAPAS. Además, tomando en cuenta los resultados de los demás laboratorios, solo tres de ellos estuvieron fuera de rango (19, 23 y 24), lo cual deja ver que estos tres resultados son distintos a los demás, por esta razón se comprueba que el método de Análisis de OTA en café verde, mediante HPLC-fluorescencia empleado por el ICAFE en dicho ensayo interlaboratorial no fue preciso en términos de reproducibilidad.

5.3.5. Verificación de la robustez del método de análisis de ocratoxina A en café verde, mediante la técnica de HLPC con detección de fluorescencia

La verificación de la robustez del método, según se muestran los resultados en el Cuadro 11, al analizar los cambios inducidos por cinco variables (temperatura horno de la columna, fase móvil, velocidad del flujo, volumen de inyección y tiempo de agitación de la muestra) se obtuvo que dichos cambios no afectan el desempeño del método de análisis de OTA en café verde mediante HPLC-fluorescencia, de modo que el método resultó ser robusto ante estos. El hecho de que el método de análisis de OTA en café verde mediante HPLC-fluorescencia implementado sea robusto ante variaciones pequeñas, pero deliberadas de las variables estudiadas, tal como indican Duffau *et al.* (2010), confirma su fiabilidad obtener resultados confiables en cuanto a robustez en el Laboratorio Químico del ICAFE.

5.3.6. Incertidumbre del método de análisis de ocratoxina A en café verde, mediante la técnica de HLPC con detección de fluorescencia

La incertidumbre de la medición no se calculó debido a que en el momento en el que se dispuso a realizar la verificación de esta no se contaba con el tiempo suficiente para hacer un cálculo complejo de incertidumbre que contemplara todas

las fuentes de error asociadas al análisis. Es así como se calculó una incertidumbre de referencia, empleando el valor S_{Horwitz} de Hortwitz brindado en un ensayo interlaboratorial realizado por FAPAS (2018), en el cual participó el laboratorio químico del ICAFE. Entonces, al calcular la incertidumbre expandida de la forma mencionada, se obtuvo un valor de $\pm 3 \mu\text{g/L}$ a un 95% de confianza (consultar Cuadro 12). Dicho valor obtenido es útil para conocer, mediante una buena aproximación, la incertidumbre expandida del método de análisis debido a que el método no ha sido alterado desde que se realizó el ensayo interlaboratorial de FAPAS en el 2018 y la pandemia por COVID-19 impidió la participación en más ensayos interlaboratoriales.

6. Conclusiones

- Las condiciones analíticas del proceso de extracción y purificación del método de OTA para su determinación en café verde a partir de las condiciones existentes en el Laboratorio Químico del ICAFE no pudieron ser optimizadas, dado que las recuperaciones de OTA aún después de realizar pruebas siguieron siendo bajas; sin embargo, a partir de las pruebas se determinó que la calidad del café utilizado no influye en la medición y que es probable que el problema de las bajas recuperaciones se localice en la etapa de extracción de la OTA dentro de las columnas de inmutaafinidad porque no existe un adecuado control del flujo del sistema de presión empleado.
- En cuanto a la optimización de las condiciones instrumentales del HPLC para el análisis de ocratoxina A en café verde, al realizar la prueba de idoneidad del sistema se encontró que este es ideal para llevar a cabo el análisis, por tanto, se considera que el sistema cromatográfico se encuentra optimizado.
- De acuerdo con las pruebas de validación realizadas tomando en cuenta los parámetros de desempeño establecidos por el Ente Costarricense de Acreditación (ECA) para el método de cuantificación de OTA en café verde, mediante la técnica de HPLC-FLD, se evidencia que la veracidad del método no es óptima debido a las bajas concentraciones recuperadas de OTA. Sin embargo, este método es selectivo, sensible y preciso en términos de repetibilidad, pero no en términos de reproducibilidad. Así mismo, el método se considera robusto y cuenta con un LOD y LOQ de 0,05 y 0,18 $\mu\text{g/L}$, respectivamente.

7. Recomendaciones

- Se aconseja adquirir el equipo de extracción de vacío adecuado para la remoción de ocratoxina A: colector de vacío (manifold), el cual permite procesar varias muestras a la vez y podría controlar de forma óptima la velocidad de flujo del sistema de vacío a través de la columna de inmunoafinidad, para mejorar considerablemente las recuperaciones de OTA.
- Una vez obtenido el equipo de extracción de vacío, se recomienda realizar nuevamente la prueba de recuperación a las columnas de inmunoafinidad de OTA por triplicado.
- Se recomienda volver a aplicar la prueba de veracidad cuando se haya adquirido el equipo de extracción de vacío adecuado para la extracción de ocratoxina A: colector de vacío (manifold),
- Se recomienda realizar una prueba de precisión intermedia que implique la realización del ensayo con diferentes analistas y en diferentes días para evaluar adecuadamente y a nivel interno la precisión del método de análisis.
- Se recomienda verificar la incertidumbre del método de análisis de OTA en café verde mediante HPLC-FLD, ya sea de forma manual considerando las fuentes del error (a partir de un diagrama de cola de pescado) o mediante el valor de la desviación estándar de Horwitz obtenido en un nuevo estudio interlaboratorial.
- Debido a que ha pasado mucho tiempo desde el estudio interlaboratorial (realizado en el 2018), se recomienda participar de nuevo en estudios interlaboratoriales cuando el laboratorio químico haya validado los parámetros de desempeño de veracidad, precisión intermedia e incertidumbre del método de OTA en café verde.

Referencias

- AFHSE (Asociación de fabricantes de harinas y semolas de España). (2015). *Recomendaciones para la prevención, el control y la vigilancia de las micotoxinas en las fábricas de harinas y sémolas*. Ministerio de agricultura alimentación y medio ambiente de España Secretaría General Técnica (Ed.), En *Catálogo de Publicaciones de la Administración General del Estado*. Ministerio de agricultura alimentación y medio ambiente. Gobierno de España.
- Aguirre, L., García, F. J., García, T., Illera, M., Juncadella, M., Lizondo, M., Lluch, A. M., Martín, M., Ochoa de Echagüen, C., Ortega, M. A., Pujol, M., Reig, M., Torres, M., Antúnez, S., Carro, A. M., García, A., Niubó, C., Oliver, M. P., Caturla, M. C., Celma, C., Encima, G., Jansat, J. M., Nieto, C., Pérez, J.A., Rovira, M., Tost, D., y Cortés, R. (2001). *Validación de Métodos Analíticos*. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (A.E.F.I).
- Alves, E. (2004). *Avaliação da degradação de ocratoxina a em café durante a torrefação*. Escola de Engenharia da UFMG.
- Anacafé. (2019). *Guía de variedades de café Guatemala*. 2da Edición. En *Asociación Nacional del Café Anacafé*.
- Andrade, A. (2006). *Endocrinología: Capítulo 53. Metodologías en el laboratorio clínico: El Inmunoensayo* (V. Arce, P. Catalina, y F. Mallo (eds.)). Universidad de Santiago de Compostela y Universidad de Vigo.
- AOAC (Association of the Official Analytical Chemists). (2016). *Official Methods of Analysis of AOAC International - 20th Edition, 2016*. 20th Ed. Gaithersburg: AOAC.
- Azofeifa, J. (2003). *Prevalencia y prevención de ocratoxinas "A" en café tostado y molido*. Universidad de Costa Rica.

- Barcelo, J. M., Barcelo, R. C., y Alvarez, A. A. (2017). Ochratoxin A, fungal contamination and antioxidant property of defective Arabica coffee in Benguet, Philippines. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 29(1), 10–17.
- Barquero, M. (2017, february). Costarricenses son los segundos consumidores de café en Latinoamérica. *La Nación*.
- Barthelmebs, L., Jonca, J., Hayat, A., Prieto-Simon, B., y Marty, J. L. (2011). Enzyme-Linked Aptamer Assays (ELAAs), based on a competition format for a rapid and sensitive detection of Ochratoxin A in wine. *Food Control*, 22(5), 737–743.
- Basham, J. I., Mor, G. K., y Grimes, C. A. (2010). Förster resonance energy transfer in dye-sensitized solar cells. *ACS Nano*, 4(3), 1253–1258.
- Batista, R., y Chalfoun de Souza, S. (2009). Ochratoxin A and ochratoxigenic fungi in coffee beans (*Coffea arábica* L.) in the southern state of Minas Gerais (1998-2005). *Revista Brasileira de Armazenamento*, 7–15.
- Bedregal, P., Torres, B., Ubillús, M., Mendoza, P., y Montoya, E. (2008). Robustness in NAA evaluated by the Youden and Steiner test. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 278(3), 801–806.
- Berthomieu, C., y Hienerwadel, R. (2009). Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. *Photosynthesis Research*, 101(2–3), 157–170.
- Boyacá, L. (2018). *Estudio exploratorio de la obtención de café verde mediante beneficio Honey y la determinación de su calidad en taza*. Universidad Nacional de Colombia.
- Bozza, A., Tralamazza, S. M., Rodriguez, J. I., Scholz, M. B. S., Reynaud, D. T., Dalzoto, P. R., y Pimentel, I. C. (2013). Potential of Fourier Transform infrared Spectroscopy (FT-IR) to detection and quantification of ochratoxin A: A comparison between reflectance and transmittance techniques. *International*

- Journal of Pharmaceutical, Chemical & Biological Sciences*, 3(4), 1242–1247.
- Bucheli, P., Kanchanomai, C., Meyer, I., y Pittet, A. (2000). Development of ochratoxin A during Robusta (*Coffea canephora*) coffee cherry drying. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(4), 1358–1362.
- Bustillo, P., Daza, M., y Sierra Martínez, N. (2014). Validación de una metodología por HPLC en fase inversa para la determinación de Candésartan Ciléxetil en tabletas recubiertas. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 43(1), 55–68.
- Cameán, A., y Repetto, M. (2012). *Toxicología alimentaria* (E. D. DeSantos (ed.)). Editorial Díaz de Santos, S.A.
- Castro, S., Pineda, A., Caribali, J., y Castillo, J. (2020). Conceptos básicos de validación de métodos analíticos. En *Aportes analíticos al estudio de aguas residuales y potables*. Universidad Santiago de Cali.
- Centro de Comercio Internacional. (2011). *Guía del Exportador de Café, tercera edición*. Organización Mundial del Comercio y las Naciones Unidas.
- Chugá, J. (2018). *Evaluación de los parámetros tiempo, temperatura y variedad de café Arábica Coffea Arabica Castillo y Típica en el proceso de tostado*. Universidad Técnica del Norte.
- Crubellati, R., y Di Risio, C. (Eds.). (2009). *Aspectos prácticos de la validación e incertidumbre en medidas químicas*. CYTED (Ciencia y Tecnología para el Desarrollo).
- Couceiro, J. F., Guerrero, J., Gijón, M. C., Moriana, A., Pérez, D., y Rodríguez, M. (2013). *El cultivo del pistacho*. Ediciones Mundi-Prensa.
- Davidovich, G., Jiménez, F., y Segura, J. M. (2019). Ocratoxina A en café. *Ciencia y Salud UCIMED*, 3(3), 21–26.
- Delgado de la Torre, R. (2004). *Iniciación a la probabilidad y la estadística*.

Universidad Autónoma de Barcelona.

- Díaz, A., Silva, M., y Dávila, J. (2018). Relationship between good hygiene practices and ochratoxin A in organic coffee (*Coffea arabica* L.) from the main coffee regions in Peru. *Scientia Agropecuaria*, 9(2), 177–187.
- Duffau, B., Guerrero, I., Roa, L., Rodríguez, R., Soto, M., Aguilera, M., y Sandoval, S. (Eds.). (2010). *Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición. “Aspectos generales sobre la validación de métodos”*. Instituto de Salud Pública de Chile.
- ECA (Ente Costarricense de Acreditación). (2019). *Criterios para evaluación y acreditación de laboratorios bajo la norma INTE-ISO/IEC 17025:2017*. ECA.
- ELIKA. (2013). Ficha Ocratoxina A. *Fundacion Vasca Para La Seguridad Agroalimentaria (ELIKA)*, 1–4.
- ELIKA. (2020). *Ocratoxina A*. Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria ELIKA; Gobierno Vasco.
- FAPAS. (2018). *Food Chemistry Proficiency Test Report 17184. Ochratoxin A in Coffee (Green)*.
- Forbes, B., Sahm, D., y Weissfeld, A. (2009). *Bailey & Scott Diagnóstico microbiológico. 12a Edición*. Editorial Médica Panamericana.
- Fujii, S., Reche Ribeiro, R. M., Dos Santos Scholz, M. B., Sataque Ono, E. Y., Prete, C. E. C., Nakagawa Itano, E., Ueno, Y., Kawamura, O., y Hirooka, E. Y. (2006). Reliable indirect competitive ELISA used for a survey of ochratoxin A in green coffee from the North of Paraná State, Brazil. *Food Additives and Contaminants*, 23(9), 902–909.
- Gallo, A., Bruno, K. S., Solfrizzo, M., Perrone, G., Mulè, G., Visconti, A., y Baker, S. E. (2012). New insight into the ochratoxin a biosynthetic pathway through deletion of a nonribosomal peptide synthetase gene in *Aspergillus carbonarius*.

Applied and Environmental Microbiology, 78(23), 8208–8218.

Garrido-Ramírez, E., Hernández-Gómez, E., Espinosa-Paz, N., Camas-Gómez, R., Quiroga-Madrigal, E., Rincón-Espinosa, M., y Farrera-Ruiz, L. (2018). Identification of Fungi and Mycotoxins Associated To Coffe Beans (*Coffea L.*) In Chiapas, Mexico. *Agroproductividad*, 11, 57–64.

Giesen, C., Jakubowski, N., Panne, U., y Weller, M. G. (2010). Comparison of ICP-MS and photometric detection of an immunoassay for the determination of ochratoxin A in wine. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 25(10), 1567–1572.

Gismera, M., Quintana, M., y Silva de Campos, M. (2009). *Introducción a la cromatografía líquida de alta resolución*. Editorial Universidad Autónoma de Madrid.

González, A. (2010). *Principios de bioquímica clínica y patología molecular*. Elsevier.

Ha, T. H. (2015). Recent advances for the detection of ochratoxin A. *Toxins*, 7(12), 5276–5300.

Herrera, V., Ticona, J. C., Udaeta, E., Chuqui, R., y Giménez, A. (2008). Validación del método analítico para la cuantificación de alcaloides quinolínicos del extracto de *Galipea longiflora* Krause Kallunki. *Biofarbo*, 16, 47–53.

Huber, L. (2010) *Validation of Analytical Methods*. Agilent Technologies.

ICAFFE. (2011). *Guía Técnica para el Cultivo del Café*. Instituto del Café de Costa Rica.

ICAFFE. (2015). *Acerca del ICAFFE*. Instituto del Café de Costa Rica.

ICAFFE. (2020). *Instructivo para la determinación de Ocratoxina en café por la técnica de HPLC*. Laboratorio químico del ICAFFE.

Karageorgou, E., y Samanidou, V. (2014). Youden test application in robustness assays during method validation. *Journal of Chromatography A*, 1353, 131–139.

- Karoki, P. K., Njue, W. M., Swaleh, S., Njoroge, E. K., y Kathurima, C. W. (2018). Determination of Ochratoxin A in Selected Cereal Grains Retailed in Nairobi County, Kenya. *Journal of Food Research*, 7(5), 79.
- Kocsubé, S., Varga, J., Szigeti, G., Baranyi, N., Suri, K., Tót, B., Toldi, É., Bartók, T., y Mesterházy, A. (2013). Aspergillus species as mycotoxin producers in agricultural products in central Europe. *Jour. Nat. Sci, Matica Matica Srpska Novi Sad*, 631(124), 13–25.
- Kokina, A., Pugajeva, I., y Bartkevics, V. (2016). Improved sensitivity of ochratoxin A analysis in coffee using high-performance liquid chromatography with hybrid triple quadrupole-linear ion trap mass spectrometry (LC-QqQLIT-MS/MS). *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 33(4), 693–702.
- La Pera, L., Avellone, G., Lo Turco, V., Di Bella, G., Agozzino, P., y Dugo, G. (2008). Influence of roasting and different brewing processes on Ochratoxin A content in coffee determined by HPLC-FLD. *Food Additives and Contaminants*, 25(10), 1257–1263.
- Legaz, M., Sacristán, M., Díaz, E., Borja, A., Córdoba, C., Agualeles, B. A., y Córdoba, C. V. (2011). Curso de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC): Series, Técnicas y Métodos. *Reduca (Biología)*, 4(3), 33–47.
- Liu, M., Li, X., Li, B., Du, J., y Yang, Z. (2020). A fluorometric aptamer-based assay for ochratoxin A by using exonuclease III-assisted recycling amplification. *Microchimica Acta*, 187(1).
- López de Cerain, A., Jimenez, A. M., Ezpelata, O., y Bello, J. (2000). Efectos tóxicos de la Ocratoxina A. *Revista de Toxicología*, 17(2), 61–69.
- López de Cerain, A., y Soriano del Castillo, J. M. (2007). Ocratoxina A. En *Micotoxinas en alimentos*. Ediciones Díaz de Santos.

- Luna, M., Lozada, Y., y Trigos, A. (2010). Aislamiento de cepas de *Aspergillus niger*, productoras de ocratoxina A, en café verde (*Coffea arabica*) almacenado. *Revista Mexicana de Micología*, 32, 63–68.
- Magnusson, B., y Örnemark, U. (2014). Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics (2.a ed.). www.eurachem.org.
- Martínez, L., Martínez, J., y Baena, Y. (2018). Validación de una metodología analítica por HPLC-DAD para la cuantificación de ácido benzoico complejado, en un ensayo de permeación transdérmica in vitro empleando piel de cerdo. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 47(3), 424–440.
- Milla, F. (2022). *Evaluación de nivel contaminante de Ocratoxina A por columnas de inmunoafinidad y Cromatografía Líquida de Alta Afinidad (HPLC), en Coffea arabica L. (café verde y tostado) del distrito Perené, provincia Chanchamayo*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Mongay, C. (2005). *Quimiometría*. Universitat de València.
- Morantes, M., Vargas, M., Figueroa, F., Sierra, N., y Barbosa, H. (2010). Desarrollo y validación de una metodología analítica por HPLC para la cuantificación de fenobarbital en una suspensión extemporánea. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 39(1), 68–78.
- Ministerio de Salud. (09 de julio 2014). *Guía de validación de métodos analíticos*. En *Registro de productos de interés sanitario*.
- Naegele, E. (2014). Determination of Ochratoxin A in Roasted Coffee According to DIN EN 14132. *Agilent Technologies*, 8.
- Nganou, N. D., Durand, N., Tatsadjieu, N. L., Métayer, I., Montet, D., y Mbofung, C. M. F. (2014). Fungal Flora and Ochratoxin A Associated with Coffee in Cameroon. *British Microbiology Research Journal*, 4(1), 1–17.

- Nielsen, K. F., Ngemela, A. F., Jensen, L. B., De Medeiros, L. S., y Rasmussen, P. H. (2015). UHPLC-MS/MS determination of ochratoxin A and fumonisins in coffee using QuEChERS extraction combined with mixed-mode SPE purification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(3), 1029–1034.
- Panneerselvam, P., Velmourougane, K., Shanmukhappa, D., Gopnandhan, T., y Naidu, R. (2002). *Study on the effect of ripeness on toxigenic mould contamination and dynamics of moisture loss in Arabica Cherry* (pp. 663–667). Proceedings of Placrosym XV.
- Pérez, E., Martínez-Peinado, P., Marco, F., Gras, L., Sempere, J. M., Mora, J., y Grindlay, G. (2017). Determination of aflatoxin M1 in milk samples by means of an inductively coupled plasma mass spectrometry-based immunoassay. *Food Chemistry*, 230, 721–727.
- Pittet, A., y Royer, D. (2002). Rapid, low cost thin-layer chromatographic screening method for the detection of ochratoxin A in green coffee at a control level of 10 µg/kg. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(2), 243–247.
- Prelle, A., Spadaro, D., Denca, A., Garibaldi, A., y Gullino, M. L. (2013). Comparison of clean-up methods for ochratoxin A on wine, beer, roasted coffee and chili commercialized in Italy. *Toxins*, 5(10), 1827–1844.
- Quezada, C. (2009). *Validación de un método de análisis para Ocratoxina A en café verde, utilizando Columnas de Inmunofinidad y Cromatografía Líquida de Alta Resolución*. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
- Quintana, E., Antillón, F., y Azofeifa, J. (2007). Determinación de ocratoxina A en plasma humano y en café de Costa Rica por un método de ELISA. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, 57(2), 168–172.
- Ramachandran, K. M., y Tsokos, C. P. (2015). *Mathematical Statistics with Applications in R. Second Edition*. Elsevier Academic Press.

- Ravelo, A., Rubio, C., Gutiérrez, A. J., y Hardisson de la Torre, A. (2011). La ocratoxina A en alimentos de consumo humano: Revisión. *Nutricion Hospitalaria*, 26(6), 1215–1226.
- Rayo, G., y Rivera, T. (2014). *Validación del método analítico de Ibuprofeno en tabletas de 600 mg por cromatografía líquida de alta resolución*. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua.
- Reglamento (UE) 2022/1370 de la Comisión, de 5 de agosto de 2022. Modificación al Reglamento (CE) No. 1881/2006 en lo que respecta al contenido máximo de ocratoxina A en determinados productos alimenticios. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L 206/11, del 08 de agosto de 2022.
- Resolução (ANVISA) - RDC No 7, de 18 de fevereiro de 2011(*). Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. *Diário Oficial da União*, Nº 46, de 9 de março de 2011.
- Resolución (Ministerio de Salud y Protección Social) 004506, de 30 de Octubre de 2013. Por la cual se establecen los niveles máximos de contaminantes en los alimentos destinados al consumo humano y se dictan otras disposiciones. *Diario Oficial*, No. 48.960, de 31 de octubre de 2013.
- Reverberi, M., Scala, V., Fabbri, A. A., Scarpari, M., Fanelli, C., Zjalic, S., y Nobili, C. (2012). Methodologies to prevent and control the biosynthesis of different mycotoxins in food and feeds. *Acta Horticulturae*, 963, 83–86.
- Rivera, C., y Rodríguez, M. (2010). Uso de la ecuación de Horwitz en laboratorios de ensayos NMX-EC-17025-IMNC-2006. *Simposio de Metrología*, 1–8.
- Rodríguez, J. (2014). *Estandarización y validación del método por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masa (GC- MS) para el análisis de 4 benzodiazepinas y sus metabolitos en muestras biológicas de interés forense en el Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses*. Universidad

Tecnológica de Pereira.

- Ruiz, G. (2019). *Desarrollo y validación de una técnica analítica verde para la determinación de Diazepam en tabletas mediante Cromatografía Líquida de Alto Performance*. Pontificia Universidad Católica del Perú.
- Sanabria, L., Martínez, J., y Baena, Y. (2017). Validación de una metodología analítica por HPLC-DAD para la cuantificación de cafeína en un ensayo de permeación in vitro empleando mucosa oral porcina. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 46(2), 202–219.
- Sánchez, J. (2020). *Evaluación del rendimiento productivo de cinco clones de Café Robusta (Coffea canephora) en el Centro de Investigación, Posgrado y Conservación Amazónica (CIPCA), Arosemena Tola*. Universidad Estatal Amazónica.
- Santos, E., y Vargas, E. (2002). Immunoaffinity column clean-up and thin layer chromatography for determination of ochratoxin A in green coffee. *Food Additives and Contaminants*, 19(5), 447–458.
- Serrano-Coll, H., y Cardona-Castro, N. (2015). Mycotoxicosis and mycotoxins: generalities and basic aspects. *CES Medicina*, 29(1), 143–151.
- Sieber, M., Wagner, S., Rached, E., Amberg, A., Mally, A., y Dekant, W. (2009). Metabonomic study of ochratoxin A toxicity in rats after repeated administration: Phenotypic anchoring enhances the ability for biomarker discovery. *Chemical Research in Toxicology*, 22(7), 1221–1231.
- Silupu, J., García, R., Pérez, R., y Yauris, C. (2021). Identificación de Ocratoxina A en vinos artesanales. *Sendas*, 2(3), 1–13.
- Skoog, D., West, D., y Holler, F. J. (2020). *Fundamentos de química analítica. Vol. 2. 4ta Edición*. Editorial Reverté.
- Skoog, D., West, D., Holler, J., y Crouch, S. (2015). *Fundamentos de química*

- analítica, novena edición*. Cengage Learning.
- Sueck, F., Hemp, V., Specht, J., Torres, O., Cramer, B., y Humpf, H. U. (2019). Occurrence of the ochratoxin A degradation product 2'R-ochratoxin a in coffee and other food: An update. *Toxins*, 11(6), 1–11.
- Tang, Z., Liu, X., Su, B., Chen, Q., Cao, H., Yun, Y., Xu, Y., y Hammock, B. D. (2020). Ultrasensitive and rapid detection of ochratoxin A in agro-products by a nanobody-mediated FRET-based immunosensor. *Journal of Hazardous Materials*, 387(2020), 121678.
- Toledo, D. (2015). *Estudio de las características organolépticas del café que se procesa en las casas cafetaleras en la provincia de Loja*. Universidad de Cuenca.
- Trilogy Analytical Laboratory (2010). *Procedure for High Pressure Liquid Chromatography Analysis Of Ochratoxin Utilizing OCHRAPREP® Immunoaffinity Column Purification AOAC #2000.03*. Trilogy Analytical Laboratory.
- Vallejos, C. (2006). Estudios comparativos para la determinación de Ocratoxina A en granos de café verde. *Encuentro*, 73, 60–76.
- Vaughan, M. J., Mitchell, T., y McSpadden Gardener, B. B. (2015). What's inside that seed we brew? A new approach to mining the coffee microbiome. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(19), 6518–6527.
- Vecchio, A., Mineo, V., Planeta, D. (2012). Ochratoxin A in instant coffee in Italy. *Food Control*, 28(2), 220–223.
- VICAM. (2017). *Administrando el impacto resultante de los límites de ocratoxina A en la cadena de valor del café*. VICAM, A Waters Business.
- Wang, X. (2014). *Understanding the formation of CO2 and its degassing behaviours in coffee*. University of Guelph.

World Coffee Research. (2018). Las Variedades del Café Arábica. In *World Coffee Research*.

Zumbado, H. (2004). *Análisis químico de los alimentos: métodos clásicos*. Editorial Universitaria.

Anexos

Anexo 1

Resultados de la prueba del efecto de la matriz de café verde en el análisis de ocratoxina A por HLPC.

Controles	Concentración (µg/L)	%Recuperación
Café mayor calidad	6,064	59,450
	5,323	52,19
	5,992	58,75
Café menor calidad	6,690	65,59
	6,187	60,66
	6,856	67,21

Anexo 2

Cálculo del factor de capacidad (k'): en base a Ecuación 1 dada por Aguirre *et al*, (2001).

$$k' = \frac{t_r - t_0}{t_0}$$

Donde:

t_0 : tiempo en que el compuesto no retenido pasa por el interior del sistema.

t_r : tiempo de retención del compuesto considerado.

t_r : 6,513 min

t_0 : 0,906 min

$$k' = \frac{6,513 - 0,906}{0,906} = 6,19$$

Anexo 3

Resultados de las áreas de los picos cromatográficos correspondientes a seis lecturas del estándar 3 de la curva de calibración de la ocratoxina A empleados para verificación de la precisión de la idoneidad del sistema cromatográfico.

Medición del estándar	Área
OTA STD 3	83663,66667
OTA STD 3	83614,95667
OTA STD 3	82258,86333
OTA STD 3	83698,07333
OTA STD 3	80962,76333
OTA STD 3	83552,395
Promedio	82958,45306
DE	1122,526763
%C.V.	1,353119208

Anexo 4

1. Linealidad

1.1. Regresión del promedio de las tres curvas de calibración

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
R Múltiple	0,999998
R Cuadrado	0,999995
R Cuadrado Ajustado	0,999994
Error estándar	810,5364
Observaciones	6
ANOVA	

	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>F_{sig}</i>
Regresión	1	5,40093E+11	5,4E+11	7,3	8,88E-12
Total	5	5,40095E+11			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Error estándar</i>	<i>t Stat</i>	<i>P-value</i>
Intercepto	-1196,38	460,9324754	2,5955	0,06033
Variable X	34770,98	38,34911598	906,69	8,88E-12

1.2. Áreas y concentraciones de los estándares de OTA para las tres curvas de calibración analizadas.

	Áreas Curva 1	Áreas Curva 2	Áreas Curva 3	Área Promedio	Estándares (µg/L)
	27531	26302	27199	27011	0,797
	55033	53159	55393	54528	1,594
	111542	106448	112120	110037	3,188
	222276	213106	223825	219735	6,375
	443313	428806	451008	441043	12,750
	890867	862093	905371	886110	25,500
Mediana	166909	159777	167972		

1.3. Diferencias obtenidas para la prueba de Levene: corresponden al valor absoluto de la diferencia entre cada dato de cada grupo menos la mediana del mismo grupo.

Curva 1	Curva 2	Curva 3
139377	133474	140774
111876	106618	112579
55367	53329	55852
55367	53329	55852
276405	269029	283036
723959	702316	737399

1.4. ANOVA de un factor realizado para la prueba de Levene

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Valor p	F crít
Entre los grupos	390895390,9	2	195447695,5	0,002982861	0,997022175	3,68232034
Dentro de los grupos	9,82854E+11	15	65523575487			
Total	9,83245E+11	17				

1.5. Intervalos de confianza de Bonferroni de 95% para desviaciones estándar (Elaborado con Minitab 19)

Muestra	N	Desv.Est.	IC
Curva 1	6	330170	(56127,7; 3231624)
Curva 2	6	319804	(53982,1; 3152401)
Curva 3	6	336014	(56882,2; 3302642)

Nivel de confianza individual = 98,3333%

1.6. Pruebas (Elaborado con Minitap 19)

Método	Estadística de prueba	Valor p
--------	-----------------------	---------

Comparaciones múltiples	—	0,997
Levene	0,00	0,997

Anexo 5

Cálculo de la desviación estándar relativa de la repetibilidad en base a Ecuación 3 (Quezada, 2009).

$$RSD_r = \left(\frac{S_r}{\bar{X}} \right) * 100$$

$$RSD_r = \left(\frac{0,39}{5,83} \right) * 100 = 6,70 \%$$

Anexo 6

1. Cálculo del LOD y LOQ

1.1. Curvas medidas para la determinación de LOD y LOQ

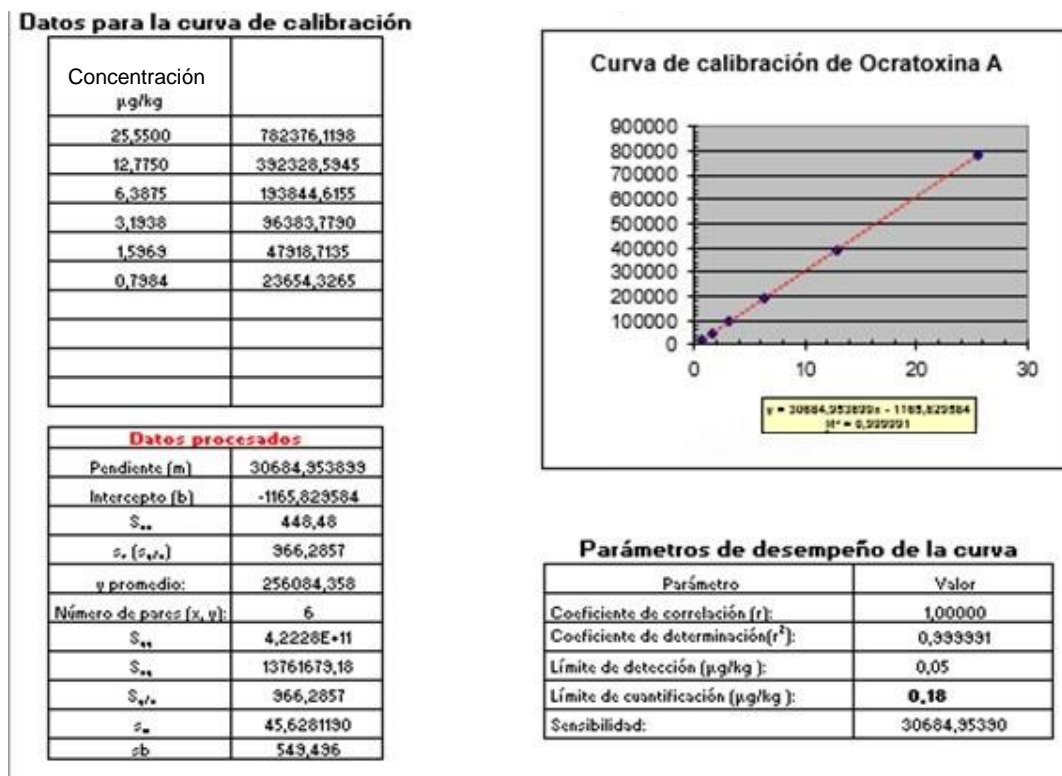
Áreas Medidas												
P*	Cn* *(μ g/L)											Prom edio
		C* 1	C 2	C 3	C 4	C 5	C 6	C 7	C 8	C 9	C 10	
	203											
	0,79	18,6	2258	2388	2258	1833	2630	2753	2335	2719	2444	2365
P 1	7	9	7,53	9,11	7,53	5,3	2,42	1,2	1,62	8,91	0,95	4,33
	430											
	1,59	30,5	4654	4871	4654	3696	5315	5503	4549	5539	4832	4791
P 2	4	6	3,18	0,3	3,18	0,15	8,78	2,99	0,37	3,38	4,24	8,71

			886										
	3,18	89,9	9285	9762	9285	7293	1064	1115	9261	1121	9614	9638	
P 3	8	1	9,52	0,73	9,52	5,55	47,7	41,6	8,94	20,3	4,01	3,78	
			175										
	6,37	634,	1885	2023	1885	1449	2131	2222	1827	2238	1965	1938	
P 4	5	4	26,5	30,7	26,5	21,4	05,9	75,6	13,1	24,6	87,5	44,6	
			378										
	12,7	466,	3789	4047	3789	2903	4288	4433	3705	4510	3980	3923	
P 5	5	1	80,3	48,5	80,3	84,1	06,1	13,3	12,8	08,2	86	28,6	
			731										
	901,	7633	7898	7633	5837	8620	8908	7401	9053	7929	7823		
P 6	25,5	9	76,2	85,4	76,2	94,8	92,8	67,2	29,4	71,4	65,9	76,1	

*Dónde C significa curva y P representa cada estándar.

** Concentración.

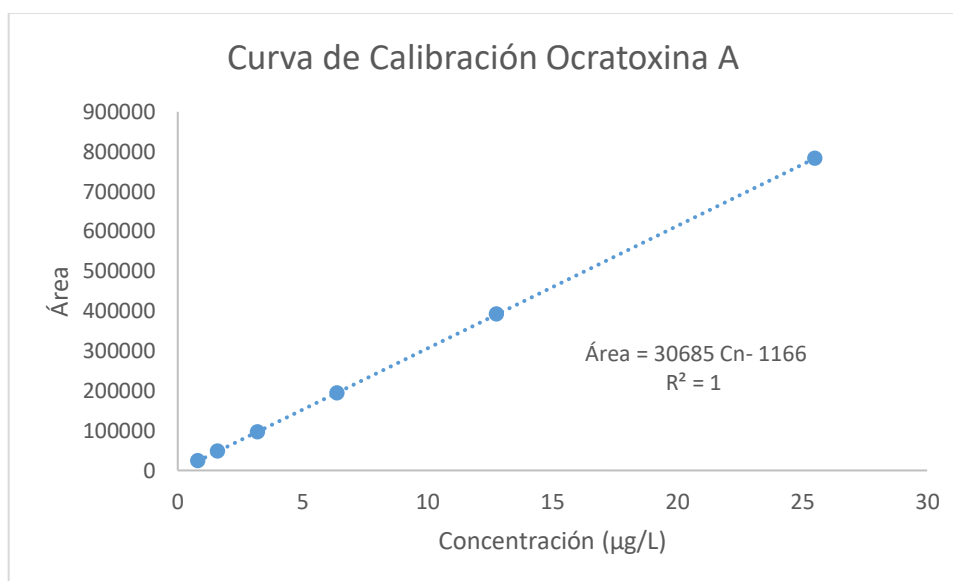
1.2. Hoja de cálculo del ICAFE para la validación de curvas de calibración empleada para el cálculo de los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) para la validación del análisis de ocratoxina A en café verde mediante HPLC-Fluorescencia.



1.3. Parámetros de desempeño de la curva obtenidos de la hoja de cálculo del ICAFE para la validación de curvas de calibración.

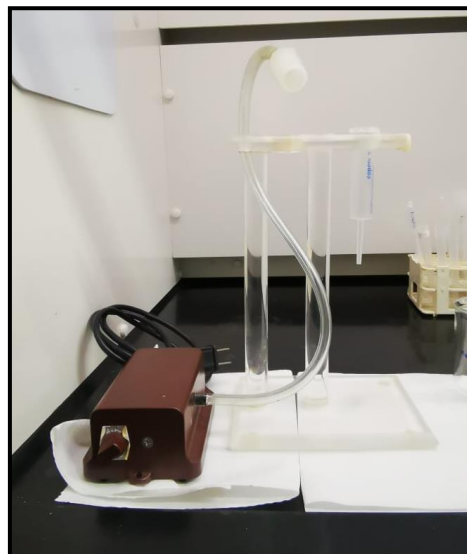
Límite	Valor Obtenido
Límite de detección LOD ($\mu\text{g}/\text{L}$):	0,05
Límite de cuantificación LOQ ($\mu\text{g}/\text{L}$):	0,18
Intercepto (b)	30685
Pendiente (m)	-1166

1.4. Curva de Calibración.



Anexo 7

Bomba de presión positiva empleada para eluir la muestra a través de la columna de inmunoafinidad.



Anexo 8

Factor de dilución empleado para el cálculo de la concentración recuperada de ocratoxina A para la verificación de la capacidad de extracción de columnas de inmunoafinidad.

$$Cn_R = C_m * \frac{1}{3}$$

Dónde:

C_{nR}: Concentración recuperada

C_m: Concentración obtenida al interpolar la curva de calibración.

Anexo 9

1. Incertidumbre.

1.1. Cálculo varianza de Horwitz:

Si $S_{\text{Horwitz}} = 1,22$, entonces de $S_{\text{Horwitz}}^2 = 1,22^2 = 1,48$.

1.2. Cálculo de la incertidumbre expandida de referencia con un 95% de confianza para método de análisis de OTA en café verde mediante la técnica de HPLC con detección de Fluorescencia, empleado en el ICAFE.

$$U'_{\text{método}} = 1,49 * 2 = 2,98 \sim \pm 3 \text{ ppb}$$