

Determinación de ocratoxina A en plasma humano y en café de Costa Rica por un método de ELISA

Eugenia María Quintana Guzmán, Florencia Antillón Guerrero, Jessica Azofeifa Chaves

Universidad de Costa Rica y Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales (CIET), Centro de Investigación en Tecnología de Alimentos. Universidad de Costa Rica. San Pedro, San José, Costa Rica

RESUMEN. Costa Rica no es la excepción en cuanto a la prevalencia de ocratoxina A en plasma, ya que en este estudio se obtuvo la presencia de la micotoxina en el 95% de las 149 muestras estudiadas. También se estudió la presencia de la ocratoxina A en 110 muestras de diferentes marcas de café tostado y molido de las 12 torrefactoras más importantes del país y de 7 supermercados. A excepción de una muestra de café que dio resultados negativos, el resto de muestras analizadas presentaron la micotoxina en cantidades menores a 4000 ng/L o kg. Se trató de encontrar una asociación entre el consumo de café y la presencia de la ocratoxina A en el plasma así como del consumo de cerveza, sin embargo no hubo diferencia estadísticamente significativa en el valor promedio de la micotoxina entre los tomadores y no tomadores de café y tampoco entre los bebedores y no bebedores de cerveza.

Palabras clave: Ocratoxina A, ELISA, micotoxina, plasma, café molido y tostado.

SUMMARY. Ochratoxin A in human plasma and coffee from Costa Rica by ELISA. Costa Rica is not an exception in the prevalence of ochratoxin A in human plasma, in this research the presence of the micotoxin was found in 95% of the 149 samples studied. The presence of ochratoxina A also was studied in 110 samples of toasted and grounded coffee from the most important 12 coffee factories of the country and from 7 supermarkets. With the exception of one negative sample the rest of them have concentrations of micotoxin below 4000 ng/kg. An association between the coffee consumption and the presence of ochratoxin A in plasma was attempted to be found as well as in the consumption of beer, but there were any statistically significant difference in the average level of mycotoxin between the coffee consumers and non coffee consumers neither between beer consumers and no beer consumers. **Key words:** Ochratoxina A, ELISA, micotoxin, plasma, toasted and grounded coffee.

INTRODUCCION

Las micotoxinas son compuestos químicos de bajo peso molecular, producidos por mohos, que tienen efectos patológicos tanto en humanos como en animales. Entre las micotoxinas de mayor impacto en Salud Pública se puede mencionar ocratoxina A (OTA)(1) la cual no pierde su toxicidad por tratamiento térmico ni por acción de las enzimas del tracto digestivo por lo que es una seria amenaza para la salud (2, 3).

Los hongos productores de micotoxinas por lo general pertenecen a los géneros *Fusarium*, *Aspergillus* y *Penicillium*. La OTA es una micotoxina que es producida por varias especies de *Aspergillus* y por *Penicillium verrucosum* (4), sin embargo fue aislada por primera vez en 1965 de un cultivo de *Aspergillus ochraceus* de donde deriva su nombre (5). La OTA puede encontrarse como contaminante natural en los cereales, especialmente en la cebada y arroz, subproductos de cereales, harinas y turto de maní y en una serie de alimentos como granos de café, legumbres, frutas, quesos, carnes ahumadas como jamón, tocino y embutidos, cerveza, especias, vino y frutos de la vid (6,7).

La OTA tiene una potente actividad inmunosupresora, nefrotóxica, carcinogénica, teratogénica, inmunotóxica y genotóxica (5,8, 9). En Escandinavia y Dinamarca se da la

nefropatía porcina micotóxica como enfermedad endémica, cuyo causante es la ocratoxina A (3). En Alemania se ha detectado OTA en un elevado porcentaje de muestras de sangre y riñón de cerdo y en menor proporción en cereales y leche materna. En humanos parece ser que la OTA puede ser responsable de ciertos síndromes renales, como la nefropatía endémica balcánica que se da en la población rural de Bulgaria, Rumanía y Repúblicas ex Yugoslavas (7) y la alta incidencia de tumores del sistema urinario en esta población. La OTA ha sido detectada en sangre del 6 al 18% de la población de los Balcanes habiéndose encontrado concentraciones de hasta 35 ng/kg (4) y en algunos estudios realizados fuera de la Península Balcánica se ha encontrado más del 50% de muestras positivas en sangre (10).

La OTA se encuentra en la sangre unida a la albúmina sérica (11) y en estado libre. En un estudio realizado en Yugoslavia, donde la nefropatía endémica es prevalente, se tamizaron 639 muestras de suero, encontrándose que el 6,6% de la población estudiada tenía la toxina (12). En Polonia el 7,2% de las 1065 muestras estudiadas contenían ocratoxina A (10). En Alemania el 56,6% de las muestras estudiadas resultaron positivas (13) y en Dinamarca el 47,9% también dieron positivo por esta toxina (10) al igual que en Bulgaria con un 14,4% (1).

Los datos sobre la sangre humana, cuando están debidamente validados, proporcionan la prueba definitiva de que ha habido exposición al contaminante y permiten cuantificar la exposición a nivel individual (14). Por lo tanto, con este estudio se propuso determinar la presencia de esta micotoxina en sangre humana y en café molido y tostado por un método de ELISA. A su vez se propuso conocer si había relación de la presencia de la ocratoxina A en sangre con la ingesta de la misma presente en el café, ya que el costarricense como buen productor de este grano también es un gran consumidor del mismo. Además, considerando que la cebada puede ser una fuente importante de contaminación con OTA y que en Costa Rica también se consumen grandes cantidades de cerveza, indirectamente se trató de relacionar su consumo con la presencia de la micotoxina en plasma.

METODOS

Muestra

Se obtuvo sangre total anticoagulada con EDTA con material nuevo estéril descartable de 94 adultos sanos bebedores de café costarricense y 55 adultos sanos no bebedores de café quienes firmaron el consentimiento informado aprobado por el Comité de Ética de la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica. A dichas muestras de plasma se les realizó extracción de OTA y posteriormente mediante un método de ELISA se cuantificó la micotoxina en ng/L. Se aplicó el análisis estadístico utilizando la prueba de t de Student. A cada participante en el estudio se le preguntó que si consumía cerveza. Además, se muestrearon de manera aleatoria las diferentes marcas comerciales que se ofrecen en el mercado, se recolectaron tres muestras de café de las 12 torrefactoras más importantes del país y 7 de supermercados, con un total de 110 muestras, a las cuales se les realizó extracción de ocratoxina A y posteriormente mediante un método de ELISA se cuantificó la micotoxina en ng/kg.

Extracción plasmática

Se realizó la extracción de la OTA siguiendo la metodología para suero porcino descrita por Ridascreen® de la casa comercial R-Biopharm GmbH (15) adaptada a plasma humano. A 2 ml de plasma se le agregó 2,5 ml de HCl 1 N y 4 ml de diclorometano. Se agitó por 5 minutos y luego se centrifugó a 3500 g por 15 minutos. Se eliminó la capa superior y se filtró, se tomó 3,0 ml y se le agregó 3,0 ml de NaHCO₃ 0.13 M pH 8.1 y se agitó por 5 minutos. Se centrifugó 5 minutos a 3500 g y se descartó la parte superior del sobrenadante. Se repitió el último paso. Se agregó 1,0 ml de HCl 1 N y 3,0 ml de diclorometano y se agitó por 10 minutos. Se centrifugó 5 minutos a 3500 g y se eliminó la capa superior acuosa. Se evaporó a 50-60 °C y se disolvió el

residuo en 2,0 ml de NaHCO₃ 0.13 M pH 8.1. Se utilizó 50 µl para el ELISA. Las muestras se analizaron por duplicado.

Extracción del café

A 2,0 g de café tostado y molido se le agregó 5,0 ml de HCl 1 N y se agitó por 5 minutos. Se agregó 10 ml de diclorometano y se agitó por 15 minutos y luego se centrifugó a 3500 g por 15 minutos. Se eliminó la capa superior y se filtró, se le agregó 10 ml de NaHCO₃ 0.13 M pH 8.1 y se agitó por 15 minutos. Se centrifugó 5 minutos a 3500 g y se utilizó 50 µl para el ELISA. Las muestras se analizaron por duplicado.

Método de ELISA

Se utilizó el método de RIDASCREEN Ochratoxin A® de R-Biopharm GmbH, Alemania, tal y como lo indica la casa comercial (15). Se colocó en cada pocillo 50 µl de muestra y patrones por duplicado y se agregó 50 µl de conjugado enzimático a cada uno. Se mezcló y se incubó por 2 horas a temperatura ambiente y en oscuridad. Se removió el líquido de los pocillos y se secó con papel absorbente. Se lavó 3 veces con 250 µl de agua destilada. Se agregó 50 µl de cromógeno a cada pocillo, se mezcló y se incubó 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Se agregó 100 µl del reactivo que detiene la reacción, se mezcló y se obtuvo la absorbancia a 450 nm contra blanco de aire.

Este método tiene para suero un porcentaje de recuperación del 73% con un coeficiente de variación promedio del 14% y para cereales y concentrados animales un porcentaje de recuperación del 85%. Su límite de detección en suero es de 25 ng/L y en cereales y concentrados animales es de 625 ng/kg.

RESULTADOS

En la Tabla 1 se encuentran los resultados obtenidos de Ocratoxina A en plasma humano de no bebedores y bebedores de café.

TABLA 1
Resultados obtenidos de Ocratoxina A en plasma humano de no bebedores y bebedores de café

	No bebedores de café	Bebedores de café	Total muestras
Total de muestras	55(37%)	94(63%)	149
Con Ocratoxina A	54(38%)	87(62%)	142(95%)
Sin Ocratoxina A	1(2,5%)	7(8,5%)	8(5%)
Intervalo ng/L	67-1162	10-1906	10-1906
Promedio ng/L	565*	680*	622
Desv. Standard ng/L	275	345	310

* = p > 0.05

En la Tabla 2 están los resultados obtenidos de Ocratoxina A en las muestras de café tostado y molido de torrefactoras y de café tostado y molido de supermercados.

La Tabla 3 contiene los resultados obtenidos de Ocratoxina A en plasma humano de no bebedores y bebedores de cerveza.

TABLA 2
Resultados obtenidos de Ocratoxina en muestras de café tostado y molido de torrefactoras y de café tostado y de supermercados

Tipo de café tostado y molido	Ocratoxina A en ng/kg
Torrefactora A	36
Torrefactora B	497
Torrefactora C	23
Torrefactora D	4
Torrefactora E	136
Torrefactora F	15
Torrefactora G	118
Torrefactora H	22
Torrefactora J	19
Torrefactora K	35
Torrefactora L	24
Torrefactora M	12
Supermercado 1	960
Supermercado 2	890
Supermercado 3	870
Supermercado 4	920
Supermercado 5	0
Supermercado 6	910
Supermercado 7	880

TABLA 3
Resultados obtenidos de Ocratoxina A en plasma humano de no bebedores y bebedores de cerveza

	No bebedores de cerveza	Bebedores de cerveza	Total muestras
Total de muestras	69(49%)	74(51%)	143
Con Ocratoxina A	65(48,5%)	69(51,5%)	134
Sin Ocratoxina A	5(56%)	4(44%)	9
Intervalo ng/L	20-1906	10-1200	10-1906
Promedio ng/L	648*	630*	639
Desv. Standard ng/L	341	321	331

* = $p > 0.05$

DISCUSION

El método de cromatografía de líquidos (HPLC) es un método exacto y preciso que ha sido aceptado como método oficial (AOAC International 994.08) y como método de referencia para algunas micotoxinas, sin embargo requiere de instrumentación de elevado costo y de una alta capacitación del usuario (1). Por lo tanto se han desarrollado métodos

inmunoquímicos comerciales para facilitar estos análisis como los métodos de ELISA, método utilizado en este estudio.

En las muestras analizadas se encontraron niveles de ocratoxina A en plasma en un intervalo que va de los 10 ng/L hasta los 1906 ng/L con un valor promedio de 622 ng/L, concentraciones en su mayoría realmente altas que reflejan una ingesta elevada de la micotoxina. Otros países más desarrollados que el nuestro han utilizado HPLC, es así como en Canadá se ha reportado un rango de concentración que va de 290 a 2370 ng/L, en Suiza al Norte de los Alpes valores tan altos como 2150 ng/L y el más bajo 60 ng/L (16).

Al igual que en muchos otros países, Costa Rica no es la excepción en cuanto a la prevalencia de ocratoxina A en plasma, ya que en este estudio se obtuvo la presencia de la micotoxina en el 95% de las muestras estudiadas. Esta investigación es muy importante para el país ya que es el primer estudio que se realiza de OTA en plasma humano.

Otros investigadores también han publicado la prevalencia de ocratoxina A en plasma humano obtenida por HPLC semejante a las nuestras realizadas por ELISA, así se ha reportado presencia de la micotoxina en Suiza del 100%, Túnez del 82%, Argelia del 86% y Francia del 20% (17) y más recientemente en España (18), Canadá, Croacia e Italia en el 100%, Suecia en el 29% y República Checa en el 98% (16,19). Por lo tanto este hallazgo no es nada nuevo en el mundo y se confirma la presencia de la OTA en sangre humana de la población estudiada en Costa Rica.

Como Costa Rica es un excelente productor y gran consumidor de café se estudió la presencia de la ocratoxina A en este grano tostado y molido. A excepción de una muestra de café que dio resultado negativo, el resto de muestras analizadas presentaron la micotoxina en concentraciones menores al límite máximo permitido de ocratoxina A en Estados Unidos (20) Portugal, España e Italia que es de 4000 ng/L o kg (21). Además cumple con el límite máximo de Alemania que es aún más bajo, 3000 ng/L o kg (21).

La OTA ha sido aislada del café desde hace tiempo en otros países (22-24). En investigaciones realizadas con café de consumo europeo se detectó que la cantidad promedio en 113 muestras analizadas fue de 900 ng/kg. Otros estudios demostraron valores de 800 ng/kg y 600 ng/kg. En un estudio realizado por Studer-Rohr (24) encontró que el 100% de las muestras de extracto de café tostado y molido analizadas por HPLC, contenían ocratoxina en cantidades de 2000 ng/kg. Esta situación se encuentra dentro de lo esperado, pues según Le Bars (23) la ocratoxina es un contaminante natural del producto del beneficiado y torrefacción del café. En el estudio realizado por Le Bars (23) se analizaron muestras de café molido y tostado encontrándose que la ocurrencia natural de la ocratoxina era de 600 a 900 ng/kg.

Según un estudio realizado por comisiones de diferentes países convocadas por la Codex/FAO/OMS en 1998 (24) se

logró determinar que el café representaba el 12% de la ingesta total de OTA en Europa, superado únicamente por los cereales (54%) y el vino (15%). En 2002, la Unión Europea en un estudio del programa SCOOP sobre la evaluación de la ingesta alimentaria de ocratoxina A por la población de Suecia, Noruega y Francia encontró de nuevo que el café hace una aportación menor en la ingesta global de OTA en Europa (21). Los cereales aportan la cantidad mayor (50%), vino (13%), el café (10%), especias (8%), cerveza (5%), cacao (4%) y fruta seca (3%). El jugo de frutas es el que más aporta en la categoría de otros (6%).

Es evidente que el problema de las ocratoxinas adquirió atención debido a la alta ocurrencia de estas toxinas en diferentes productos. Por lo tanto, según los resultados obtenidos en el presente trabajo se comprueba que el café de Costa Rica no está exento de esta situación, ya que es un país tropical en que las condiciones de humedad y temperatura favorecen el desarrollo de hongos. Lo importante de los resultados obtenidos en este estudio es que aunque la ocratoxina se encontró, los valores son bajos, lo que garantiza la calidad del café de Costa Rica y la aplicación de las buenas prácticas agrícolas que evitan el crecimiento de los mohos que producen la micotoxina.

Se trató de encontrar una asociación entre el consumo de café y la presencia de la ocratoxina A en el plasma, sin embargo no hubo diferencia estadísticamente significativa en el valor promedio de la micotoxina entre los tomadores y no tomadores de café, ya que el porcentaje de muestras positivas fue muy alto independientemente del consumo o no de café.

A pesar de que Costa Rica es también productor y alto consumidor de cerveza, tampoco se encontró relación estadísticamente significativa entre los consumidores de cerveza y la presencia de la ocratoxina A en plasma.

El origen de la presencia en plasma de la micotoxina en un porcentaje tan elevado se debe, probablemente, a la presencia de la ocratoxina A en una gran variedad de granos y cereales de consumo diario tales como arroz, cebada, avena, maní, maíz, sorgo, almendra, frijoles, semillas oleogénicas de algodón, girasol y soya (2,4) y subproductos como harinas, además de frutos secos, frutas deshidratadas, leche y productos lácteos, hierbas, especias, café, cacao, piensos, aceites vegetales, cerveza y legumbres entre otros (2,6,7). Estos productos se han reportado contaminados con esta micotoxina en otros países y son consumidos con frecuencia por la población, razón por la cual no se puede atribuir únicamente al consumo de café o cerveza la presencia de la OTA en sangre.

Los hallazgos en este estudio justifican la investigación de la presencia de las ocratoxinas A en estos otros alimentos por el método oficial como el HPLC, para evaluar el riesgo de consumir esta toxina a través de estos productos y tomar las acciones correctivas para eliminar o disminuir este peligro químico y evitar posibles patologías renales por esta causa.

REFERENCIAS

- Lara J. Métodos de determinación, identificación y control de micotoxinas en ingredientes para la nutrición animal. Area de micotoxinas, Foro de micotoxinas. 2006. Se consigue en URL: <http://www.Engormix.com>
- Bolet M, Socarrás M. Micotoxinas y cáncer. *Rev Cubana Invest Biomed* 2005; 24(1): 54-59.
- Gimeno A. Residuos de aflatoxinas y ocratoxina A en alimentos de origen animal (leche, huevos y tejidos comestibles). 2007. Se consigue en URL: http://www.Engormix.com/s_articulos_view.asp?art=1582&AREA=MYC
- Doyle M, Beuchat L, Montville T. *Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers*. ASM PRESS; 2001.
- Frazier W, Westhoff D. *Microbiología de los alimentos*. Acribia, Zaragoza; 1993.
- Drusch S, Ragab W. Review Mycotoxins in fruits, fruit juices, and dried fruits. *J Food Prot* 2003; 66(8): 1514-1527.
- Gallego L Ma. Micotoxinas. 2007. Se consigue en URL: <http://www.analizacalidad.com/micotoxinas.htm>
- Chavarrias M. Evaluación y efectos de la ocratoxina A. 2006. Se consigue en URL: <http://www.consumaseguridad.com/web/es/sociedad-y-consumo>
- Petska J, Abouzied M, Sutikno, S. Immunological Assays for Mycotoxins Detection. *Food Technol* 1995; 49(2): 120-128.
- Internacional Program on Chemical Safety (IPCS). *Environmental Health Criteria 105. Selected Mycotoxins: Ochratoxins, Trichothecenes, Ergot*. Geneva: World Health Organization; 1990.
- Chu F.S. Interaction of Ochratoxin A with Bovine Serum Albumin. *Arch Biochem Biophys* 1971; 147: 359-366.
- Hult K, Plestina R, Habazin-Novak V, Radic B, Ceovic S. Ochratoxin A in human blood and Balkan endemic nephropathy. *Arch. Toxicol.* 1982; 51: 313-321.
- Bauer J, Gareis M. Ochratoxin A in the food chain. *J Vet Med B* 1987; 34: 613-627.
- Documento de posición sobre la Ocratoxina A. Tema 14 (a). Comisión del Codex alimentarius. Programa conjunto FAO/OMS sobre normas alimentarias. La Haya, Países Bajos: 31 Reunión Comité del Codex sobre aditivos alimentarios y contaminantes de los alimentos CX/FAC 99/14, noviembre 1998; 22-26 marzo de 1999.
- Enzyme immunoassay for the quantitative analysis of Ochratoxin A. RIDASCREEN Ochratoxin A. R-Biopharm GmbH, Germany.
- Peraica M, Radic B, Lucic A, Paulovic M. Efectos tóxicos de las micotoxinas en el ser humano. *Bulletin of the World Health Organization*, 1999, 77 (9): 754-766.
- Filali A, Betbeder AM, Baudramont I, Benayada A, Soulaymani R, Creppy E. Ochratoxin A in human plasma in Morocco: a preliminary survey. *Hum Exp Tox* 2002; 21:241-245.
- López A. Ocratoxina A: exposición en España y nuevos aspectos sobre toxicidad. *Rev Toxicol* 2003; 20: 72-73.
- Arbilla L, Ezpeleta O, López A. ¿Es la Ocratoxina A una micotoxina mutagénica?. *Rev Toxicol* 2004; 21: 1-10.
- Coffee Science Information Centre Spoilage of coffee by moulds. COSIC, Inglaterra 1996.

21. FAO/ONU para agricultura y alimentación. Reducción de la ocratoxina A en el café. 2007. Se consigue en : URL: <http://www.coffee-ota.org/faq.asp>.
22. Prado R. Ocratoxina A en café brasileiro. Editorial Campinas, Brasil, 1998.
23. Le Bars J. & Le Bars P. Mycotoxigenesis in grain application to mycotoxic prevention in coffee. 1998. Laboratoire de Pharmacologie-Toxicologie Inr.A., Toulouse, Francia.
24. Studer-Rohr; Dietrich D, Schlatter J, Schlatter C. The occurrence of ochratoxin A in coffee. 1995. Food Chemistry Toxic 33 (5): 341-355.
25. CODEX/FAO/OMS. Comisión del Codex sobre aditivos alimentarios y contaminantes de los alimentos: Documento de posición sobre la ocratoxina A: 31 reunión, La Haya, Países Bajos, Roma, noviembre, CX/FAC99/44. 1998. Roma.

Recibido:15-06-2007

Aceptado:24-07-2007