

MICOTOX LTDA



DETERMINACION DE OCRATOXINA A EN CAFE VERDE, TOSTADO Y SOLUBLE POR CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA (TLC)

EXTRACCION

1. Pesar 25 g de muestra molida en un vaso de licuadora de vidrio de 200 mL.
2. Añadir 100 mL del solvente de extracción: metanol + bicarbonato de sodio al 3% (en agua), 50+50, v/v.
3. Homogenizar durante 3 minutos a alta velocidad.
4. Filtrar a través de papel de filtro cuantitativo (Por ej. S&S 589-3) doblado en abanico y colectar cerca de 10 mL del filtrado.
5. Filtrar los 10 mL a través de una membrana de fibra de vidrio y pipetear exactamente 5 mL del filtrado en balón volumétrico o probeta de 100 mL.
6. Llevar a volumen (100 mL) con PBS (solución salina buferada).

LIMPIEZA

7. Pasar los 100 mL a través de una columna de inmovilización para ocratoxina A (Micotox Ltda.) cuidando de no pasar más de 2-3 mL por minuto. NOTA: Colocar la columna en un soporte convencional para

columnas de extracción en fase sólida y empatar en la parte superior una jeringa plástica de 50 mL de capacidad.

8. Una vez hayan pasado los 100 mL del extracto diluido, lavar con 10 mL de agua.
9. Una vez hayan pasado los 10 mL de agua, secar la columna mediante vacío para retirar cualquier residuo de agua.
10. Eluir la ocratoxina A con 4 mL de metanol HPLC en un vial de 5 mL silanizado. NOTA: Permitir que el metanol hidrate completamente el gel durante 2 a 3 minutos antes de eluir la ocratoxina.
11. Evaporar el eluato a sequedad bajo nitrógeno o usando un baño termostático a 60°C y una bomba de vacío.

CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA

- Disolver el residuo seco con 100 µL de tolueno/ácido acético (99+1). Tapar el vial y agitar en vortex durante 30 segundos o ultrasonicar.
- Sembrar 20 µL de cada muestra junto con 5, 10 y 20 µL de estándar de trabajo en una cromatoplaqueta de silicagel 60 de 10 x 10 cm (Merck 1.05553). La solución estándar contiene 1.0 µg/mL de ocratoxina A en tolueno/ácido acético, 99+1 (disponible en Micotox Ltda.).
- Desarrollar la placa con tolueno-acetato de etilo-ácido fórmico (5+4+1) hasta 1 cm del borde superior. Dejar secar al aire.
- Observar la cromatoplaqueta bajo luz ultravioleta de onda larga (365 nm) y

determinar el contenido de ocratoxina A comparando la intensidad de las manchas de las muestras con las de los estándares. La ocratoxina A tiene una fluorescencia azul-verdosa y un Rf aproximado de 0.6.

CALCULOS

Se toman 25 g de muestra y se añaden 100 mL de solvente; del extracto se toman 5 mL para purificación. El eluato seco se redissuelve con 0.1 mL, de los cuales se siembran 20 µL en la cromatoplaqueta.

Equivalente en peso de la muestra sembrada:

$$25 \text{ g} \times 5/100 \text{ mL} \times 0.02/0.1 \text{ mL} = 0.25 \text{ g en placa.}$$

$$\text{ng/g (ppb)} = \frac{\text{ng de toxina inyectados}}{0.25 \text{ g}}$$

Cantidad de estándar de ocratoxina A sembrado en placa (ng):

Vol. (µl)	OCRATOXINA A
5	5 ng
10	10 ng
20	20 ng

Equivalente en ppb del estándar de ocratoxina A sembrado en placa (ng/g):

Vol. (µl)	OCRATOXINA A
5	20 ppb
10	40 ppb
20	80 ppb

Límite de detección: <1 ppb.
Límite de cuantificación: 2 ppb.

OTA CAFÉ VERDE Y SOLUBLE TLC - IAC