

DETECCIÓN DE OCRATOXINA A EN HIGOS SECOS MEDIANTE HPLC

Ruth Blanco Rojo¹, Miguel Ángel Pavón Moreno¹, Isabel Alonso González¹

Tutores: Teresa García Lacarra¹, M^a del Rosario Martín de Santos.¹

¹ Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Veterinaria, UCM.

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.

La ocratoxina A (OTA) es una micotoxina producida por *Penicillium verrucosum* y diversas especies del género *Aspergillus*. Su presencia se ha puesto de manifiesto en numerosos sustratos, tanto frescos como procesados, entre los que se encuentran cereales, café, legumbres, uvas, vino y frutas desecadas.

Además de ser una toxina muy ubicua, OTA es un compuesto muy estable que no se destruye durante las condiciones habituales de procesamiento de los alimentos, ya que para reducir su concentración es preciso someterla a 250°C durante varios minutos. (EFSA, 2006).

La detección de OTA en los alimentos es importante debido a su elevado poder toxicológico. En concreto, la ocratoxina A tiene un marcado carácter nefrotóxico y se ha relacionado con distintas enfermedades renales, como la Nefropatía Endémica de los Balcanes o el desarrollo de tumores en el tracto urinario. Además, la Agencia Internacional para la investigación del cáncer (IARC) clasificó en 1993 a esta micotoxina en el grupo 2B, lo que indica que se trata de un compuesto potencialmente carcinógeno en humanos (IARC, 1993).

En este contexto, las autoridades sanitarias de la Unión Europea han establecido contenidos máximos de OTA para diversos alimentos (Comisión Europea, 2006). El contenido máximo de OTA permitido en uvas pasas es de 10 µg/kg pero está pendiente de establecer el límite para otras frutas desecadas, por lo que es necesario realizar estudios exploratorios de su presencia en estos productos.

La técnica más empleada para la determinación de OTA en diversos alimentos y bebidas como cereales, café, vino, cerveza y uvas pasas es la cromatografía líquida, precedida de purificación de la micotoxina por columnas de inmovinofinidad. Muchas de estas técnicas

se han validado en estudios interlaboratoriales, y se emplean como métodos oficiales en diversos organismos de control. (Visconti y De Girolamo, 2005).

El principal objetivo de este estudio ha consistido en la puesta a punto de una técnica de purificación por inmovilización de anticuerpos y análisis mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC) para la detección y cuantificación de la presencia de ocratoxina A en higos secos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras analizadas

Se analizaron 25 muestras de higos secos adquiridas en comercios minoristas de la Comunidad de Madrid, de diferentes marcas y lotes, que se mantuvieron congeladas hasta su análisis. Una de las muestras se utilizó como muestra control, y se analizó sin adición de OTA y tras su contaminación con 1 y 5 µg/kg de OTA en tolueno:acético (99:1)

Extracción de ocratoxina A

La extracción de la OTA presente en los higos secos se realizó según el método descrito por Senyuva *et al.* (2005) partiendo de 100 g de muestra. La muestra se homogeneizó con un volumen igual de agua destilada. Se tomaron 40 g del homogeneizado (correspondientes a 20 g de muestra) a los que se adicionaron 100 ml de metanol y la mezcla se agitó a alta velocidad durante 1 minuto. Posteriormente se añadieron 80 ml de bicarbonato sódico al 2% y la mezcla se agitó de nuevo durante 2 minutos a alta velocidad. El extracto obtenido se centrifugó a 8500 rpm, durante 20 minutos a 4°C y el sobrenadante se filtró a través de papel Whatman no. 4 guardándose en refrigeración.

Purificación por inmovilización de anticuerpos

La columna de inmovilización de anticuerpos (Neocolum for OTA, Neogen) se lavó con 20 ml de tampón fosfato salino (PBS) a temperatura ambiente. A continuación se pasaron por gravedad a través de la columna 10 ml del extracto filtrado diluidos en 20 ml de tampón PBS. Posteriormente la columna se lavó con 20 ml de PBS/Tween (0,01% v/v), sin que el flujo fuera superior a 4-5 ml /minuto. Finalmente, la OTA se eluyó de la columna con 3 ml de metanol:agua milipore (1:1).

Análisis por HPLC

El análisis por HPLC se llevó a cabo en un cromatógrafo Varian Inert 9012, equipado con inyector automático Rheodyne mod 7512 y un detector fluorimétrico JASCO, mod FP 920, con una longitud de onda de excitación de 333 nm y 460 nm de emisión. Los datos se analizaron con el programa informático Varian Star Chromatography Workstation, v 5.52. La columna analítica utilizada fue una Varian C18 de 4,6 μm y 150 mm precedida de una precolumna Waters C18 de 10 μm . La cromatografía se realizó por elución isocrática a 1ml/min, empleando como fase móvil acetonitrilo:agua:ácido acético (49,5:49,5:1). Previamente al análisis por HPLC, 1 ml del extracto purificado se evaporó bajo chorro de nitrógeno y se resuspendió en 100 μl de fase móvil. La cuantificación de OTA en las muestras se realizó midiendo el área del pico obtenido para el tiempo de retención de la misma y comparándolo con la recta de calibración elaborada para las concentraciones de 1, 2 y 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de OTA en fase móvil.

Los patrones de la recta de calibración se realizaron a partir de una solución de trabajo de 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en tolueno/acético (99:1) que se conservó en refrigeración, procedente a su vez de un stock de 0,2 mg/ml en tolueno/acético (99:1), que se conservó a -20°C .

El límite de detección de la técnica se calculó según la fórmula $L = 3,3 * S_B / b$, donde S_B es la desviación estándar del blanco ($n = 4$) y b la pendiente de la recta de calibración.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de patrones de OTA permitió establecer una recta de calibración (Figura 1) idónea para la cuantificación de OTA en muestras problema en el intervalo de 1-5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de OTA ($r^2 = 0,9999$), con un límite de detección de 0,11 ppb.

El análisis de las muestras control contaminadas con concentraciones conocidas de OTA puso de manifiesto que con el método de extracción y purificación empleado se obtuvo un porcentaje de recuperación del 95% para la muestra contaminada con 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y del 70% para la que se contaminó con 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Los niveles de OTA detectados en los higos secos analizados se muestran en la Figura 2. De las 25 muestras analizadas, 5 muestras (20%) presentaron concentraciones de ocratoxina A inferiores a 0,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 14 muestras (56%) entre 0,1 y 0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 3 muestras (12%) entre 0,5 y 2,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y únicamente 3 muestras (12%) presentaron concentraciones de OTA superiores a las permitidas por la legislación europea para uvas pasas (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

Las concentraciones máximas determinadas, 223 y 308 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de OTA, se obtuvieron a partir de muestras de higos secos de fabricación artesanal comercializadas en un mercado ambulante. Estos valores se corresponden con los encontrados en otros estudios, donde higos contaminados individualmente alcanzaban concentraciones de hasta 9600 ng/g, aunque debido a su alto grado de deterioro es muy posible que no fueran incluidos en productos para consumo humano (Senyuva, 2005).

Los resultados obtenidos mostraron diferencias en la concentración de OTA entre muestras de diferentes lotes de la misma marca comercial (por ejemplo muestras 3 y 6) e incluso entre diferentes submuestras de un mismo lote (muestras 13 y 15), lo que indica la presencia heterogénea de la toxina en la muestra y la importancia del método de muestreo en el análisis de OTA.

A diferencia de las aflatoxinas, que producen fluorescencia bajo luz ultravioleta, permitiendo separar físicamente los frutos contaminados, no se dispone de un método de cribado para la detección y separación de higos contaminados con ocratoxina. Por ello, la inclusión de un fruto fuertemente contaminado con OTA en la muestra analizada puede determinar grandes variaciones entre muestras de un mismo lote (Senyuva *et al*, 2005; Möller *et al*, 2003).

Los resultados de este trabajo se encuentran dentro del rango de los obtenidos por otros investigadores. Iamanaka *et al* (2005) encontraron concentraciones superiores a 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de OTA en el 26,3% de las 19 muestras de higos secos analizadas; mientras que Möller *et al* (2003) detectaron concentraciones superiores a 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de OTA en el 4% de las 118 muestras de frutas secas analizadas. Asimismo, Senyuva *et al* (2005) analizaron muestras de higos secos cultivados en dos años consecutivos (2003 y 2004) mediante métodos de extracción alcalinos, obteniendo en ambas campañas resultados positivos de la presencia de

ocratoxina A en un 14 al 15% de las muestras. Estos resultados fueron más altos que los obtenidos anteriormente por los mismos investigadores con métodos de extracción en medio ácido, lo que demuestra la superioridad de la extracción en medio alcalino como método para la recuperación de la toxina.

BIBLIOGRAFÍA

- Comisión Europea. (2006) Reglamento (CE) N° 1881/2006 de la Comisión de 19 de diciembre de 2006 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. Diario oficial de la Unión Europea. L364: 5-24.
- EFSA (European Food Safety Authority). (2006). Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a Request from the Commission related to ochratoxin A in food. Adopted on 4 April 2006. The EFSA Journal, 365: 1-56.
- Iamanaka B. T., Taniwaki M. H, Menezes H. C., Vicente E. y Fungaro M. H. P. (2005). Incidence of toxigenic fungi and ochratoxin A in dried fruits sold in Brazil. Food Additives and Contaminants, 22: 1258–1263.
- IARC (International Agency for Research on Cancer). (1993). Ochratoxin A (Group 2B). Summaries and Evaluations 56: 489. Lyon, France.
- Möller T. E. y Nyberg M. (2003). Ochratoxin A in raisins and currants: basic extraction procedure used in two small marketing surveys of the occurrence and control of the heterogeneity of the toxins in samples. Food Additives and Contaminants, 20: 1072–1076
- Senyuva H.Z., Gilbert J., Ozcan S.y Ulken U. (2005) Survey for Co-occurrence of Ochratoxin A and Aflatoxin B₁ in dried figs in Turkey by using a single laboratory-validated alkaline extraction method for Ochratoxin A. Journal of Food Protection, 68 :1512-1515.
- Visconti A. y De Girolamo A. (2005). Fitness for purpose – Ochratoxina A analytical developments. Food additives and contaminants, 1: 37-44.

AGRADECIMIENTOS:

Este trabajo ha sido financiado por el Banco Santander/UCM (proyecto PR27/05-13995) y por la Dirección General de Universidades de la Comunidad de Madrid (Programa de Vigilancia Sanitaria S-0505/AGR/000265). Ruth Blanco disfruta una Beca Colaboración del

Ministerio de Educación y Ciencia y Miguel Ángel Pavón una Beca Predoctoral del mismo ministerio. Los autores agradecen a Avelina Miranda (CAI de Espectrometría Atómica de la UCM) su asistencia en el análisis por HPLC.

Figura 1. Recta de calibración para la determinación de OTA en higos secos en el intervalo 0-5 µg/kg.

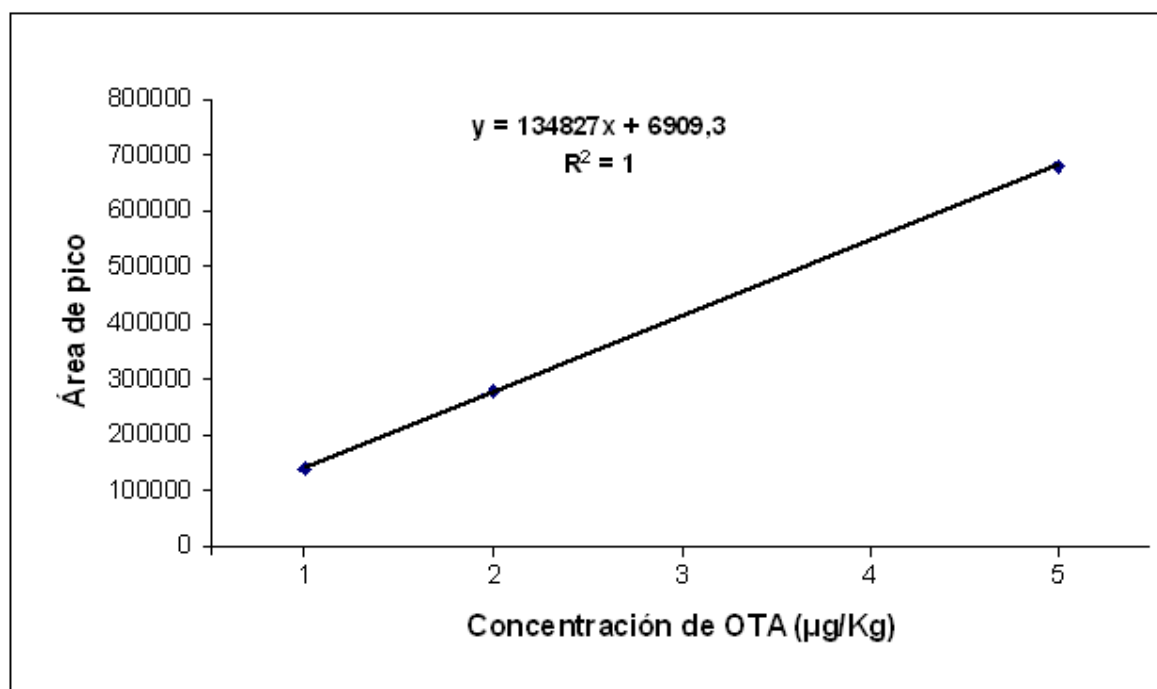


Figura 2. Resultados obtenidos al analizar por HPLC la presencia de OTA en higos secos comerciales (μg OTA/Kg muestra)

