.

UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS “DR. IGNACIO CHÁVEZ”

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

TESIS:

Biomonitoreo externo de ocratoxina A en algunos cereales y productos cárnicos de alto consumo del municipio de Hidalgo, Michoacán

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS DE LA SALUD

PRESENTA:

Q. F. B. Miriam Yuritzi Gaspar Ruiz

DIRECTORA DE TESIS:

D. en C. Virginia Angélica Robinson Fuentes

Morelia, Michoacán. Agosto 2023

Dedicatoria

Esta tesis va dedicada con todo mi amor y agradecimiento a mi familia por ser el soporte que me ha sostenido desde que nací y me ha permitido perseguir mis sueños, hasta lograr mis objetivos.

¡Padre, lo cierto es que si tú no hubieras sido mi padre yo no estaría aquí! Compartimos puntos de vista y algunas ambiciones. Tú nunca me limitaste y en lo que has podido siempre me has ayudado, obviamente esto no podría haberlo hecho sin ti.

¡Madre hoy no estás aquí, pero este logro de tu hija también es un logro para ti! Te extraño y a veces me haces más falta de lo que quiero admitir, si es que desde algún lugar puedes verme, esta tesis es para ti.

¡Mis hermanos, aunque estén poco chiflados! Sin ustedes no hubiera tenido la motivación suficiente para superarme, sin los momentos vividos con Liz, sin las bromas y consejos de Omar, sin las locuras de Cinthia, nada de esto sería posible.

Agradecimientos

Las palabras sobran cuando los sentimientos son inmensos, mi gratitud va hacia todos ellos que me vieron crecer y desarrollarme a lo largo de estos dos años, a quienes brindaron su apoyo en momentos difíciles y a quienes me orientaron cuando creí haber perdido el horizonte.

Mi gratitud es especialmente para con Dios y con mi familia, porque sin ninguno de ellos estoy segura no estaría aquí. Después de todo cuando todo se siente perdido y misteriosamente aparece una luz al final del túnel, no encuentro otra explicación más que la divina. De igual forma sin un lugar al cual regresar después de pequeñas derrotas, ¿dónde se supone recuperemos fuerzas para seguir avanzando sino de nuestro hogar?

Agradezco de manera especial a mi directora de tesis, D.C. Virginia Angélica Robinson Fuentes por haberme orientado durante la realización de este trabajo, por su paciencia y dedicación, por su soporte durante cada seminario; así como uno que otro regaño dado siempre con la finalidad de mejorar y corregir el trabajo hecho.

A mi comité tutorial, por la retroalimentación dada en todos los seminarios, que motivó a la autora de esta tesis a mejorar y preparar mejor su trabajo.

A mis compañeras de Laboratorio de Desarrollo Analítico, por todos los momentos compartidos, desde el escuchar mis dudas hasta el darme consejos. Cada una de esas memorias serán atesoradas por mí a través de los años.

A mis compañeros de generación, de manera especial a Paty por haberme escuchado en todos mis momentos de frustración y haberme animado cuando más los necesitaba.

A todos aquellos que formaron parte de mi desarrollo personal fuera del posgrado, incluyendo a mis compañeros de Métodos de Enseñanza del Idioma Inglés.

Q.F.B. Miriam Yuritzi Gaspar Ruiz

Comité tutoral designado por la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez”, de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, para el seguimiento y aprobación de la tesis presentada por:

Química Farmacobióloga
MIRIAM YURITZI GASPAR RUIZ

D. en C. Ma. Soledad Vázquez Garcidueñas
Presidente

D. en C. Virginia A. Robinson Fuentes
Vocal

D. en C. Sergio Gutiérrez Castellanos
Vocal

D. en C. Marcia Yvette Gauthereau Torres
Vocal

D. en C. Graciela Letechipía Vallejo
Vocal

La Maestría en Ciencias de la Salud, de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo se encuentra reconocido como programa consolidado en el Sistema Nacional de Posgrados del CONAHCYT

La autora de esta tesis, estudiante de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas "Dr. Ignacio Chávez", Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, agradece al CONAHCYT la beca con registro número 793189, otorgada para la realización de sus estudios de Posgrado.

Q.F.B. Miriam Yuritzi Gaspar Ruiz

INDICE

Resumen.....I
Abstract.....II
Abreviaturas.....III
Introducción.....1
Marco Teórico.....3
1. Micotoxinas.....3
2. Ocratoxina A (OTA).....4
2.1 Ocratoxina A en los alimentos.....11
3. Métodos de análisis para micotoxinas.....12
3.1 ELISA.....13
3.2 HPTLC.....14
4. Enfermedad renal crónica, causas y prevalencia.....15
Justificación.....19
Hipótesis.....20
Objetivo general.....20
Objetivos específicos.....20
Estrategia experimental.....21
Materiales y Métodos.....22
Muestreo.....22
Extracción de ocratoxina A en diferentes muestras.....23
Análisis estadístico......26
Resultados.....27
Selección de las muestras para análisis de OTA.....27
Concentraciones de OTA medidas por ELISA.....27
Selección fase móvil para TLC.....32
Muestras de maíz y derivados de trigo.....33
Muestras de derivados carne de cerdo.....33
Concentraciones de OTA obtenidas mediante HPTLC.....34
Discusión.....39
Concentraciones de OTA analizadas por ELISA en comparación de las analizadas por HPTLC.....39

Concentraciones de OTA por ELISA 42
Concentraciones de OTA por HPTLC 44
Conclusiones 48
Referencias 49

INDICE DE TABLAS

Núm.	Descripción	Pag.
1	Tabla de concentraciones máximas de contaminantes en productos alimenticios……	12
2	Concentraciones de OTA en muestras de alimentos del municipio de Hidalgo, Michoacán obtenidas mediante ELISA……	28
3	Comparación entre las concentraciones promedio de OTA obtenidas y los niveles máximos de OTA establecidos por la Comisión Europea y el Ministerio de Salud de Italia……..	29
4	Sistema de solventes para fase móvil TLC y extracción de chorizo para OTA……	33
5	Concentraciones de OTA presentes en muestras de alimentos procedentes del municipio de Hidalgo, Michoacán analizadas mediante HPTLC……	35
6	Comparación de las concentraciones de OTA obtenidas mediante HPTLC y los límites máximos establecidos por la normativa……	36
7	Comparación de las concentraciones de OTA empleando ambas técnicas de análisis para micotoxinas. ELISA y HPTLC……	37

INDICE DE FIGURAS

Núm.	Descripción	Pag.
1	Estructura de la ocratoxina A……..	5
2	Vida media de OTA una vez ingerida…….	6
3	Nefrotoxicidad causada por OTA ……..	9
4	Vía metabólica propuesta que ilustra la nefrotoxicidad por OTA……..	10
5	Lugar de procedencia de los pacientes con ERC incluidos en el estudio de Reynoso (2021)……...	17
6	Concentraciones de OTA presentes en suero de pacientes procedentes del Hospital General “Dr. Miguel Silva”……..	17
7	Valores de las concentraciones de OTA en maíz obtenidas por ELISA……..	28
8	Concentraciones de OTA en Bolillo obtenidas por ELISA……	29
9	Valores de OTA encontrados en Chorizo M#1……..	29
10	Valores de OTA encontrados en Chorizo M#2……..	30
11	Selección de la fase móvil……	31
12	Aplicación de extractos de chorizo en placas TLC, utilizando cuatro diferentes métodos de extracción…….	33

Resumen

La ocratoxina A (OTA), es una micotoxina producida principalmente por hongos de los géneros*: Penicillium* y *Aspergillus*. Es una de las micotoxinas más abundantes en la cadena alimentaria, presente en los granos de cereales, frijoles, frutos secos, vino, café, té, entre otros. La OTA no solo es nefrotóxica, es un carcinógeno potencial y una neuro e inmunotoxina. Además, la OTA está asociada con la enfermedad renal crónica de etiología no determinada (ERCEND). Para el análisis de micotoxinas es posible usar la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS) y cromatografía de capa fina (TLC) que acoplada a un densitómetro obtiene mejores límites de detección convirtiéndose en HPTLC. También se pueden usar ensayos inmunoenzimáticos como ELISA. Teniendo como antecedente que en la región estudiada la ERCEND es muy común y que en el laboratorio de desarrollo analítico se estudiaron pacientes con ERC del Hospital General "Dr. Miguel Silva" de Morelia donde se obtuvo como resultado que la procedencia de un número considerable de los pacientes era de Ciudad Hidalgo y que además el 52% de ellos dio positivo en suero a OTA. Se realizó un monitoreo externo con algunos alimentos más consumidos por la población de la región de estudio usando dos técnicas analíticas, de principios diferentes y con sensibilidades diferentes, para asegurar la veracidad de los resultados encontrados. El objetivo de este estudio fue el determinar la contaminación por OTA de alimentos de alto consumo, tales como cereales y sus derivados y algunos productos cárnicos de la región de Cd. Hidalgo, Michoacán. Se tomaron distintas muestras de alimentos procedentes del municipio de Hidalgo, se procedió a la extracción de las muestras para su posterior análisis mediante dos diferentes técnicas analíticas: ELISA y HPTLC. Se obtuvieron un total de 58 muestras y 78 extractos que se analizaron mediante ELISA y HPTLC, teniendo como resultado el 100 % de muestras positivas. Las muestras de maíz y bolillo no rebasaron los límites establecidos por la normativa europea, mientras que las muestras de chorizo estuvieron alrededor de cinco veces por encima de los valores máximos recomendados por el Ministerio de Salud de Italia.

Palabras clave: Ocratoxina A, maíz, bolillo, chorizo, ELISA, HPTLC.

Abstract

Ochratoxin A (OTA) is a mycotoxin produced mainly by fungi of the genera: *Penicillium* and *Aspergillus*. It is one of the most abundant mycotoxins in the food chain, present in cereal grains, beans, nuts, wine, coffee, tea, among others. OTA is not only nephrotoxic; it is a potential carcinogen and a neuro- and immunotoxin. In addition, OTA is associated with chronic kidney disease of unknown etiology (CKDun). For the analysis of mycotoxins, it is possible to use liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC-MS) and thin layer chromatography (TLC) which, coupled with a densitometer, obtains better detection limits becoming HPTLC. Immunoenzymatic assays such as ELISA can also be used. It is well known that CKD is very common in the studied region; in a previous study with CKD patients conducted in Morelia´s General "Dr. Miguel silva" Hospital, a considerable number of patients came from Ciudad Hidalgo, 52% of them also tested positive for OTA in serum. Thus, it was decided to perform an external monitoring with some foods most consumed by the population of the study region using two analytical techniques of different principles and with different sensitivities, to ensure the veracity of the results found. The objective of this study was to determine the OTA contamination of highly consumed foods, such as cereals and their derivatives and some meat products from the region of Cd. Hidalgo, Michoacán. Different food samples from the municipality of Hidalgo were obtained, the samples were extracted for subsequent analysis using two different analytical methods: ELISA and HPTLC. A total of 58 samples and 78 extracts were obtained, which were analyzed by ELISA and HPTLC. 100% of samples were positive to OTA. Corn and bolillo samples did not exceed the limits established by European regulations, while the chorizo samples were about five times higher than the maximum value recommended by the Italian Ministry of Health.

Key words: Ochratoxin A, corn, bolillo, chorizo, ELISA, HPTLC.

Abreviaturas

AF:	Aflatoxinas.
AP:	Fosfatasa alcalina.
BSA:	Albúmina de suero bovino.
DAD:	Matriz de diodos.
DL:	Dosis letal.
ECR:	Enfermedad Crónica Renal.
EFSA:	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria.
ERCT:	Enfermedad renal Crónica terminal.
ERCEND:	Enfermedad Renal Crónica de Etiología no Determinada.
ELISA:	Enzime-Linked InmunoSorbent por su acrónimo en inglés.
FAO:	Organización para la Agricultura y la Alimentación.
FLD:	Detector de fluorescencia.
GST:	Glutatión-S-Transferasa.
GSTP1:	Glutatión-S-Transferasa Pi 1
HPLC/LC:	Cromatografía liquida.
HPTLC:	High-performance thin layer chromatography.
HRP:	Peroxidasa de rábano.
LC-MS:	Cromatografía de líquidos con espectrómetro de masas.
MDA:	Malondialdehido.
MS:	Espectrometría de masas.
NAC:	N-acetil-L-cisteína.
OATP:	Polipéptidos transportadores de aniones orgánicos.
OT:	Transportadores de aniones orgánicos.
OTA:	Ocratoxina A.
OTHQ:	Ocratoxina hidroquinona.
OTQ:	Ocratoxina quinona.
ROS:	Especies reactivas de oxígeno
SPE:	Extracción en fase sólida.
TCL:	Cromatografía de capa fina
UV:	Ultravioleta.
ZEA:	Zearalenona.

Introducción

Las micotoxinas son metabolitos secundarios tóxicos producidos por ciertos hongos filamentosos. Pueden entrar en la cadena alimentaria directamente a partir de alimentos de origen vegetal contaminados con micotoxinas o por contaminación indirecta; es decir, por el crecimiento de hongos toxigénicos en los alimentos para ganado con que se alimenta la población (Alshannaq y Yu, 2017). Se han identificado más de 500 micotoxinas, aunque principalmente seis (aflatoxinas, tricotecenos, zearalenona, fumonisinas, ocratoxinas y patulina) son reguladas y estudiadas en los alimentos, lo que plantea problemas de seguridad alimentaria impredecibles y continuos en todo el mundo (Haque et al., 2020).

La ocratoxina A (OTA) es una micotoxina abundante en los alimentos ya que está presente en granos de cereales, frijoles, frutos secos, vino, café y té, entre otros alimentos. Esta toxina es comúnmente producida por varias especies de *Pennicillum* y *Aspergillus*; además, posee propiedades carcinógenas, nefrotóxicas, teratogénicas e inmunotóxicas. Específicamente, una preocupación importante es la nefrotoxicidad severa, que se caracteriza por la degeneración de las células epiteliales de los túbulos proximales y los intersticiales (Imaoka *et al*., 2020). En los países del mundo occidental, las causas más frecuentes de la nefropatía crónica son la diabetes mellitus y la presión arterial elevada (hipertensión); no obstante, cierto porcentaje de nefropatías no tienen un origen claro. Algunas han sido relacionadas con enfermedades infecciosas recurrentes, exposición a metales pesados tales como plomo, cadmio y arsénico (Chávez-Gómez *et al*., 2016) y micotoxinas (Alshannaq y Yu, 2017).

La enfermedad crónica renal es considerada un problema de salud pública, debido a su incremento en las últimas décadas, así como el de pacientes que evolucionan a enfermedad renal crónica terminal (ERCT). Se estima que el 9% al 13% de la población adulta en todo el mundo ha padecido ERC (British Medical Jornal Best Practice, 2021). Por otro lado, en 2017, se reportó una prevalencia de ERC del 12.2% en México (Instituto Nacional de Salud Pública [INSP], 2020). Además, se estima que en Michoacán el 9 por ciento de la población la padece ERC en alguna de sus cinco etapas (Secretaría de Salud de Michoacán, 2019). A nivel estatal Ciudad Hidalgo representa aproximadamente el 20% en prevalencia de ERC

(Carrillo *et al.,* 2017). En un estudio reciente llevado a cabo en el Hospital General "Dr. Miguel Silva" se determinó la concentración de OTA presente en sangre de pacientes con enfermedad renal crónica, siendo en gran parte procedentes de Cd. Hidalgo, Michoacán. Se observó que pacientes con enfermedad crónica de etiología no determinada (ERCEND) presentaban concentraciones más elevadas de OTA que pacientes con ECR secundaria a diabetes (Reynoso, 2021).

Por todo lo anterior, es de suma importancia establecer si los alimentos, tales como maíz y sus derivados, consumidos por dichos pacientes podría ser la causa de las concentraciones sanguíneas de OTA. Además, será importante asegurarse de la presencia de la contaminación de los alimentos por esta micotoxina y sus concentraciones usando dos técnicas analíticas, aceptadas internacionalmente.

Marco Teórico

1. Micotoxinas

Las micotoxinas son metabolitos secundarios tóxicos producidos por hongos filamentosos pertenecientes al Phylum Ascomycota que al ser ingeridos por vertebrados superiores y otros animales en bajas concentraciones pueden provocar una respuesta tóxica. Algunas micotoxinas pueden tener fitotoxicidad o actividad microbiana; sin embargo, las micotoxinas hacen referencia a sustancias tóxicas producidas por hongos y levaduras (Alshannaq y Yu, 2017). El crecimiento de hongos y la producción de micotoxinas dependen de distintos factores, como la temperatura, la disponibilidad de agua, pH, la luz y naturaleza del sustrato (alimento en cuestión). Estas condiciones varían entre las diferentes especies de hongos e incluso dentro de aislamientos de la misma especie lo que complica el establecer parámetros óptimos para asegurar si determinado hongo producirá o no micotoxinas (Manna y Kim, 2017). Los hongos que suelen contaminar alimentos y producir micotoxinas, son los que pertenecen a los géneros *Aspergillus, Fusarium*, *Penicillum, Claviceps* y *Altenaria* (Haque *et al.,* 2020)*;* siendo los tres primeros los mayormente estudiados, mientras que *Aspergillus* spp y *Penicillum* spp crecen con frecuencia en alimentos y piensos en condiciones de almacenamiento, *Fusarium spp* a menudo infectan cultivos en crecimiento como el trigo, la cebada y el maíz en el campo y se propagan en la planta (Alshannaq y Yu, 2017).

En general, todos los cultivos y cereales que se almacenan incorrectamente bajo un ambiente cálido que provocan humedad durante un tiempo prolongado pueden estar sujetos al crecimiento de hongos y a la contaminación por micotoxinas. Se considera que el maíz es el cultivo más susceptible a la contaminación por micotoxinas, mientras que el arroz lo es menos (Chulze, 2010). Además del consumo de productos agrícolas contaminados el humano puede entrar en contacto de micotoxinas a través del consumo de productos animales, como carne, huevos, leche, resultado de que el animal haya sido alimentado con piensos contaminados (Marín *et al*., 2013; Kaushik, 2015). La mayoría de las micotoxinas son química y térmicamente estables lo que les permite permanecer en su mayoría intactas, sin

sufrir casi o ningún cambio, durante el procesamiento de alimentos; incluyendo la cocción, ebullición, horneado, fritura, tostado y pasteurización (Zhu *et al.,* 2017).

Actualmente, se han identificado alrededor de 500 micotoxinas (Haque *et al.,* 2020); sin embargo, sólo algunas pocas han sido estudiadas como contaminantes en alimentos y en piensos para animales, tomando en cuenta sus posibles efectos nocivos a la salud humana, entre ellas se encuentran las aflatoxinas (AF), ocratoxinas (OT), fumonisinas, patulina, zearalenona (ZEA) y tricotecenos, incluyendo deoxinivalenol (DON) y toxina T-2 (De Boevre *et al*., 2012; Pereira *et al.,* 2014; Haque *et al.,* 2020).

2. Ocratoxina A (OTA)

En 1965 fueron descubiertas las ocratoxinas en Sudáfrica, un grupo de compuestos producidos por *Aspergillus ochraceus, Penicillum verrucosum* y otras especies de *Penicillium*. La familia de las ocratoxinas consta principalmente de tres miembros: ocratoxina A (OTA), ocratoxina B (OTB) y ocratoxina C (OTC). La OTB es una forma no clorada de OTA y OTC es una forma de éster etílico de OTA. Son ácidos orgánicos débiles que consisten en un residuo dihidroisocumarina unida por amida a L-fenilalanina. De las estructuras químicas, las tres micotoxinas se diferencian muy levemente entre sí; sin embargo, estas diferencias tienen efectos marcados sobre sus potenciales tóxicos (Li *et al.,* 2021). La toxina más importante del grupo por ser la más tóxica y la más estudiada es la ocratoxina A. En general, *P. verrucosum* puede producir OTA en condiciones frías-templadas de 4 – 31 °C, mientras que *A. ochraceus* prefiere crecer en regiones tropicales calientes entre 12 – 37 °C aproximadamente (Ravelo et al., 2011; Alshannaq y Yu, 2017).

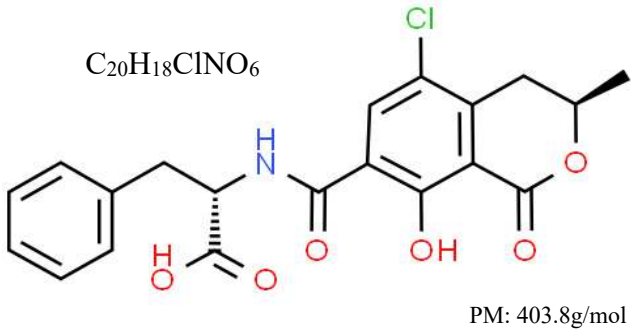


Figura 1. Estructura de la ocratoxina A *(www.chemspider.com)*

La OTA mejor conocida químicamente como (N-[(3R) -(5-cloro-8-hidroxi-3-metil-1-oxo-7-isocromanil) carbonil]-L-fenilalanina) es un ácido orgánico débil que posee una masa molar de 403.8 g/mol (Fig. 1), es un compuesto sólido, blanco, cristalino, con escasa solubilidad en agua. Debido a su estrutura, al poseer un grupo ácido la OTA es soluble en solventes orgánicos polares como cloroformo, metanol, acetronitrilo; además, de disolverse libremente en solución acuosa diluida de bicarbonato de sodico (Khoury y Atoui, 2010; Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, 2015). La molécula de la OTA emite una fluorescencia verde intensa bajo luz ultravioleta en medio ácido y fluorescencia azul en condiciones alcalinas (Li *et al.,* 2021). Es una de las micotoxinas que se encuentra ampliamente como contaminante en la cadena alimenticia; está presente en granos de cereal, frijoles, arroz, frutos secos, vino, café y té (Duarte *et al*., 2010; Pyo *et al.,* 2021). La OTA es conocida por su estabilidad térmica y química, por lo que tiende a persistir durante su almacenamiento y su procesamiento mediante el uso de técnicas de cocción, tostado, ebullición, horneado; ya que, puede soportar temperaturas de hasta 250 °C, temperaturas en las que casi cualquier alimento pierde sus propiedades y no es posible su consumo, y permanecer en su mayoría intacta; es decir, es difícil destruir la estructura de la molécula de OTA cuando se cocina (Zapa´snik *et al.,* 2022). Debido a esta alta estabilidad, una vez contaminados los alimentos, es muy difícil eliminar totalmente esta micotoxina lo que la convierte en un contaminante de importancia en la cadena alimenticia (Li *et al.,* 2021). La OTA es considerada nefrotóxica y está asociada con la enfermedad renal crónica de etiología desconocida, la nefropatía endémica de los Balcanes (BEN), además de ser considerada como un potencial carcinógeno perteneciente al grupo 2B desde 1993 de acuerdo con la

clasificación de la International Agency Research on Cancer (IARC, 2018) y tiene efectos neurotóxicos e inmunotóxicos; no obstante, aún no está del todo claro la relación dosis respuesta de la nefrotoxicidad asociada a la OTA (Imaoka *et al*., 2020).

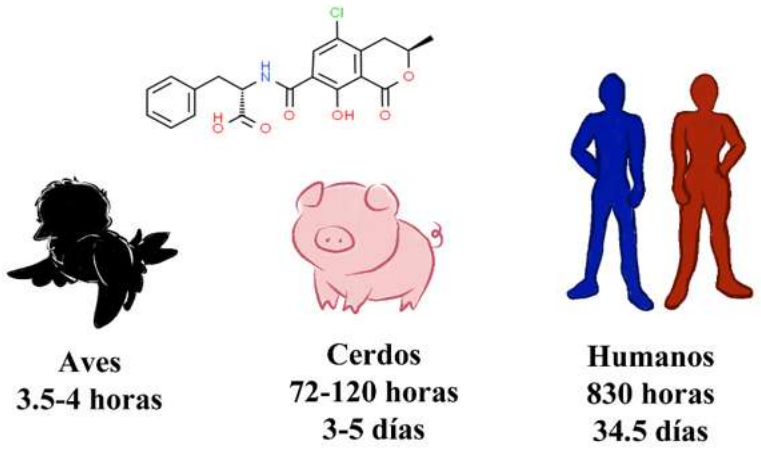


Figura 2. Vida media de OTA una vez ingerida. El tiempo que permanece intacta la OTA una vez ingerida puede variar entre especies, mientras que para aves se ha observado una vida media de alrededor de 3.5-4 horas, en cerdos 3-4 días y en humanos de aproximadamente 34.5 días, en un único experimento llevado a cabo (Martínez y Torres, 2019; EFSA Journal, 2020; Pyo *et al*., 2021).

La OTA ingerida se absorbe rápidamente a través del yeyuno con una biodisponibilidad del 97% además de unirse fuertemente a la albúmina en el suero, el 99.8% de la OTA está en forma de albúmina en el sistema circulatorio humano (Pyo *et al*., 2021). Se han encontrado en bajas concentraciones algunas otras proteínas de masa molecular aproximada a 20 kDa que ejercen una afinidad a OTA aún mayor que la albúmina y que a su vez podrían tener un papel potencial en la patogénesis de BEN debido a su filtración libre a través de los glomérulos. La distribución tisular de la OTA tiende a variar entre diferentes especies y se ve influenciada por distintos factores; tales como, la cantidad de toxina, la forma de ingestión, la composición de la dieta y el estado de salud general del individuo. La OTA tiene una vida media muy larga en humanos, de aproximadamente 35.6 días (Fig. 2). Sus principales órganos diana son los riñones y el hígado, en menor medida el músculo esquelético, el tejido graso y el cerebro (Martínez y Torres, 2019; EFSA Journal, 2020). La vulnerabilidad de los riñones y el hígado podría explicarse por los transportadores de aniones orgánicos (OT) y los polipéptidos transportadores de aniones orgánicos (OATP) respectivamente. Varios estudios

sugieren que la mayor parte de la OTA permanece sin cambios, y que el hígado no es el único órgano que metaboliza la OTA. Sin embargo, la OTA puede ser biotransformada por enzimas de fase I y fase II. En el intestino, parte de la OTA puede ser hidrolizada a Ocratoxina α (OTα) por la acción de enzimas proteolíticas y por enzimas de la microflora bacteriana (Kőszegi y Poór, 2016). Además, es una sustancia liposoluble; por tanto, tiende a acumularse en el tejido de los animales, en especial en cerdos cuyo depósito tisular se produce de la siguiente manera: riñón > hígado > músculo > grasa (Kępińska-Pacelik y Biel, 2021). La acumulación de OTA en los tejidos renales es especialmente a través de la reabsorción. Debido a la fuerte unión a la albúmina de OTA, su eliminación por filtración glomerular es insignificante. La excreción de OTA se realiza principalmente a través de la secreción tubular. Los estudios *in vivo* verifican que la toxina puede ser reabsorbida de prácticamente cualquier parte de la nefrona tanto por transporte activo como por difusión pasiva de manera dependiente del pH. En animales, especialmente en roedores, se ha demostrado el papel de la circulación enterohepática de la OTA que junto a su fuerte unión a la albúmina podría mejorar la eliminación lenta de OTA del cuerpo (Kőszegi y Poór, 2016; Pyo *et al.,* 2021). La dosis letal media (DL50) oral de OTA oscila entre 3 y 20 mg/kg en diferentes animales (Alshannaq y Yu, 2017).

Existen una gran variedad de estudios en distintos animales donde se ha observado la toxicidad que presenta OTA. Debido a su similitud estructural con la fenilalanina, un aminoácido esencial, la OTA interfiere con la actividad de la fenilalanina-ARNt sintasa y la fenilalanina hidroxilasa. Inhibiendo de esta forma la síntesis adecuada de proteínas en varios órganos, incluidos el bazo, el hígado y el riñón (Alshannaq y Yu, 2017; Tao *et al.,* 2018; Khoi *et al.,* 2021).

La OTA induce estrés oxidativo en los riñones y el hígado de las ratas al aumentar la malondialdehído (MDA), la peroxidación lipídica y suprimir la glutatión peroxidasa (GSH-Px), la catalasa (CAT) y la superóxido dismutasa (SOD) (Khoj *et al.*, 2021). Se observó que la OTA puede suprimir los complejos I y II de la cadena respiratoria mitocondrial, causando una inhibición en el consumo de oxígeno. A su vez la OTA también ocasionó variabilidad en el potencial de membrana mitocondrial (Δψm) (Agarwal *et al.,* 2020) conduciendo a la activación de la vía intrínseca de la apoptosis mediante la caspasa 3. La OTA provoca

aumento y disminución del ATP intracelular dependiente de su concentración (Li *et al.,* 2019; Wang *et al,* 2020). Causa glucosuria transitoria al afectar la expresión de los transportadores de glucosa y la estructura de los túbulos proximales (PT). Ha sido demostrado que OTA produce peroxidación de lípidos tanto dependiente de NADPH como dependiente de ascorbato en microsomas, hierro (Fe^{+3}) siendo el cofactor. Una OTA - Fe^{+3} formaría un complejo que facilitaría la reducción de hierro en presencia del sistema NADPH-citocromo P450 reductasa. El complejo resultante OTA - Fe^{+2} entonces generaría OH•, conduciendo a su vez a la peroxidación lipídica de las membranas provocada por la aparición de radicales libres y que además afecta la permeabilidad de la membrana plasmática al Ca^{+2} y por lo tanto deteriora la homeostasis del calcio, liberándolo de las reservas intracelulares, influyendo en los canales sensibles al calcio y desencadenando apoptosis vía retículo endoplasmático. La deshalogenación de OTA podría formar aductos de ADN (Tao *et al.,* 2018). La OTA indujo la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en las células tubulares proximales renales mejorando la expresión de quinasa 1 regulada por la señal de apoptosis (ASK-1) que regula la producción de ROS, disminuye el potencial de la membrana mitocondrial; participa en la inhibición del empalme del ARNm, el metabolismo de los nucleótidos, el ciclo celular, la reparación del ADN y la activación del metabolismo de los lípidos y aumenta la formación de daño en el ADN relacionado con la 8-oxoguanina, lo que promueve la nefrotoxicidad. La OTA activa las vías de señalización del receptor de hidrocarburo de arilo (AhR) y del receptor de pregnano X (PXR) para inducir el citocromo P450 (CYP1A1, CYP1A2 y CYP3A4), lo que lleva a una mayor producción de ROS. ROS mejoró Nrf2 translocado al núcleo para aumentar la expresión de hemo oxigenasa-1 (HO-1), subunidad catalítica glutamato-cisteína ligasa (GCLC) y NADPH quinona oxidorreductasa 1 (NQO1) para mejorar el daño celular. La OTA activó la vía de señalización JAK2/STAT3 dependiente de la ADN metiltransferasa 1 (DNMT1) para inducir apoptosis y daño al ADN en células PK15 y macrófagos alveolares porcinos (PAM) (Tao *et al.,* 2018; Khoj *et al.,* 2021). En la figura 3 se muestra de manera esquemática la nefrotoxicidad de OTA.

Aunque, la evidencia relacionada a que si la OTA y/o sus metabolitos son responsables de nefrotoxicidad ha sido controvertida, los estudios realizados por Imaoka y colaboradores (2020), demuestran en parte que los metabolitos OTQ/OTHQ están fuertemente implicados

en la toxicidad de la OTA. Posiblemente las enzimas glutatión S-transferasas (GST) y el citocromo P450 desempeñan un papel importante en la desintoxicación y bioactivación de la OTA, respectivamente. La OTA es metabolizada y bioactivada por el citocromo P450 para formar OTHQ/OTQ, que son desintoxicados por GST en conjugados de glutatión reducido (GSH) no tóxicos. Se ha observado una asociación de polimorfismos genéticos de GSTP1 en células uroteliales y susceptibilidad a la OTA. Además, la formación de conjugados de GSH en los seres humanos se ha visto implicada por la observación de conjugados de N-acetil-L-cisteína (NAC) en muestras de orina humana. Estos metabolitos son el resultado de la escisión enzimática de un conjugado de GSH por γ-glutamiltransferasa y dipeptidasa, lo que genera el correspondiente conjugado de cisteína que luego es N-acetilado por la N-acetiltransferasa para producir conjugados de NAC (Sueck *et al*., 2020).

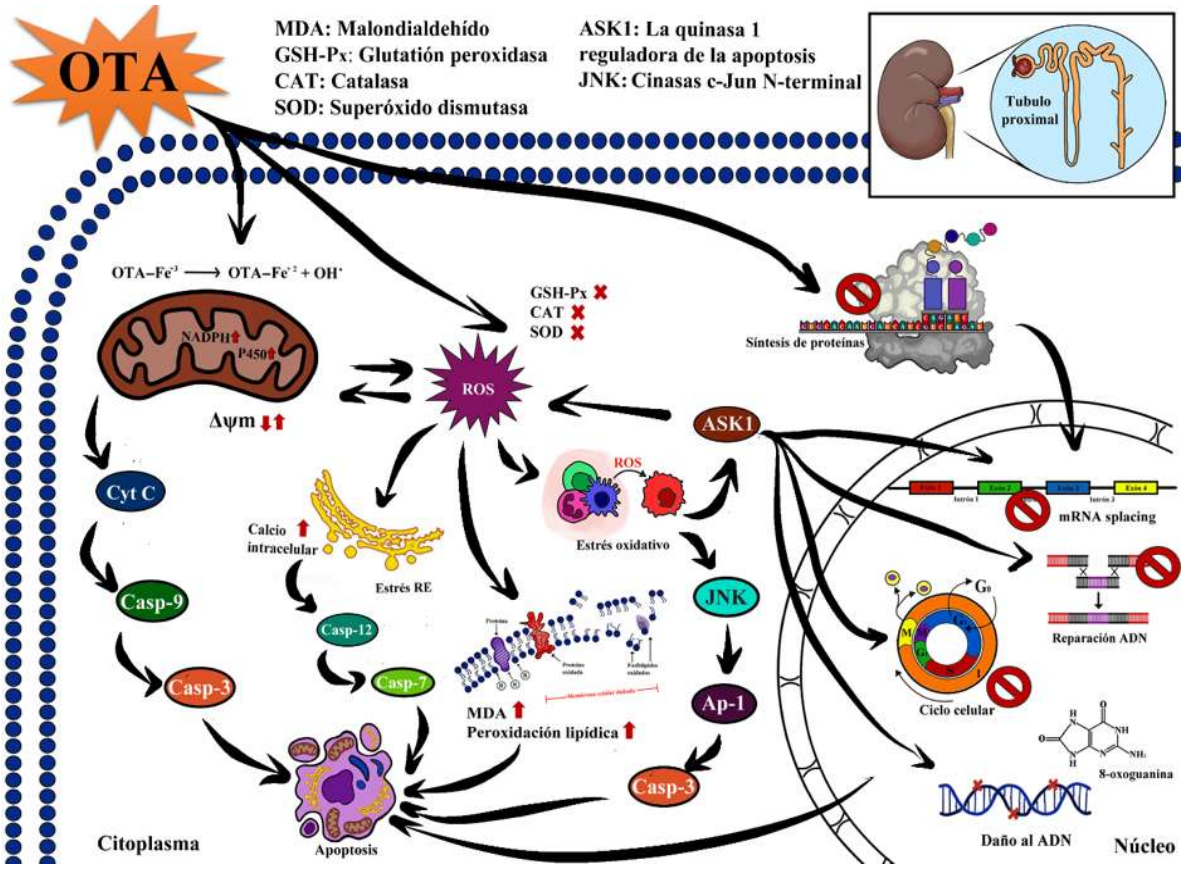


Figura 3. Nefrotoxicidad causada por OTA. La OTA produce especies reactivas de oxígeno (ROS), disminución de las enzimas antioxidantes, CAT, SOD y GSH-Px. Provocando peroxidación lipídica, estrés del retículo plasmático, inhibición de la generación de ATP; Inhibe la síntesis de proteínas, así como, la activación

de ASK1 causando inhibición del procesamiento del ARNm, detención del ciclo celular y la replicación del ADN; daño al ADN conduciendo a la apoptosis y con ello a la nefrotoxicidad. (Imagen elaborada en base a Tao et al., 2018; Khoi et al., 2021).

La biotransformación de OTA es compleja (Fig. 4), es convertida por enzimas de fase I y fase II a varios metabolitos que incluyen hidroxi ocratoxina A, ocratoxina B, ocratoxina hidroquinona (OTHQ), ocratoxina quinona (OTQ) y sus conjugados de glutatión (Heussner y Bingle, 2015). La concentración de OTA y sus metabolitos pueden causar daño renal ya que, su principal vía de excreción es a través del aclaramiento renal, los transportadores de la membrana renal son probablemente críticos para la excreción de OTA y pueden contribuir al desarrollo de nefrotoxicidad (Imaoka *et al*., 2020).

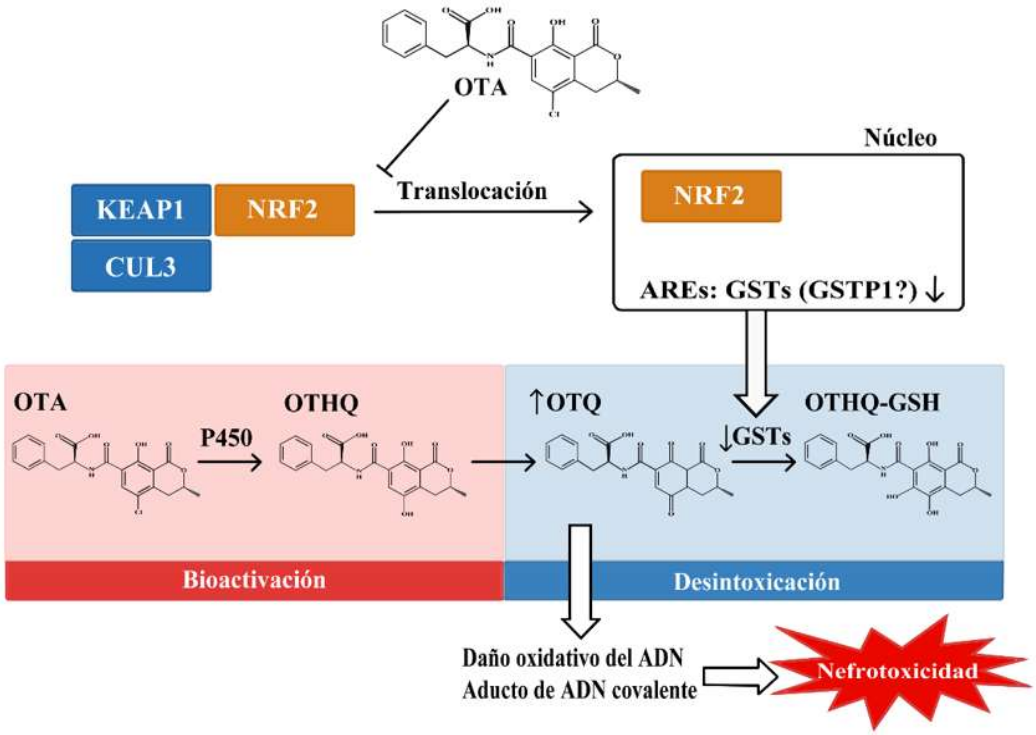


Figura 4. Vía metabólica propuesta que ilustra la nefrotoxicidad por OTA. La OTA es metabolizada por P450 (s) para formar ocratoxina hidroquinona (OTHQ) y ocratoxina quinona (OTQ). OTQ, así como la OTA intacta, son los principales responsables de la nefrotoxicidad. KEAP1: proteína 1 asociada EACH similar a Kelch. CUL3: adaptor para una ligase de ubiquitina basada en cullin-3. NRF2: Factor 2 relacionado con NF-E2. AREs: Elementos de Respuesta Antioxidante. GSTs: Glutatión-S-transferasas. GSTP1: Glutatión-S-transferasa Pi 1. GSH: Glutatión reducido (Imaoka et al., 2020).

2.1 Ocratoxina A en los alimentos

Alshannaq y Yu (2017) mencionan que la ocratoxina A se ha encontrado en una amplia variedad de productos agrícolas como el maíz, el trigo, la cebada, el café, el arroz, la avena, el centeno, los frijoles, los guisantes, están notablemente presentes en el vino, el jugo de uva y los frutos secos de la vid. Además, también puede contaminar productos de origen animal, como carne y leche, y puede encontrarse en leche materna. La OTA se puede encontrar en un amplio espectro de materias primas alimentarias, así como productos alimenticios derivados de estos alimentos. Actualmente, las micotoxinas han cobrado interés y han sido ampliamente reguladas por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA), la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Organización para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA). Sin embargo, sólo está ultima establece un apartado específico para ocratoxinas y su regulación.

En la Unión Europea, los cereales y los productos a base de cereales, como la pasta, el pan y la cerveza, son las fuentes de OTA más relevantes debido a las altas tasas de consumo de estos alimentos. En Alemania, por ejemplo, estos productos son responsables alrededor del 67% de ingesta de OTA en adultos. Además, aproximadamente el 12% de exposición total a OTA se produce por consumo de café y otro 6% por el cacao, el 6% por la carne y el 5% por el vino (Sueck *et al*., 2019).

Las concentraciones máximas de micotoxinas permitidas en alimentos en la Unión Europea están reguladas por el Reglamento (EC) n° 1881/2006 de la Comisión de 19 de diciembre de 2006 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en alimentos. En dicho reglamento se establecen los niveles de OTA permitidos que se encuentran en la tabla de niveles máximos de determinados contaminantes en productos alimenticios, sección: 2 Micotoxinas (Tabla1).

Cabe destacar que en dicho reglamento no aparece las concentraciones máximas permitidas para alimentos de origen animal, carne de cerdo y derivados; por tanto, no hay una regulación como tal para la contaminación indirecta por OTA. No obstante, algunos países han implementado límites máximos permitidos para OTA, como Dinamarca con 10 μg/kg en riñón de cerdo, Estonia con 10 μg/kg en hígado de cerdo, Rumanía con 5 μg/kg en riñón, hígado y carne de cerdo, Eslovaquia con 5 μg/kg en carne de cerdo (Tolosa, *et al*., 2021); así

como Italia que desde 1999 estableció un límite para carne de cerdo y derivados de 1 µg/kg (Italian Ministry of Health, 1999).

Tabla 1. Tabla de concentraciones máximas de contaminantes en productos alimenticios. Sección: 2. Micotoxinas. Niveles máximos permitidos de OTA µg/kg en alimentos.

	Producto	Niveles máximos de OTA (µg/kg)
2.2.1	Cereales sin procesar	5.0
2.2.2	Todos los productos derivados de cereales sin procesar, incluidos los productos procesados a base de cereales y los cereales destinados al consumo humano, con excepción de los productos alimenticios de los puntos 2.2.9 y 2.2.10.	3.0
2.2.3	Frutos secos de la vid (grosellas, pasas y sultanas).	10.0
2.2.4	Café tostado en grano y café tostado molido, excluyendo café soluble.	5.0
2.2.5	Café soluble (café instantáneo)	10.0
2.2.6	Vino (incluido el vino espumoso, excluido el vino de licor y vino con un grado alcohólico no inferior al 15% vol.) y vino de frutas.	2.0
2.2.7	Vino aromatizado, bebidas aromatizadas a base de vino y cócteles vinícolas.	2.0
2.2.8	Zumo de uva, zumo de uva concentrado reconstituido, néctar de uva, mosto de uva y mosto de uva concentrado reconstituido, destinados al consumo humano directo.	2.0
2.2.9	Alimentos elaborados a base de cereales y alimentos infantiles para lactantes y niños pequeños.	0.5
2.2.10	Alimentos dietéticos para usos médicos especiales destinados específicamente a los lactantes.	0.5

(Official Journal of the European Union, 2006).

3. Métodos de análisis para micotoxinas

En general, la detección de micotoxinas se puede llevar a cabo mediante métodos rápidos, métodos cromatográficos y métodos de medición indirecta. Desde finales de la década de 1970, se han desarrollado muchos anticuerpos específicos de micotoxinas. Los anticuerpos son la columna vertebral de los métodos rápidos más utilizados siendo uno de ellos, el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA); otros inmunoensayos están basados en biochip, columnas de inmunoafinidad, pruebas de flujo lateral y más recientemente, biosensores. El ELISA se utiliza comúnmente para la detección y medidas semicuantitativas. Los métodos cromatográficos para micotoxinas a menudo consisten en una extracción a base

de solvente, partición líquido-líquido, o extracción de fase sólida (SPE), seguido de separación y determinación cromatográficas. La cromatografía de capa fina (TLC) es una técnica simple y económica utilizada para fines de detección y para análisis de multimicotoxinas en algunos países en desarrollo. Con los avances en instrumentación, los métodos cromatográficos para micotoxinas han sido expandidos a partir de TLC a HPLC con detección de fluorescencia, DAD o UV. Este último es el más sensible y confiable, en particular cuando se acopla con FLD (Nolan *et al*., 2019). Los métodos HPLC-FLD han sido adoptados por la Asociación Oficial de Químicos Analíticos (AOAC) y por el Comité Europeo de Normalización (CEN) para la cuantificación de micotoxinas en cereales (Alshannaq y Yu, 2017). Sin embargo, se limitan a grandes empresas comerciales, laboratorios de referencia y académicos con técnicos expertos y costosos equipos de laboratorio. Además, generalmente requieren mucho tiempo y mano de obra intensiva. En años recientes, tecnologías basadas en cromatografía de líquidos con espectrómetro de masas (LC-MS), especialmente LC-tándem MS (LC-MS / MS) y MS de alta resolución, se han utilizado cada vez más para la cuantificación de micotoxinas (Trucksess y Zhang, 2016). La LC-MS permite la determinación simultánea de hasta 19 micotoxinas y sus metabolitos (Arroyo-Manzanares, 2019). La técnica HPTLC es una forma automatizada y sofisticada de cromatografía de capa delgada con eficiencia de separación superior y avanzada y límites de detección y a menudo es una alternativa excepcional a HPLC (Trucksess y Zhang, 2016).

La determinación de OTA en alimentos puede llevarse a cabo por los métodos anteriormente descritos, pero el procedimiento a seguir estará relacionado con el objetivo del análisis, el número de micotoxinas que se determinará de forma simultánea, así como el presupuesto del estudio en cuestión. Hay una gran variedad de estudios en los que destacan el análisis de maíz y café tostado empleando ELISA (Castillo, 2015; Oplatowska-Stachowiak *et al.,* 2017.), vino y derivados de trigo mediante LC-FLD (Silva *et al.,* 2019; Tabarani *et al.,* 2020) y carne de cerdo (De Santis *et al.,* 2020), etc.

3.1 ELISA

Entre todos los métodos inmunológicos publicados, el ELISA es probablemente el más utilizado para la determinación de micotoxinas. ELISA proporciona una detección rápida, con muchos kits disponibles comercialmente para la detección y cuantificación de todas las

micotoxinas principales, incluidas AF, AFM1, OTA, ZEA, DON, fumonisinas y toxina T-2. El principio de ELISA se basa en las interacciones competitivas entre las micotoxinas (que actúan como un antígeno) y los anticuerpos asignados marcados con un conjugado de toxina-enzima para muchos sitios de unión. La cantidad de conjugado toxina-enzima unido al anticuerpo determinará el nivel de desarrollo del color. Esta técnica proporciona un método rápido, específico y relativamente fácil de usar para el análisis de micotoxinas en los alimentos. Sin embargo, ELISA tiene ciertas desventajas, incluida la posible reactividad cruzada y la dependencia de una matriz específica. Además, el kit detecta sólo una micotoxina y está diseñado para un solo uso; por lo tanto, puede ser costoso si es necesario analizar muestras contaminadas con múltiples micotoxinas (Alshannaq y Yu, 2017). Normalmente, se realiza en placas de poliestireno de 96 pocillos recubiertas para unirse a la proteína muy fuertemente. Si bien ELISA se puede realizar de varias maneras, como el ensayo directo, el ensayo directo competitivo y el ensayo indirecto competitivo, el ensayo directo competitivo es el más utilizado (Alhajj y Farhana, 2021; Alshannaq y Yu, 2017). El ELISA, es uno de los métodos más populares para la detección de micotoxinas contaminantes en el monitoreo de seguridad alimentaria, debido a su bajo costo y simple operación (Pei *et al.,* 2018). Sin embargo, dependiendo del tipo de ELISA y de la matriz alimenticia es necesario el uso de técnicas cromatográficas como la TLC para corroborar los resultados obtenidos.

3.2 HPTLC

La TLC es una técnica utilizada para separar componentes no volátiles en una mezcla. Se ha reportado que la TLC puede utilizarse para determinar satisfactoriamente micotoxinas, como las aflatoxinas al aumentar su resolución mediante el uso de placas de alta calidad recubiertas de fase estacionaria con partículas finas y uniformes. Con dispositivos de aplicación de muestras automatizados y densitómetros para análisis cuantitativo, HPTLC proporciona una separación más eficiente y una mejor sensibilidad (Zhang y Banerjee 2020). La HPTLC es una de las técnicas TLC ideales para fines analíticos debido a su mayor precisión, reproducibilidad y capacidad para documentar los resultados, en comparación con la TLC estándar; brinda una mejor resolución de componentes con límites de detección inferiores y cuantifica componentes separados con el uso de una plataforma de programación integrada.

En HPTLC, se pueden separar varias muestras diferentes en la misma placa sin ningún paso de preparación de la muestra. HPTLC puede tratar fácilmente con matrices alimentarias complejas y diversas. Se utiliza para fines de control de calidad, para detectar contaminantes alimentarios y para probar si hay aditivos. (Attimarad, *et al*., 2011). En un estudio realizado por Klingelhofer y Morlock (2019), donde se analizaron 19 muestras de arroz y se determinaron varios componentes, incluidos en ellos la citrinina (una micotoxina) se mostró cómo el método HPTLC, incluida la preparación de muestras, permite un alto rendimiento de muestras ricas en matriz (10 minutos por análisis) y puede llegar a ser muy rentable (costes de funcionamiento de 0.5 euros por análisis).

La OTA es una molécula fluorescente lo que hace posible que para su determinación además de los métodos convencionales basados en HPLC en combinación con distintos detectores (FLD, UV, DAD, MS/MS), sea posible el uso de técnicas menos comunes como la TLC. El análisis químico de la OTA, dependiendo de la matriz, implica procedimientos de limpieza de solventes complejos y que requieren mucho tiempo, como extracción por solvente y extracción en fase sólida o una combinación de ambas. La TLC con cuantificación visual y / o densitométrica o la HPLC con detección de fluorescencia se han empleado como paso de determinación final (Ventura *et al.,* 2005; Zhang y Banerjee, 2020).

4. Enfermedad renal crónica, causas y prevalencia

La ERC, también conocida como insuficiencia renal crónica, se define como una alteración de la estructura o función del riñón, presente durante ≥3 meses, esto significa una tasa de filtración glomerular inferior a 60 mL/min/1.73 m², o la presencia de uno o más de los siguientes marcadores de daño renal: albuminuria/proteinuria, alteraciones del sedimento de la orina (p. ej., hematuria), alteraciones electrolíticas debido a alteraciones tubulares, alteraciones detectadas por histología, anomalías estructurales detectadas mediante estudios por imágenes, o historia de trasplante de riñón (KDIGO 2013).

La ERC normalmente se detecta en etapas avanzadas, se estima que el 9% al 13% de la población adulta en todo el mundo ha padecido ERC. En 2017, la prevalencia mundial estimada de las etapas 1 y 2 de ERC representaba el 5%, la etapa 3 el 3.9%, la etapa 4 el 0.16%, la etapa 5 el 0.07%, la diálisis el 0.041% y el trasplante de riñón el 0.011% (British

Medical Jornal Best Practice, 2021). De igual forma en el mismo año se reportó una prevalencia de ERC del 12.2% y 51.4 muertes por cada 100 mil habitantes en México (Instituto Nacional de Salud Pública [INSP], 2020). Además, la ERC en México está teniendo un gran impacto en las finanzas de las instituciones y en la economía de las familias; en 2014, el gasto en salud anual medio por persona para esta patología se estimó en 8,966 dólares estadounidenses (USD) en la SSA, y de 9,091 USD en el IMSS, ambas instituciones son las que atienden la mayor parte de la población con este padecimiento. Se estima que, en Michoacán, un 9% de la población adulta presenta algún grado de ERC y el 0.1% de este segmento requiere diálisis, tratamiento que deteriora considerablemente la calidad de vida de los pacientes (SSM, 2019). Ciudad Hidalgo perteneciente al Municipio de Hidalgo, Michoacán se caracteriza por tener la mayor prevalencia de ERC en el estado. En esta localidad se han registrado aproximadamente 1000 casos, lo que representa 20% a nivel estatal (Carrillo *et al*., 2017).

A nivel mundial la causa más común de ERC en la población adulta es la diabetes. La hipertensión es la segunda causa más común; a menudo se diagnostica la enfermedad renal hipertensiva, si no se evidencia ninguna otra etiología identificable. Las causas menos frecuentes incluyen trastornos quísticos del riñón (enfermedad renal poliquística), uropatía obstructiva, síndromes nefríticos y nefróticos glomerulares, como glomeruloesclerosis focal y segmentaria, nefropatía membranosa, nefritis lúpica, amiloidosis y glomerulonefritis rápidamente progresiva. Alrededor de un tercio de los adultos con ERC tienen antecedentes familiares positivos de ERC, lo que sugiere una causa genética. La ERC se encuentra presente en diferentes partes del mundo, como nefropatía mesoamericana, nefropatía de Sri Lanka y ERCEND, y pueden estar relacionadas con el clima (Glaser *et al*., 2016). Los mecanismos implicados son la hipertermia, la deshidratación y la concentración de toxinas y metales pesados (plomo, cadmio y arsénico) en el agua potable y el suelo, además de empeorar la pobreza con el cambio climático que lleva a cosechas deficientes (Johnson et al., 2019; Glaser *et al*., 2016).

En un estudio realizado en el Laboratorio de Desarrollo Analítico, Posgrado de Medicina, Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo sobre concentraciones séricas de ocratoxina A en pacientes con ERC, se encontró que, dentro del grupo de pacientes nefrópatas, Ciudad Hidalgo ocupó el primer lugar como el municipio con más pacientes con

ERC (21.9%), ya sea de etiología no determinada o por nefropatía diabética (Fig. 5) (Reynoso, 2021). La determinación de ocratoxina A en suero de la población estudiada mediante ELISA mostró que más de la mitad, el 52% del total de los pacientes, dieron positivo a la presencia de OTA en suero. Como se muestra en la figura 6, el estudio utilizó un grupo control, un grupo con nefropatía secundaria a diabetes mellitus 2 y pacientes con ERCEND. Se observó que el grupo control tenía una mayor concentración de OTA en suero, seguido del grupo de ERCEND.

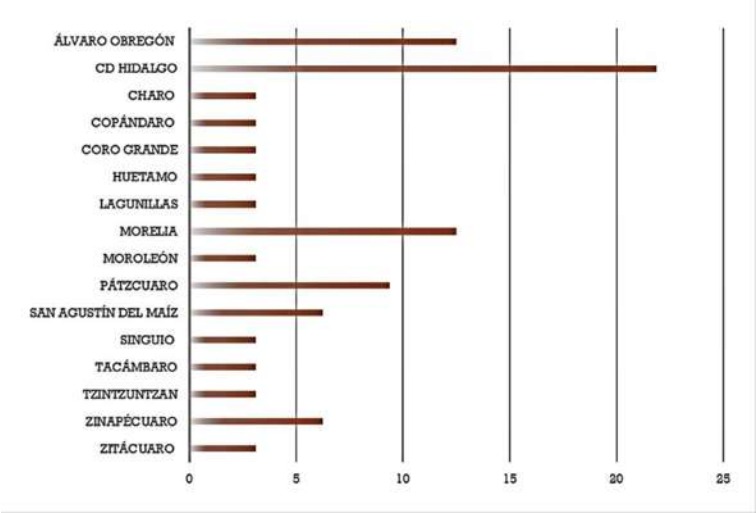


Figura 5. Lugar de procedencia de los pacientes con ERC incluidos en el estudio de Reynoso (2021).

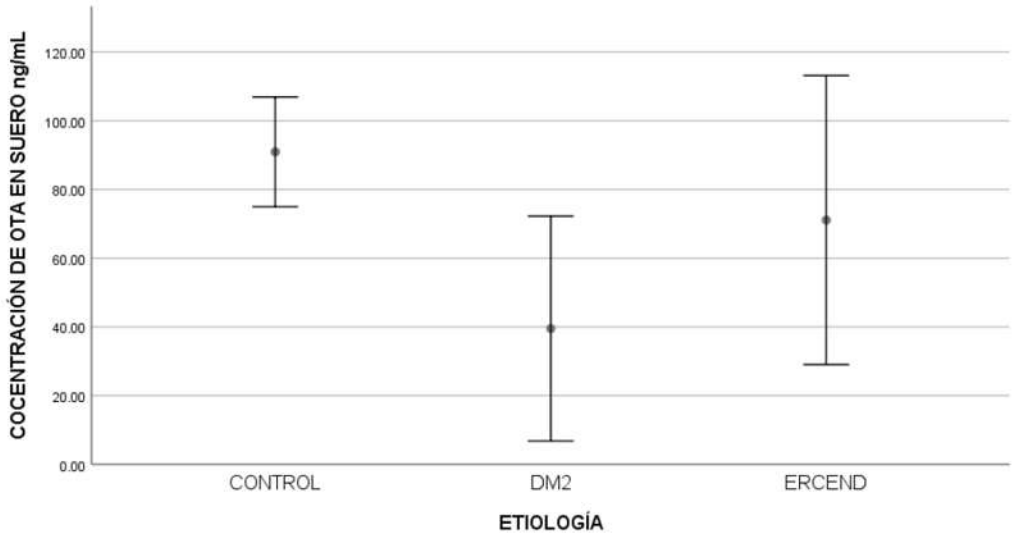


Figura 6. Concentraciones de OTA presentes en suero de pacientes procedentes del Hospital General "Dr. Miguel Silva". En la gráfica se muestra la concentración de OTA en suero de los pacientes por grupo de estudio, mostrando que el grupo control tiene mayores concentraciones de OTA en suero, seguido del grupo ERCEND (Enfermedad Renal Crónica de Etiología No Determinada) y finalmente, el de DM2 (Diabetes Mellitus) (Reynoso, 2021).

Justificación

La OTA es una micotoxina nefrotóxica producida principalmente por hongos del género *Aspergillus* y *Penicillum*, presente en diversos productos agrícolas (como el trigo, maíz, sorgo, café, entre otros) y productos de origen animal de gran consumo por la población en general y que probablemente esté relacionada con ERC de origen no determinado.

Recientemente, se determinó que, en Ciudad Hidalgo, el porcentaje de pacientes con ERCEND presentaba niveles más altos de OTA que pacientes con ERC asociada a diabetes. Entonces, es de vital importancia determinar si las personas que cursan con la enfermedad, así como las personas que conviven con ellas, están ingiriendo OTA como parte de su dieta diaria. Además, recordando que una de las actividades de Cd. Hidalgo es la agricultura, la presencia de la termoeléctrica podría influir en la contaminación de los cultivos y, por tanto, a los alimentos que se consumen diariamente en la región.

Actualmente, la Organización Oficial de Químicos Analíticos (AOAC, por sus siglas en inglés) acepta a la HPLC/MS como la técnica ideal para determinar micotoxinas; sin embargo, no todos los laboratorios cuentan con dicha tecnología. Es por lo que, en este trabajo, y para asegurar la validez de las concentraciones de OTA encontradas en las muestras que resulten positivas, se analizarán con dos técnicas analíticas con principios diferentes: ELISA y HPTLC.

La ERC es un problema de salud pública a nivel mundial y sobre todo local, ya que la incidencia en la región oriente del Estado de Michoacán es de 9 a 1 en comparación con la media nacional (Secretaria de Salud de Michoacán [SSM], 2022). Como se desconocen las causas, en este trabajo se busca determinar si algunos de los alimentos que consumen se encuentran contaminados por OTA y en qué concentración. De esta manera se podría contribuir a conocer las causas de esta enfermedad tan frecuente en el Municipio de Hidalgo, Michoacán.

Hipótesis

Los alimentos consumidos habitualmente por pobladores sanos y con ERCEND del Municipio de Hidalgo, Michoacán están contaminados con concentraciones de OTA que superan lo permisible en las normas europeas.

Objetivo general

Evaluar mediante dos técnicas analíticas la contaminación por OTA de algunos alimentos de alto consumo del municipio de Hidalgo, Michoacán.

Objetivos específicos

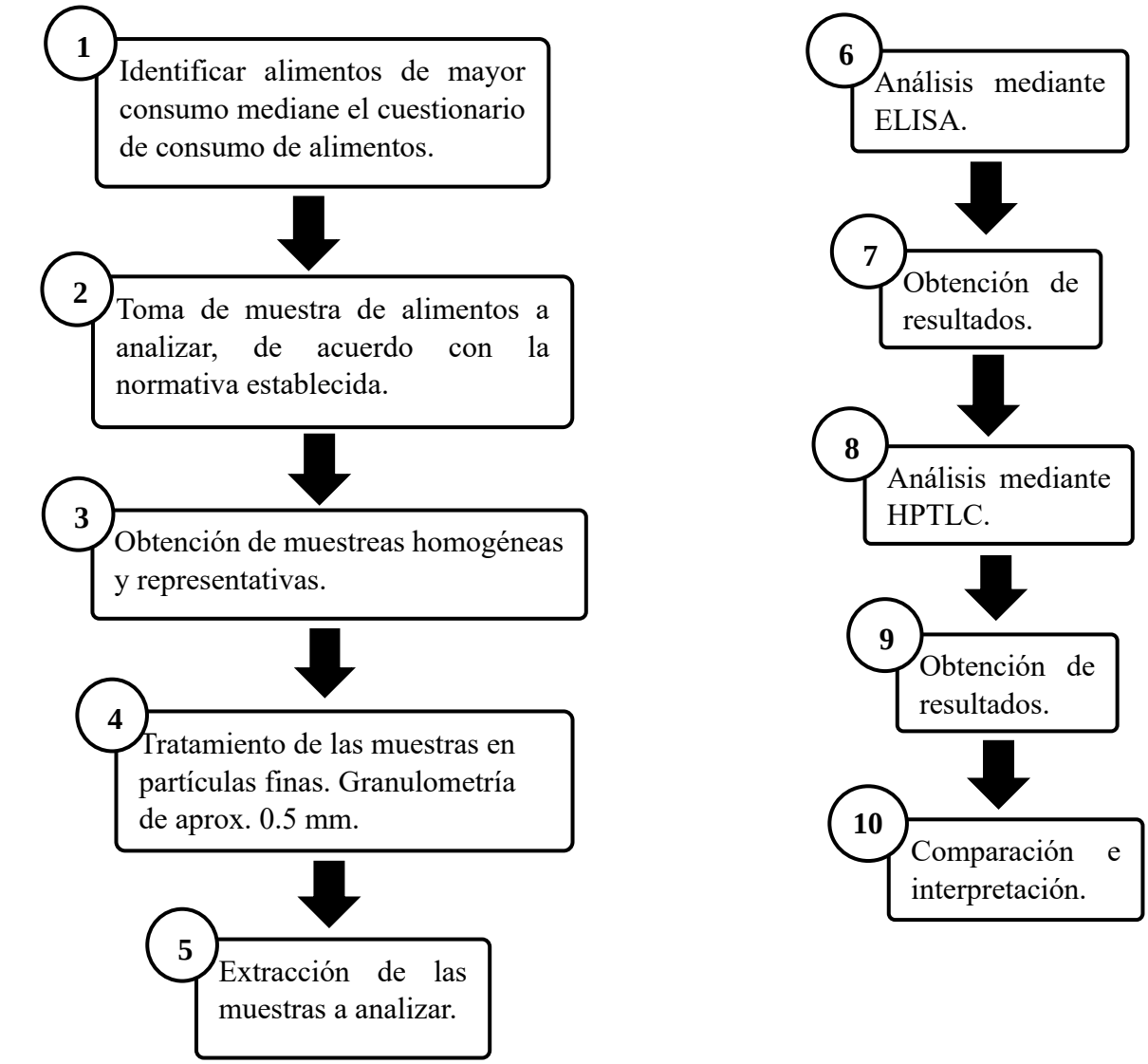
1. Determinar los alimentos de mayor consumo de la población del municipio de Hidalgo, que sean susceptibles a contaminación por OTA.

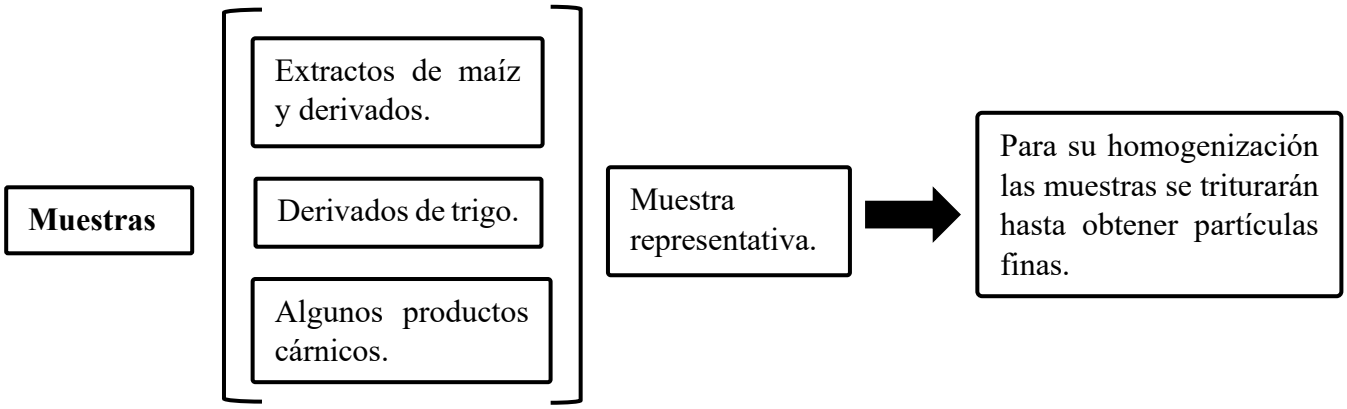
2. Determinar la concentración de OTA en los alimentos habitualmente consumidos por los pobladores de la región por dos técnicas analíticas.

3. Comparar los resultados de concentración de ocratoxina A obtenidos por las dos técnicas analíticas.

4. Contrastar las concentraciones de OTA obtenidas de los alimentos con los niveles máximos establecidos en la normatividad europea.

Estrategia experimental





Materiales y Métodos

Reactivos y estándares

Estándar de OTA ≥98% grado HPLC, Sigma-Aldrich. Reactivos para fase móvil TLC grado ACS, J.T. Baker; tolueno (C_7H_8), acetato de etilo ($C_4H_8O_2$), ácido fórmico (CH_2O_2), cloroformo ($CHCl_3$). Solventes de extracción J.T. Baker; acetonitrilo (MeCN) grado HPLC, metanol (MeOH), ácido acético (MeCOOH) todos ellos grado ACS. Además de bicarbonato de sodio ($NaHCO_3$) también marca J.T. Baker y grado ACS. Agua bidestilada.

Muestreo

La recolección de muestras fue llevada a cabo en el periodo comprendido entre marzo a septiembre del 2022, tomando en cuenta los diversos establecimientos pertenecientes a Ciudad Hidalgo y sus alrededores, tales como mercados, carnicerías, panaderías, cremerías y lugares de cultivo. Los alimentos seleccionados para el análisis de derivados de trigo y productos cárnicos fueron bolillo y chorizo respectivamente. En el caso las muestras de maíz, cuatro de ellas fueron procedentes de las localidades de San Pedro Jácuaro y Alta Huerta. Las demás muestras fueron recolectadas de los mercados localizados en Ciudad Hidalgo, encontrándose entre ellos el mercado Emiliano Zapata, Multiplaza del Comercio Popular; así como, negocios locales y ambulantes. El muestreo se llevó a cabo de acuerdo con el reglamento CE No 401/2006 donde se establecen los métodos de muestreo y de análisis para el control oficial del contenido de micotoxinas en los productos alimenticios. Así como, el reglamento CE No 765/2002 donde se establece el muestreo para carne no congelada. El tamaño de la muestra recolectada de maíz se estableció de acuerdo con su venta a granel o 2-3 mazorcas desgranadas; es decir, entre 500 g – 1,000 g. Para las muestras de derivados de trigo, el bolillo, se compraron de 3-4 piezas por diferente establecimiento. Las muestras fueron molidas y homogenizadas con la finalidad de obtener una muestra representativa para su análisis. Así mismo, para el análisis de OTA en productos cárnicos, el tamaño de la muestra de chorizo fue de entre 150 g – 250 g y fue adquirido en diferentes lugares distribuidos en Cd. Hidalgo y alrededores. Para objetivos de este estudio la muestra representativa seleccionada para la determinación de OTA en el laboratorio fue de 100 g. Las

muestras se recolectaron en bolsas estériles de polipropileno con cierre hermético. Cada muestra se trituro hasta la obtención de partículas finas usando un molino para granos, un mezclador mecánico o licuadora dependiendo del alimento en cuestión y se almacenó a 4 °C, en un lugar fresco y protegidas de la luz, hasta su análisis. Todos los reactivos y las muestras fueron puestos a temperatura ambiente (20 - 25 °C) antes de usarlos.

Extracción de ocratoxina A en diferentes muestras

Se utilizaron métodos de extracción diferentes y variedad de solventes dependiendo del alimento con la finalidad de recuperar la mayor cantidad de OTA en cada uno de ellos.

Muestras de maíz

Para muestras de maíz se tomó una muestra representativa de 20 g previamente triturada y cernida a través de un tamiz de apertura de malla N°20. Se preparó 50 mL de solvente de extracción que consiste en acetonitrilo al 80% en agua destilada y se incorporó la muestra. Se agito en vortex en un contenedor con tapa por 5 min. La muestra se centrifugó (Thermo Fisher Scientific® modelo Sorvall^{TM} ST8) a 1976 G por 5 minutos. Finalmente, con ayuda de un rotavapor se concentró el extracto, obteniendo volúmenes variables de entre 2-2.5 mL que se reservaron en refrigeración hasta su análisis en ELISA y HPTLC.

Muestras de bolillo

La extracción de muestras de bolillo fue llevada a cabo de manera similar a la extracción de maíz; sin embargo, la cantidad de solvente de extracción empleada fue de 100 mL. Los volúmenes finales obtenido también fueron de entre 5-10 mL de extracto.

Muestras de chorizo

Para los productos derivados de carne de cerdo (chorizo) se emplearon dos métodos de extracción, para determinar los solventes adecuados para la extracción de OTA en chorizo se llevó a cabo una serie de pruebas con diferentes solventes de extracción y su respectivo procedimiento. Para llevar a cabo el muestro de chorizo en el municipio de Hidalgo, Michoacán se adquirieron aproximadamente 100 g de chorizo en una carnicería local, el cual

fue molido mediante el uso de un molino de aspas para garantizar la homogenización de la muestra y posteriormente fue reservado a -18 °C hasta la realización de las pruebas.

Para determinar los solventes de extracción adecuados para chorizo se llevó a cabo una serie Método 1: Se tomó una muestra de 5 g triturada y molida en licuadora previamente, se incorporó 20 mL metanol: bicarbonato de sodio 1% (60:40 v/v) se agitó por 10 min y posteriormente se centrifugó a 5, 000 g por 10 min., posteriormente el extracto se concentró con ayuda del rotavapor obtenido un volumen entre 2-2.5 mL.

Método 2: A 5 g de la muestra triturada y homogenizada se adicionó 20 mL de solvente de extracción acetonitilo/agua/ ácido acético (84:16:1 v/v/v), la muestra se agitó en vórtex por 10 min. Se centrifugó a 5000 G por 10 min., el extracto se concentró usando rotavapor, obteniendo un volumen entre 2-2.5 mL de extracto.

Los extractos se mantuvieron en refrigeración a 4°C hasta el día de la prueba de ELISA y posterior análisis cromatográfico mediante HPTLC.

Análisis inmunoenzimático ELISA

Se utilizó el Kit RIDASCREEN®FAST Ochratoxin A. Inmunoensayo enzimático competitivo para el análisis cuantitativo de ocratoxina A en maíz, cebada, avena (granos) y piensos, 48 pocillos. El método utilizado fue el ELISA competitivo, el cual se llevó acabo de acuerdo con las recomendaciones del proveedor. La detección y cuantificación de los valores de OTA en maíz y derivados se logró mediante un lector de la técnica ELISA. Las concentraciones de OTA en µg/kg se obtuvieron mediante una curva de calibración a partir de las concentraciones de soluciones estándar y la interpolación de datos de absorbancia.

Selección de fase móvil para TLC

Existen una gran variedad de fases móviles para cromatografía de capa fina (TLC), pero dependiendo de la muestra objeto de análisis y atendiendo a las características fisicoquímicas de la misma ciertos sistemas de solventes resultaran más adecuados que otros. De esta forma se probaron tres diferentes fases móviles para TLC que cumplieran con los requisitos necesarios para correr las muestras de extractos a analizar, el sistema de solventes para fase móvil seleccionado fue el compuesto por tolueno/ acetato de etilo / ácido fórmico (6:3:1) (tabla 4). Para la prueba de las distintas fases móviles, se utilizaron placas de sílica gel de

aproximadamente 2 cm x 5 cm. A cada placa se aplicó una solución estándar de OTA de concentración conocida (2 µg/kg), así como una muestra de extracto de maíz. Se probaron tres diferentes sistemas de solventes: Tolueno/ acetato de etilo/ ácido fórmico (5:4:1 v/v/v), tolueno/ acetato de etilo/ ácido fórmico (6:3:1) y cloroformo/ agua (98/2 v/v).

Análisis cromatográfico por HPTLC

Para el análisis cromatográfico se emplearon placas TLC silica gel, aluminio 10 cm x 20 cm, con indicador de fluorescencia 254 nm marca SIGMA-ALDRICH. Una cámara de desarrollo cromatográfico para placas 20 x 20 cm; Así como, el detector TLC SANNER 4 CAMAG para la cuantificación de las concentraciones de OTA presente en las muestras obtenidas. Se analizaron parte de los extractos obtenidos previamente y empleados para el análisis de ELISA. Para la muestra estándar, se preparó una solución stock OTA (Sigma Aldrich) metanol de donde se hicieron disoluciones con diferentes concentraciones, OTA 2 µg, OTA 6 µg, OTA 10 µg, OTA 15 µg y OTA 20 µg, con las que se elaboró la respectiva curva de concentración para la determinación de OTA en los extractos analizados. Se utilizaron capilares calibrados de 10 µL para la aplicación de las muestras. Las muestras se aplicaron en bandas de 0.5 cm de ancho todo el volumen, a 1 cm de la línea base sobre las placas de TCL. Se seleccionaron 14 extractos al azar y se distribuyeron a través de la placa de silica gel de acuerdo a las indicaciones previamente mencionadas. Para el desarrollo de las placas se saturo la fase móvil (mezcla tolueno/acetato/88% ácido fórmico, 6:3:1) utilizando papel filtro de celulosa 100% poro grueso (20 µm), dejando saturar la cámara por un tiempo aproximado de 30 – 45 minutos con la finalidad de asegurar la completa saturación de la misma y la placa cromatográfica se dejó correr hasta el 90% de su longitud total, posteriormente se dejó secar al aire bajo de extracción, una vez seca se llevó a cabo el revelado de las bandas haciendo uso de luz UV 440 nm y se cuantificaron las bandas correspondientes a OTA a través de la determinación de la densidad y concentración empleandoTLC SCANNER 4, CAMAG.

Análisis estadístico.

Se aplico el modelo de regresión lineal tomando en cuenta 5 puntos para determinar las concentraciones de OTA presentes en los alimentos. A los datos obtenidos se les aplico estadística descriptiva para conocer la diferencia entre las concentraciones en los alimentos analizados. Para la comparación entre grupos se aplicó la prueba T de student para determinar si había diferencia entre grupos. Los valores se consideraron significativamente diferentes (LSD) si $p \leq 0.05$.

Resultados

Selección de las muestras para análisis de OTA

Se analizaron los alimentos de mayor consumo entre los pobladores del municipio de Hidalgo, Michoacán. Para conocer este dato, se hizo uso de un cuestionario de frecuencia de alimentos, en el cual se determinó que el maíz en forma de tortillas, tamales, etc. era el cereal de mayor consumo, seguido del trigo que se consumía principalmente en forma de bolillo y pan de caja. Así mismo, la carne de mayor consumo resulto ser la carne de cerdo en una gran variedad de derivados, el chorizo fue el alimento de elección tanto por su consumo como por la composición de este (Cabezas Núñez, 2023). De este modo, se seleccionó el maíz y bolillo como muestras interesantes para el análisis de OTA en cereales y derivados, chorizo como el prototipo para determinar las concentraciones de OTA en carne de cerdo.

Concentraciones de OTA medidas por ELISA

Se obtuvieron un total de 58 muestras de alimentos, procedentes del municipio de Hidalgo, Michoacán; recolectadas en el periodo comprendido de marzo a septiembre del 2022, con las cuales se obtuvieron: 18 extractos de maíz, 20 extractos de bolillo y 40 extractos de chorizo, constituyendo un total de 78 extractos, que se analizaron mediante el kit comercial de ELISA competitivo para el análisis cuantitativo de OTA de marca RIDASCREEN®FAST. Se emplearon dos kits de 48 pocillos cada uno. Para conocer la concentración de OTA presente, se realizó una curva de calibración para cada kit a partir de las concentraciones de soluciones estándar y la interpolación de los datos de absorbancia. El coeficiente de determinación (R^2) fue de 0.9658 para el kit 1 y una $R^2 = 0.9469$ para el kit 2. En la tabla 2 se pueden apreciar las concentraciones de OTA obtenidas para cada muestra en base a su absorbancia. Se calculó el promedio de las concentraciones de cada grupo de alimentos analizado y su desviación estándar (tabla 2). Como las concentraciones obtenidas por ambos métodos de extracción fueron muy diferentes, no hubo necesidad de aplicar pruebas estadísticas.

Tabla 2. Concentraciones de OTA en muestras de alimentos del municipio de Hidalgo, Michoacán obtenidas mediante ELISA.

Muestras	Alimento			
	Maíz (µg/kg)	Bolillo (µg/kg)	Chorizo M#1 (µg/kg)	Chorizo M#2 (µg/kg)
1	2.71	1.68	1.11	17.29
2	3.07	0.89	0.10	16.86
3	3.45	2.28	7.08	16.77
4	2.19	2.26	0.53	7.28
5	2.98	0.13	2.72	16.99
6	2.64	0.37	5.34	17.27
7	3.29	0.13	2.45	17.13
8	2.43	0.64	0.57	15.65
9	3.12	2.50	1.13	16.99
10	3.44	0.61	4.03	16.71
11	2.53	1.73	5.84	15.32
12	2.95	1.00	0.46	16.72
13	2.92	2.79	0.18	16.64
14	2.25	3.48	0.27	0.18
15	2.94	3.47	0.74	15.58
16	3.29	2.73	0.69	17.33
17	2.76	1.92	3.19	15.20
18	2.97	3.30	0.50	17.40
19		2.63	0.49	16.96
20		1.34	1.42	15.74
Promedio	**2.89**	**1.79**	**1.94**	**15.30**
Desviación estándar	**0.375**	**1.11**	**2.1**	**4.17**

Los resultados mostraron la presencia de OTA en el 100% de las muestras analizadas tanto de maíz, bolillo y chorizo. Para las muestras de maíz la concentración de OTA encontrada fue de 2.19 µg/kg – 3.45 µg/kg con un promedio de 2.89 µg/kg, en bolillo se observó una concentración de 0.13 µg/kg – 3.48 µg/kg y un promedio de 1.79 µg/kg, mientras que en chorizo la concentración de OTA correspondió a 0.10 µg/kg – 7.08 µg/kg con un promedio

de 1.94 µg/kg para el método #1 de extracción y 0.18 µg/kg – 17.40 µg/kg y un promedio de 15.30 µg/kg para el método #2 de extracción utilizado. Las diferencias entre las concentraciones obtenidas en ambos métodos se deben a los solventes de extracción utilizados, es posible que los solventes del método #2 extrajeran diversos componentes presentes en el chorizo, causando una mayor absorbancia y por consecuencia dando como resultado una mayor concentración de OTA.

Tomando en cuenta el Reglamento (EC) N° 1881/2006 de la Comisión del 19 de diciembre de 2006, de la Unión Europea, el promedio de las concentraciones de OTA tanto para maíz como para bolillo, están dentro de los límites máximos establecidos, que son 5 µg/ kg y 3 µg/ kg, respectivamente; sin embargo, tres muestras de bolillo, es decir el 15 %, rebasaron dicho limite. Por otro lado, el Ministerio de Salud de Italia CIRCOLARE 9 giugno 1999, n.10 (Gazzetta Ufficiale n. 135 del 11/06/1999), establece un límite de 1 µg/ kg para productos cárnicos. Las muestras de chorizo tuvieron concentraciones promedio de OTA por encima del límite establecido de como se muestra es la tabla 3. Rebasando dicho limite el 50% de las muestras para el método #1 y el 95% de las muestras para el método #2. Hay que recordar que aparentemente, las concentraciones de OTA obtenidas cuando se usó el método de extracción dos están sobrestimadas.

Tabla 3. Comparación entre las concentraciones promedio de OTA obtenidas y los niveles máximos de OTA establecidos por la Comisión Europea y el Ministerio de Salud de Italia.

Alimento	Porcentaje muestras positivas (%)	Mínimo (µg/kg)	Máximo (µg/kg)	Concentración promedio (µg/kg)	Niveles máximos establecidos (µg/kg)
Maíz	100	2.19	3.45	2.89	5.0
Bolillo	100	0.13	3.48	1.79	3.0
Chorizo M#1	100	0.10	7.08	1.94	1.0
Chorizo M#2	100	0.18	17.40	15.30	1.0

(Official Journal of the European Union, 2006; Italian Ministry of Health, 1999).

En las figuras 7 a la 10, pueden observarse de una manera más clara el comportamiento de los resultados de las concentraciones de OTA. La figura 7 correspondiente al maíz muestra poca dispersión entre las concentraciones medidas, oscilando entre 2 µg/kg – 3 µg/kg, en comparación de los otros dos grupos de alimentos analizados.

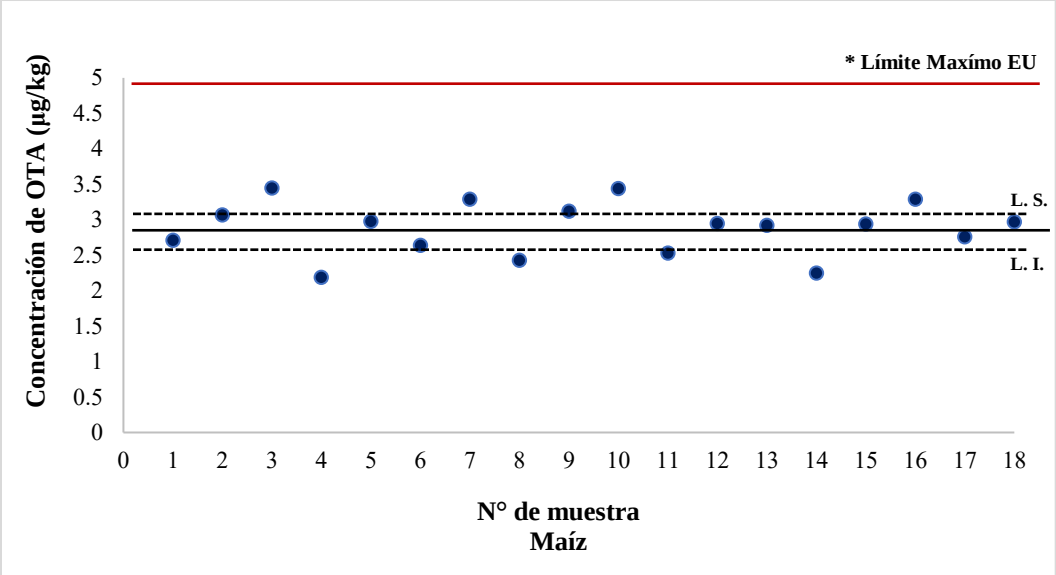


Figura 7. Valores de las concentraciones de OTA en Maíz obtenidas por ELISA. Ninguna de las muestras de maíz analizadas resultó por encima del límite establecido de 5 µg/kg. Se tomo un intervalo de confianza del 95%. Se observo poca dispersión entre los valores de los datos obtenidos. El límite inferior fue de 2.69 y el límite superior de 3.07 y una desviación estándar de 0.375. La mayoría de las concentraciones estuvieron dentro de los intervalos de concentraciones de 2.1 µg/kg – 3.3 µg/kg y la media de las concentraciones fue menor a 3 µg/kg.

Las concentraciones de OTA en el bolillo (Fig. 8), presentaron una mayor desviación estándar (1.11). La mayoría de las concentraciones obtenidas cayeron dentro del intervalo de 0.5 µg/kg – 3 µg/kg. Con dos muestras por debajo de este (muestras 5 y 7) y tres por encima (muestras 14, 15 y 18).

En los productos de carne de cerdo, se emplearon dos métodos de extracción para OTA. Los valores obtenidos en su mayoría estuvieron dentro de los intervalos de concentración de 0.1 µg/kg – 3 µg/kg, (Fig. 9), estando la mitad de las muestras por encima del límite establecido por el Ministerio de Salud de Italia de 1 µg/kg. El valor más alto fue el perteneciente a la muestra número tres con 7.08 µg/kg.

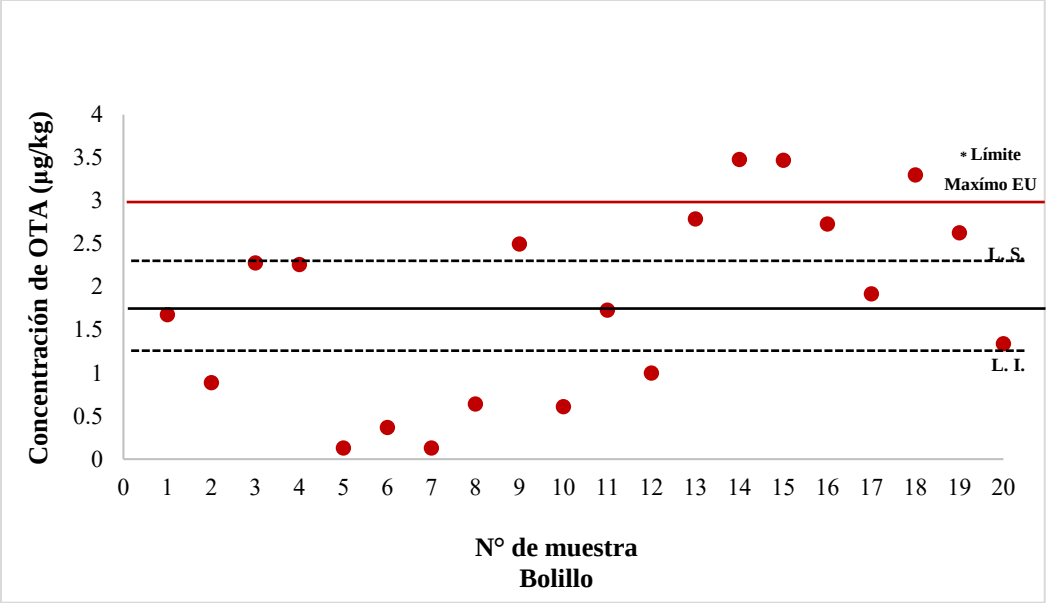


Figura 8. Concentraciones de OTA en Bolillo obtenidas por ELISA. Aunque, el promedio las concentraciones de OTA no rebasan lo establecido por la EU de 3 µg/kg., tres muestras se encontraron sobre dicho límite (14, 15 y 18).

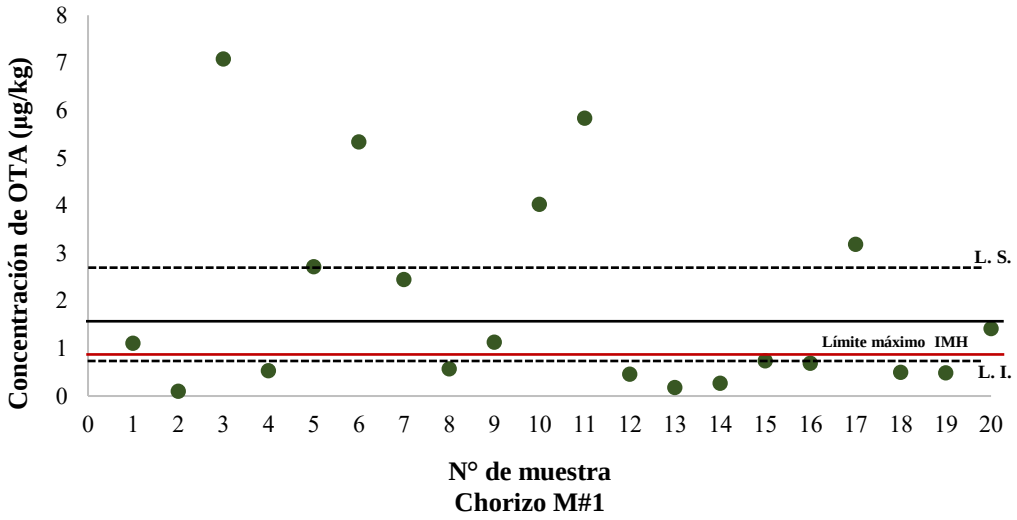


Figura 9. Valores de OTA encontrados en Chorizo M#1. En las concentraciones de OTA encontradas en los extractos de chorizo M#1 se observa que la mayoría de las concentraciones caen dentro de 0.1 µg/kg – 2 µg/kg. Teniendo valores de hasta 7 µg/kg y con la mitad de las muestras por encima del límite establecido de 1 µg/kg.

Al realizar el análisis ELISA para las muestras de chorizo en donde se empleó el método #2 de extracción para OTA, los valores de las concentraciones presentes fueron mucho más elevadas con respecto al método de extracción #1, estando la mayoría de los datos concentrados entre los intervalos de concentración de 15 µg/kg – 18 µg/kg (figura 10). A excepción de la muestra 14 de 0.18 µg/kg, el resto de las muestras superaron el límite de 1 µg/kg establecido.

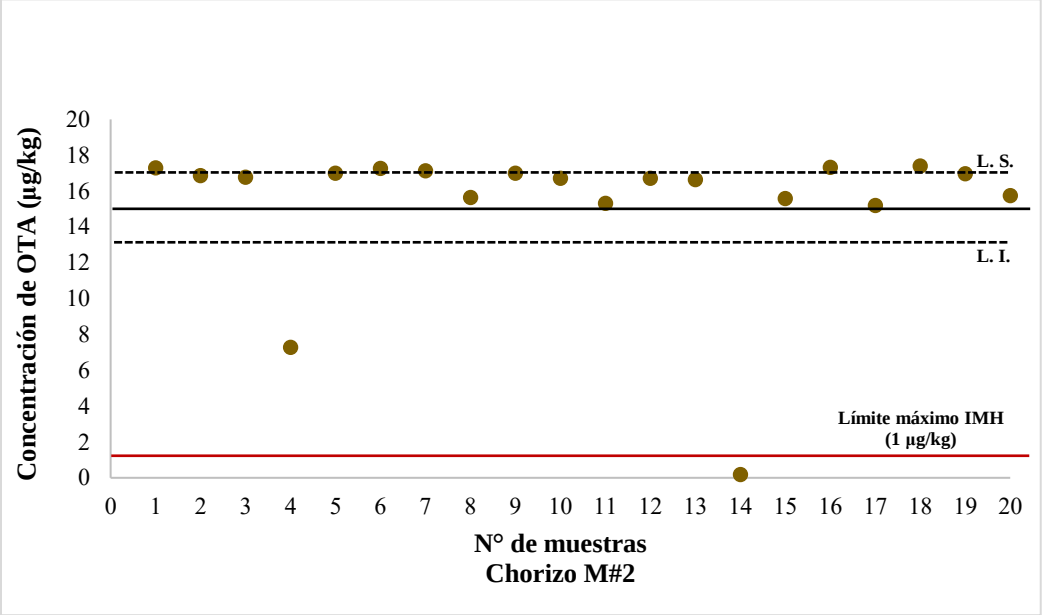


Figura 10. Valores de OTA encontrados en Chorizo M#2. En el método de extracción #2 para chorizo se obtuvieron valores mucho más elevados de OTA a comparación del M#1. Esto se debe a los solventes utilizados durante la extracción del alimento. La mayoría de los datos se concentran en el intervalo de 16 µg/kg – 18 µg/kg, siendo sólo dos de ellos quienes tienen una concentración menor de OTA que corresponde a muestra n° 4 (7.28 µg/kg) y la muestra n° 14 (0.18 µg/kg).

Selección fase móvil para TLC

Después de varias pruebas se determinó que la fase móvil compuesta por tolueno/acetato de etilo/ácido fórmico en una proporción 6:3:1 era la más adecuada para llevar a cabo la cromatografía de capa fina. Debido a que, con dicha fase fue posible observar de manera más nítida la banda correspondiente a OTA. Tal y como se observa en la figura 8c, donde se muestran ambos carriles correspondientes tanto a la muestra de maíz como al estándar de

OTA utilizados. En el carril correspondiente al extracto de maíz no se observó la presencia de alguna banda, siendo tentativo a ausencia de OTA.

Selección de solventes de extracción

Muestras de maíz y derivados de trigo.

Se utilizaron diferentes solventes de extracción de OTA dependiendo del alimento analizado, tanto para maíz como para derivados de trigo (bolillo) se utilizó acetonitrilo al 80%. El cual ya había sido seleccionado como adecuado de acuerdo con trabajos anteriores realizados en el Laboratorio de Desarrollo Analítico, Posgrado de Medicina, Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo, en los que se analizó maíz y derivados del mismo.

Sistema de solventes fase móvil	**Solventes de extracción**	
	Maíz y bolillo	**Chorizo**
Tolueno/acetato de etilo/ ácido fórmico (6:3:1 v/v/v)	Acetonitrilo al 80%	Solución 1% bicarbonato de sodio: metanol (60:40 v/v).
		Acetonitrilo/agua/ácido acético (84:16:1 v/v/v).

Muestras de derivados carne de cerdo.

En el caso de las muestras de derivados de carne de cerdo, se probaron cuatro distintos sistemas de solventes de extracción para chorizo, de los que se seleccionaron dos por la aparente idoneidad de estos, como se muestra en la tabla 4, donde se muestra un resumen de los solventes utilizados, se empleó una solución del 1% de bicarbonato de sodio/ metanol (60:40 v/v) para el método #1 de extracción y acetonitrilo /agua/ácido acético (84:16:1 v/v/v).

Tabla 4. Sistema de solventes para fase móvil TLC y extracción de chorizo para OTA. Resumen de los solventes utilizados para la fase móvil en cromatografía y en los métodos de extracción de los alimentos analizados.

Como resultado, se obtuvo la selección de dos métodos de extracción. Inicialmente, se propusieron cuatro diferentes métodos de extracción, dos de ellos contaban con composiciones similares pero distintas proporciones. Estos fueron correspondientes a los métodos #1 y #2 de extracción. Los métodos 1 y 2 que incluían Tween 20 en su formulación

fueron descartados al no ser posible observar de manera adecuada las bandas de OTA; además de ser difícil su aplicación (figura 12), quedando los métodos de extracción denominados con el número 3 y 4.

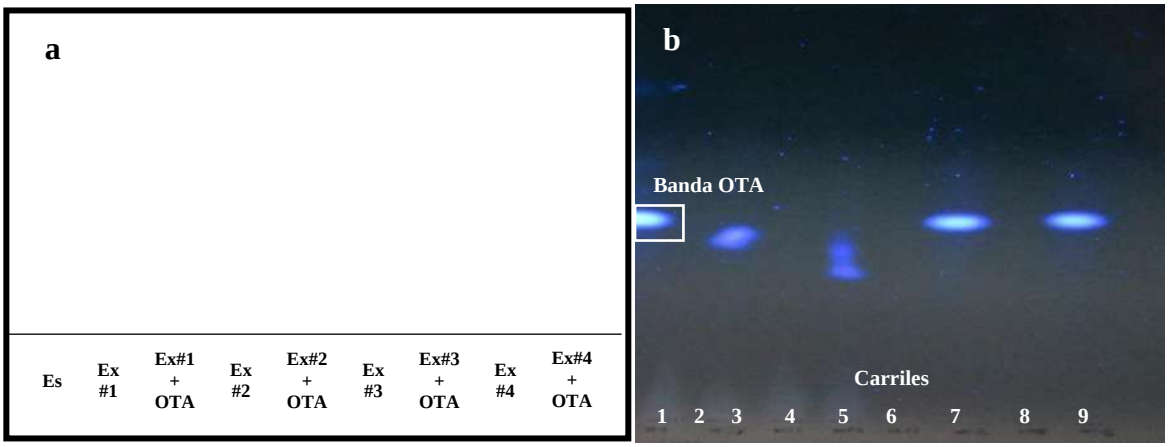


Figura 11. Detección de OTA en extractos de chorizo en placas TLC, utilizando cuatro diferentes métodos de extracción. Un total de nueve carriles, 1: estándar de OTA, 2: extracto #1, 3: extracto #1 + OTA**,** 4: extracto #2, 5: extracto #2 + OTA, 6: extracto #3, 7: extracto #3 + OTA, 8: extracto #4 y 9: extracto #4 + OTA. **12a.** Esquema placa TLC con el estándar de OTA ≥ 98 Sigma-Aldrich y los cuatro diferentes extractos de chorizo vs extractos de chorizo enriquecidos con OTA. **12b.** Placa TLC vista al UV, se observan las bandas inespecíficas obtenidas en los métodos de extracción 1 y 2; así como, las bandas de OTA obtenidas en los

Concentraciones de OTA obtenidas mediante HPTLC

Para la determinación de las concentraciones de OTA por medio de HPTLC debido a que no fue posible analizar todas las muestras mediante este método, se seleccionaron 14 extractos al azar con la finalidad de corroborar los resultados obtenidos por medio de ELISA. Las 14 muestras correspondieron a cinco muestras de maíz, dos muestras de bolillo, siete de chorizo. Referente a las muestras de chorizo, se cuantifico la concentración de OTA extraída en seis muestras pertenecientes al método #2 y una por el método#1.. Se elaboró una curva de concentración con soluciones estándar de OTA, con cinco puntos, la cual dio una R^2= 0.9931. De esta manera se obtuvieron los resultados enlistados en la tabla 5. Cuando se usan técnicas cromatográficas y se separan todos los componentes de una muestra, es posible eliminar interferencias. En el caso de los dos métodos de extracción aplicados a chorizo, se pudo observar que las concentraciones resultantes de ambos métodos son del mismo orden, corroborando que se elimina por esta técnica la interferencia que ocasionó que las

concentraciones en el método dos por ELISA sean muy grandes. Esto se puede observar directamente al comparar el dato n°9 de chorizo M#1 entre chorizo M#2 no se observan diferencias apreciables, resultandos similares entre sí. Por otro lado, se calculó la concentración promedio de cada grupo (tabla 5), en donde aparecen las respectivas concentraciones de OTA para las muestras analizadas y su respectivo promedio de las concentraciones de OTA, respecto a cada grupo de alimento. Tanto para maíz como para bolillo el promedio de las concentraciones no rebasó la normativa europea mientras que ambos métodos de extracción para chorizo arrojaron concentraciones por encima de lo establecido por el ministerio de salud de Italia, esto se puede apreciar de manera más clara en la tabla 6 en donde aparecen los valores de las máximas concentraciones permitidas para OTA, tanto para cereales como para carne de cerdo y derivados.

Tabla 5. Concentraciones de OTA presentes en muestras de alimentos procedentes del municipio de Hidalgo, Michoacán analizadas mediante HPTLC.

Número de extractos	Extracto analizado	Concentración de OTA (µg/Kg)	Promedio de las concentraciones de OTA (µg/Kg)
1	Maíz N°7	4.18	**3.56**
2	Maíz N°8	2.86	
3	Maíz N°10	4.24	
4	Maíz N°14	2.87	
5	Maíz N°18	3.67	
6	Bolillo N°2	1.25	**2.08**
7	Bolillo N°17	2.92	
8	Chorizo M#1 N°9	2.76	**2.76**
9	Chorizo M#2 N°5	4.1	**4.85**
10	Chorizo M#2 N°6	6.95	
11	Chorizo M#2 N°9	2.63	
12	Chorizo M#2 N°11	5.99	
13	Chorizo M#2 N°17	5.95	
14	Chorizo M#2 N°20	3.49	

Adicionalmente, en la tabla 6 se reportaron las concentraciones mínimas y máximas obtenidas, en dicha tabla aparecen los valores para cada grupo de alimentos. La concentración de ocratoxina A para maíz fue de 2.6 µg/Kg – 4.24 µg/Kg con un promedio de 3.26 µg/Kg, para bolillo fue de 1.25 – 2.92 µg/Kg con una concentración promedio de 2.08 µg/Kg, en cuanto a chorizo extraído por M#1 la concentración de OTA resulto ser de 2.76 µg/Kg y para chorizo M#2 de 2.63 – 6.95 µg/Kg y un promedio de concentración de 4.85 µg/Kg. Todas las muestras de chorizo estuvieron por encima de lo establecido, incluso la de menor concentración. Aunque, las muestras de maíz no rebasaron el límite, la concentración máxima obtenida estuvo cerca del establecido.

Tabla 6. Comparación de las concentraciones de OTA obtenidas mediante HPTLC y los límites máximos establecidos por la normativa.

Alimento	Muestras positivas	Concentración mínima de OTA (µg/Kg)	Concentración máxima de OTA (µg/Kg)	Promedio de las concentraciones de OTA (µg/Kg)	Niveles máximos establecidos (µg/kg)
Maíz	5	2.86	4.24	3.26	5
Bolillo	2	1.25	2.92	2.08	3
Chorizo M#1	1	-	-	2.76	1
Chorizo M#2	6	2.63	6.95	4.85	1

(Official Journal of the European Union, 2006; Italian Ministry of Health, 1999).

Una vez determinada las concentraciones de OTA tanto por inmunoensayo ELISA y por cromatografía HPTLC, se procedió a hacer la comparación entre ambos métodos de análisis para micotoxinas utilizados en este estudio. De esta manera, se elaboró la tabla 7 que lista los resultados obtenidos en ambo. De entrada y de manera evidente hay un numero diferente de muestras positivas reportadas en HPTLC. Sin embargo, las 14 muestras analizadas resultaron positivas, el 35. 7% correspondió al grupo de maíz, el 14. 3% al bolillo y el 50% al chorizo con el 7.1% para el método #1 des tracción y el 42.9% para chorizo método #2 de extracción para OTA. Este 100% de positividad concuerda con el obtenido por ELISA.

El número de muestras seleccionadas para el análisis de HPTLC no fueron suficientes para determinar diferencias entre ambas técnicas para el grupo de bolillo. No obstante, los valores de las concentraciones obtenidas son del mismo orden entre ELISA y HPTLC.

Tabla 7. Comparación de las concentraciones de OTA empleando ambas técnicas de análisis para micotoxinas. ELISA y HPTLC.

Muestras	Alimento							
	ELISA				HPTLC			
	Maíz (µg/kg)	Bolillo (µg/kg)	Chorizo M#1 (µg/kg)	Chorizo M#2 (µg/kg)	Maíz (µg/kg)	Bolillo (µg/kg)	Chorizo M#1 (µg/kg)	Chorizo M#2 (µg/kg)
1	2.71	1.68	1.11	17.29	ND	ND	ND	ND
2	3.07	0.89	0.10	16.86	ND	1.25	ND	ND
3	3.45	2.28	7.08	16.77	ND	ND	ND	ND
4	2.19	2.26	0.53	7.28	ND	ND	ND	ND
5	2.98	0.13	2.72	16.99	ND	ND	ND	4.1
6	2.64	0.37	5.34	17.27	ND	ND	ND	6.95
7	3.29	0.13	2.45	17.13	4.18	ND	ND	ND
8	2.43	0.64	0.57	15.65	2.86	ND	ND	ND
9	3.12	2.50	1.13	16.99	ND	ND	2.76	2.63
10	3.44	0.61	4.03	16.71	4.24	ND	ND	ND
11	2.53	1.73	5.84	15.32	ND	ND	ND	5.99
12	2.95	1.00	0.46	16.72	ND	ND	ND	ND
13	2.92	2.79	0.18	16.64	ND	ND	ND	ND
14	2.25	3.48	0.27	0.18	2.87	ND	ND	ND
15	2.94	3.47	0.74	15.58	ND	ND	ND	ND
16	3.29	2.73	0.69	17.33	ND	ND	ND	ND
17	2.76	1.92	3.19	15.20	ND	2.92	ND	5.95
18	2.97	3.30	0.50	17.40	3.67	ND	ND	ND
19		2.63	0.49	16.96		ND	ND	ND
20		1.34	1.42	15.74		ND	ND	3.49
Promedio	**2.89**	**1.79**	**1.94**	**15.30**	**3.26**	**2.08**	**2.76**	**4.85**

***N/D: No Determinado.**

En cuanto a las muestras de maíz y chorizo se realizó la prueba T de student para determinar la diferencia entre ambas técnicas utilizadas. El grado de significancia se tomó de $p \leq 0.05$, el maíz arrojo valores ligeramente mayores en las concentraciones de OTA obtenidas

mediante HPTLC en comparación con ELISA, pero no lo suficiente para tener diferencias significativas entre ellos, ($p = 0.10$). En ELISA la concentración mínima de OTA fue de 2.25 µg/kg y la concentración máxima de 3.44 µg/kg mientras que en HPTLC fue de 2.86 µg/kg y 4.24 µg/kg respectivamente.

El grupo de chorizo se comparó con los resultados obtenidos por ELISA M#1 y M#2. Respecto al método #2 de extracción se observaron diferencias significativas ($p < 0.001$), debido a que este método extrae otros componentes del chorizo resultando en una sobreestimación de las concentraciones. Esto se hizo más evidente cuando se compararon los resultados de HPTLC con el método #1 de extracción en ELISA, donde no hubo diferencias estadísticamente significativas ente ambas técnicas ($p = 0.16$). Para ELISA la concentración mínima de OTA fue de 1.13 µg/kg y la máxima de 5.84 µg/kg similar a lo obtenido en HPTLC que fue de 2.63 µg/kg y una concentración máxima de 6.95 µg/kg. Nuestros resultados muestran como el método #1 de extracción para chorizo extrae OTA, pero no así los otros componentes propios del chorizo y por este motivo es el método más adecuado para la determinación de OTA.

Discusión

La ocratoxina A (OTA) es una micotoxina producto del metabolismo secundario de hongos pertenecientes a los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*; la OTA puede encontrarse como contaminante en una gran variedad de productos agrícolas, sobre todo cereales, y productos de origen animal como la carne de cerdo (Alshannaq y Yu, 2017). La OTA ha sido asociada a una gran variedad de afecciones hacia la salud, destacando la ERCEND, si a esto adicionamos que el oriente del estado de Michoacán se ha observado un incremento en ERC desde edades tempranas y estudios previos han encontrado concentraciones de OTA en el suero de pobladores del municipio de Hidalgo, Michoacán (Reynoso Magaña, 2021; Cabezas Núñez, 2023). Nuestro estudio cobra importancia en la identificación de las fuentes de riesgo a la OTA. De acuerdo, a nuestro estudio al encontrarse positivos a ocratoxina A los alimentos muestreados, podemos decir que está presente el riesgo de enfermedad por causa del consumo de OTA. Para la determinación de OTA pueden emplearse una gran variedad de métodos desde inmunoensayos hasta cromatografía líquida acoplada a distintos detectores. Actualmente, la AOAC acepta métodos de análisis que hacen uso de técnicas como ELISA, TLC, HPLC, siendo esta última bastante costosa, sobre todo cuando está acoplada a Espectrometría de Masas. Por este motivo la HPTLC al ser una forma evolucionada de la TLC, resulta una buena opción para el análisis de OTA (Trucksess y Zhang, 2016). En este trabajo al comparar dos técnicas de análisis para micotoxinas, se puede asegurar la presencia de OTA en las muestras analizadas. Así como hacer evidente que el uso de cualquiera de las dos es adecuado para la determinación de las concentraciones de OTA.

Concentraciones de OTA analizadas por ELISA en comparación de las analizadas por HPTLC

La HPTLC es una técnica más accesible que otros tipos de cromatografía (HPLC), aun cuando es necesario tener el equipo adecuado para llevarla a cabo y seguir las indicaciones para su correcta realización. Se seleccionaron al azar 14 extractos de alimentos para su análisis mediante HPTLC, los resultados obtenidos se compararon con la técnica ELISA.

Teniendo en cuenta que ambas técnicas de análisis poseen principios diferentes, al comparar los resultados obtenidos tenemos lo siguiente:

Para maíz, el promedio de las concentraciones de OTA obtenidas de 3.56 µg/kg fueron similares a las obtenidas por ELISA de 2.89 µg/ kg con un intervalo de 2.19 µg/kg – 3.45 µg/kg similar a lo obtenido en HPTLC de 2.25 µg/kg – 3.44 µg/kg (tabla 7). De acuerdo con el análisis estadístico realizado, al no encontrar diferencias significativas podemos concluir que ambas técnicas de análisis son adecuadas para la detección y determinación de la presencia de OTA en maíz.

El segundo grupo analizado fue el bolillo como producto derivado de trigo. Las muestras seleccionadas al azar fueron la n°2 y n° 17. Los resultados obtenidos por HPTLC, fueron similares a los obtenidos por ELISA de 0.89 µg/kg, 1.25 µg/kg y 1.92 µg/kg, 2.92 µg/kg respectivamente.

Los resultados correspondientes a chorizo determinados en HPTLC muestran valores similares a los obtenidos en el método #1 de extracción por ELISA como se muestra en la tabla 7. Se observa además la marcada diferencia respecto al M#2 de extracción empleado, esto se explica debido a la composición de los extractos de chorizo obtenidos. Los extractos obtenidos por el M#2 presentaron un mayor color con respecto a las muestras extraídas por M#1 que presentaron una cantidad mayor de grasa visible pero no representó un problema para la medición de OTA. Recordando, que el ELISA se basa en reacciones colorimétricas producidas por la unión del antígeno – anticuerpo, el conjugado y el indicador que se miden de acuerdo con su absorbancia (Alhajj y Farhana, 2021), podemos afirmar que el exceso de color de los extractos M#2 causó interferencia en la medición por ELISA, dando resultados en promedio tres a cuatro veces mayores en comparación a lo reportado en HPTLC. Teniendo en cuenta esto, se resalta la importancia de contar con un método de extracción que sea más específico para OTA sin que extraiga interferencias de la muestra, como fue el caso del método de extracción #1. De lo contrario, los resultados pueden indicar una sobrestimación de OTA como ocurrió en el caso del M#2 de chorizo, cuando se determinó y cuantificó por ELISA. De este modo, resultó importante contar con otra técnica de análisis específica para OTA, la HPTLC que nos permitió corroborar las concentraciones presentes en los alimentos analizados y además, establecer cuál método de extracción para micotoxinas era más adecuado para el chorizo. Por otro lado, es interesante la similitud de nuestros resultados

obtenidos mediante HPTLC con los de otros autores, como es el caso de Zadravec *et al.*2020. Ellos reportaron concentraciones máximas de OTA de 6.86 μg/kg en 160 muestras de productos de carne de cerdo en Croacia, 67 muestras de jamón curado y 93 muestras de salchicha, analizadas por ELISA. Cabe mencionar que en su estudio Zadravec *et al* utiliza solventes parecidos a los que nosotros utilizamos en el M#1 de extracción difiriendo en que ellos utilizan dos solventes adicionales en su estudio. Otro aspecto a tener en cuenta es que las muestras analizadas a pesar de ser derivados de carne de cerdo tienen composición diferente al chorizo analizado por nosotros. Si tomamos en cuenta esto, podemos decir que no solo es importante elegir una técnica de análisis adecuada que se adapte a nuestras necesidades, sino que también dependiendo de la técnica utilizada es importante tomar en cuenta la composición de la muestra a analizar. Todos los solventes de extracción pueden ser útiles, pero no todos adecuados y esto influirá en los resultados. Es decir, los solventes de extracción que sean adecuados para una variedad de producto de carne de cerdo como las salchichas, que poseen diferentes ingredientes en su composición en comparación con el chorizo pueden no serlo para este último y de acuerdo al procedimiento de extracción utilizado dependerá si nos encontramos o no con interferencias en el momento de hacer la cuantificación de OTA. Esto lo podemos apreciar en nuestro estudio en el que, aunque los métodos de extracción M#1 y M#2 son adecuados para la determinación de HPTLC no es así para ELISA. Si bien, existe una diferencia entre el promedio de concentraciones obtenidas por HPTLC respecto al M#1 de extracción de chorizo, esto se debe en parte al número menor de datos tomados en el análisis por HPTLC, donde las muestras tomadas al azar resultaron tener concentraciones de OTA altas y al ser pocas muestras dio un promedio mayor en las concentraciones. Por tanto, aquí la importancia de que en nuestro estudio se emplearan ambas técnicas analíticas. Con estos resultados podemos asegurar que los alimentos muestreados en el municipio de Hidalgo, Michoacán contienen concentraciones de OTA y existe una exposición de esta en este municipio. Por otro lado, los valores de las concentraciones de OTA en chorizo obtenidas por nosotros son menores a las reportadas por otros autores como Delfino *et al.,* 2022. Por lo que nuestras muestras tuvieron un menor grado de contaminación por OTA a las reportadas en otros países.

Los resultados obtenidos mediante ELISA en gran parte estuvieron por debajo del límite de detección, al tener resultados similares mediante HPTLC podemos decir que ambos métodos tienen límites de detección parecidos.

De acuerdo con nuestros resultados, llama la atención que las concentraciones de OTA obtenidas en el chorizo están por encima de lo establecido. Lo cual, si lo analizamos un poco no es del todo extraño; ya que, el chorizo es un producto elaborado no solo con carne de cerdo sin también, una serie de especias como pimienta y clavo, que de acuerdo con un estudio realizado en Pickova *et al.,* 2020 hay evidencia de pueden sufrir contaminación por OTA, de igual forma los chiles secos con que se realiza el adobo que recubre la carne, como describe Jeswal *et al.,* 2015 en su estudio realizado en la India. Adicionado a esto, la elaboración del chorizo de forma tradicional implica dejarlo al aire libre en su proceso de curado. Así como una vez elaborado, durante su comercialización, normalmente está a la intemperie. Dependerá de las condiciones del lugar para que exista o no una exposición adicional a ser contaminado con OTA.

Concentraciones de OTA por ELISA

El método de ELISA utilizado para la detección de micotoxinas se basa en la unión específica del antígeno al anticuerpo, y da teniendo una alta sensibilidad y especificidad adecuadas para detectar un gran número de muestras (Alhajj y Farhana, 2021; Alshannaq y Yu, 2017). El 100 % de las muestras de maíz analizadas por ELISA dieron positivo a OTA, de manera similar a lo obtenido en un estudio previo realizado en el laboratorio de Desarrollo analítico del posgrado de la Facultad de Medicina, UMSNH (Castillo Najar, 2015). El promedio de las concentraciones de OTA en maíz (2.89 µg/kg) y bolillo (2.20 µg/kg) no rebasaron los límites establecidos por la Unión Europea establecidos como 5 µg/ kg y 3 µg/ kg, respectivamente (Official Journal of the European Union, 2006); sin embargo, es importante recordar que OTA ha sido asociada a una serie de efectos dañinos hacia la salud, destacando el daño renal por la acumulación de la misma en nuestro organismo, ya que posee una vida media muy larga y su eliminación es casi nula, tanto en el organismo vivo como la toxina presente en los alimentos (Pyo *et al*., 2021; Li *et al.,* 2021); además, la contaminación por OTA puede ocurrir en las diferentes etapas de obtención del alimentos, desde el cultivo, recolección y almacenamiento (Marín *et al*., 2013; Kaushik, 2015); por tanto, es adecuado

un control durante sus diferentes etapas de producción para garantizar así niveles bajos de OTA. El intervalo de las concentraciones de OTA queda dentro de las encontradas por Gillani *et al.,* 2021 en Pakistán mediante LC (1.41 a 53.9 µg/ kg), el promedio de las concentraciones de OTA en maíz resultó similar al obtenido por Cheng *et al.* en un estudio realizado en China (2 µg/ kg) donde se analizaron 426 muestras mediante UPLC-MS/MS, el valor máximo de OTA mostrado en maíz fue de 3.45 µg/ kg menor a los valores máximos de OTA encontrados en maíz por Guan *et al*. (9.67 µg/ kg) utilizando LC-MS/MS. A lo referente a las concentraciones de OTA en derivados de trigo, bolillo, Daou *et al*. analizaron 312 muestras de trigo y productos derivados de trigo libaneses obteniendo el 100 % de las muestras positivas a OTA con un promedio de 2.28 µg/ kg, valor ligeramente mayor al obtenido en el presente estudio (1.79 µg/ kg) donde además sólo dos muestras (10%) rebasaron los niveles máximos establecidos para OTA por la Comisión Europea (3.0 µg/ kg), teniendo un valor máximo de 3.48 µg/ kg; no así, Daou *et al.* que obtuvieron 55 muestras (17.6 %) por encima de la norma con un valor máximo de 69.3 µg/ kg. Resultados que contrastan con un estudio realizado en Egipto con 36 muestras de trigo por Hathout *et al.,* 2020 con solo dos muestras positivas a OTA (1,37 µg/kg y 0,21 µg/kg) estando por debajo del límite establecido por la Comisión Europea para cereales sin procesar (5 µg/kg). De acuerdo, a nuestros resultados hubo una mayor variación en las concentraciones de bolillo a comparación de las concentraciones de OTA en maíz, esta variación puede ser atribuida a que en el proceso de elaboración de bolillo existe una mayor exposición a sufrir contaminación por OTA, como en el almacenamiento del trigo, el almacenamiento de la harina, la inocuidad en el proceso de producción, entre otros. Por otro lado, aunque no hay una norma que establece los límites máximos permitidos para OTA en productos cárnicos y derivados, el Ministerio de Salud de Italia estableció un límite para carne de cerdo y derivados de 1 µg/kg (Italian Ministry of Health, 1999). En este apartado se mencionarán los resultados obtenidos con ambos métodos de extracción para compararlos con resultados obtenidos de alimentos similares en otros trabajos, aunque sabemos que las concentraciones obtenidas por el método de extracción 2 están sobreestimadas. De acuerdo con esto, el promedio de las concentraciones de OTA obtenidas, 1.94 µg/kg para el método #1 de extracción y 15.30 µg/kg para el método #2 de extracción utilizado, están por encima de dicho límite, siendo este último 15 veces mayor a lo establecido. Los valores observados en el método #2 (0.18 µg/kg – 17.40 µg/kg) difieren

a los encontrados por Zadravec y colaboradores *(*2020) en 160 muestras de productos de carne de cerdo de Croacia, 67 muestras de jamón curado y 93 muestras de salchicha, analizadas por ELISA; en su estudio 14 % de las muestras dieron positivo a OTA con una concentración máxima de 6.86 µg/kg, casi 7 veces mayor a lo establecido por el Ministerio de Salud de Italia, para las muestras de jamón las concentraciones de OTA encontradas fueron de 2.74 µg/kg – 6.86 µg/kg y para las muestras de salchicha de 2.16 µg/kg – 5.39 µg/kg; sin embargo, los valores son ligeramente parecidos a los obtenidos en el método #1 (0.10 µg/kg – 7.08 µg/kg). En otro estudio llevado a cabo en Croacia por Pleadin *et al*. 2015, se encontraron concentraciones mayores de OTA, las cuales podrían estar dentro de las obtenidas en el presente trabajo; se analizaron 410 muestras de productos cárnicos tradicionales procedentes de hogares y comercios, 105 muestras de jamones, 205 muestras de salchichas secas fermentadas, mediante el método ELISA y LC-FLD; el nivel máximo de OTA observado en las salchichas y jamones fermentados fue de alrededor de 5 veces (5.10 µg/kg) a 10 veces (9.95 µg/kg) más alto que el nivel máximo recomendado (1 µg/kg). La diferencia entre las concentraciones podría deberse a la diferencia entre los alimentos analizados, así como, los solventes de extracción utilizados. De igual forma, existe una diferencia clara entre los valores de las concentraciones de OTA entre ambos métodos de extracción, esto podría deberse a la naturaleza de los solventes empleados, solución metanol/bicarbonato de sodio 1% para el método #1 y acetonitrilo/agua/ácido acético para el método #2.

Concentraciones de OTA por HPTLC

La cromatografía de capa fina fue la técnica que en un principio se utilizó en los métodos cromatográficos para la determinación de micotoxinas. La cromatografía se basa en la separación de los componentes de una muestra, y así poder medir al analito de interés, mediante el uso de solventes con afinidad por la misma. Los componentes de la muestra se hacen presentes en sus respectivas bandas cromatográficas. La forma evolucionada de la TLC es la HPTLC con la que puede cuantificarse las concentraciones de OTA (Trucksess y Zhang, 2016). En este estudio se midió la concentración de OTA para 14 de las muestras procedentes del municipio de Hidalgo, Las muestras fueron positivas en su totalidad, se analizaron cinco muestras de maíz que dieron como resultado el 100 % de las muestras positivas al igual que

lo obtenido por Castillo Najar, 2015 en 34 muestras analizadas mediante ELISA, diferente a lo reportado por Gillani *et al.,* 2021 con el 61% positivo de 135 muestras de maíz analizadas por medio de HPLC. El promedio de las concentraciones de OTA obtenidas de 3.56 µg/kg fueron ligeramente mayores a lo determinado por Cheng *et al.* (2 µg/ kg) en 426 muestras analizadas mediante UPLC-MS/MS; aunque, no rebasaron los límites establecidos por la normativa europea de 5 µg/ kg (Official Journal of the European Union, 2006). El intervalo de las concentraciones de OTA 2.25 µg/kg – 3.44 µg/kg caen dentro de lo reportado por Gillani *et al.,* 2021 de 1.41 µg/kg a 53.9 µg/kg, pero el valor máximo de OTA de 53.9 µg/kg resultó mucho mayor que el obtenido por nosotros de 3.44 µg/ kg y el obtenido por Guan *et al*. (9.67 µg/ kg) en 100 muestras analizadas. Comparando el número de muestras analizadas tenemos que son de cinco a seis veces mayor en ambos estudios en comparación con las analizadas por nosotros. A esto se le puede atribuir la posibilidad de tener muestras con mayores concentraciones de OTA o mucho menores, tomando en cuenta que OTA no contamina uniformemente el alimento y que puede existir una gran variabilidad de la misma en las muestras al aumentar su número. Por tanto, para tener un adecuado control en la presencia de OTA en los alimentos, es conveniente la realización de estudios frecuentes y con un número mayor de muestras.

El bolillo fue el alimento seleccionado para el análisis de OTA en productos derivados de trigo, para el análisis por HPTLC se seleccionaron dos muestras la n°2 y a la n°17, ambas dieron positivas, indicando así el 100 % de positividad para OTA. Este resultado es similar al obtenido por Daou *et al.,* 2021 del 100 % de muestras positivas, solo que ellos se encontraron con el 17.6 % de sus muestras por encima de la norma con un valor máximo de 69.3 µg/ kg. Sin embargo, ellos tuvieron un promedio de 2.28 µg/ kg similar al nuestro de 2.08 µg/ kg. A su vez, nuestros resultados difieren con los reportados por Hathout *et al.,* 2020 que estudiaron 36 muestras de trigo procedentes de Egipto con solo dos muestras positivas a OTA (1.37 µg/kg y 0.21 µg/kg) estando por debajo del límite establecido por la Comisión Europea para cereales sin procesar (5 µg/kg), valores que difieren con los nuestros de 1.25 µg/ kg y 2.92 µg/ kg dentro de los niveles máximos establecidos para OTA por la Comisión Europea (3.0 µg/ kg). En este caso, es posible que los resultados difieran al tratar de diferentes tipos de muestra; si bien, la composición entre ambos grupos de muestra es el trigo, hay que tener en cuenta que, en nuestro estudio, se trata de un producto derivado del mismo.

Recordando que la OTA no puede eliminarse mediante el procesamiento común de los alimentos (Zhu *et al.,* 2017), que es posible una contaminación durante los procesos de producción (Alshannaq y Yu, 2017) y la forma de elaboración del bolillo en el lugar de estudio, no es de extrañar que el bolillo que cuenta con un proceso de elaboración más largo que la harina de trigo tenga una mayor presencia de OTA.

El chorizo correspondiente a los derivados de carne de cerdo, como se mencionó anteriormente, se analizó empleando dos métodos de extracción. Al ser la misma muestra de y no existir interferencias en su medición el chorizo M#1 y M#2 fue tomado como un solo grupo. Se analizaron siete muestras que resultaron positivas, equivalente al 100 % de las mismas, con valores entre 2.63 μg/kg – 6.95 μg/kg y un promedio de 4.55 μg/kg, siendo entre cuatro y cinco veces mayor a lo recomendado de 1 μg/kg. El porcentaje de muestras positivas difiere al obtenido por Delfino *et al.,* 2022 de 8.88% que analizaron 45 productos de carne de cerdo, con una muestra que rebasaba alrededor de 70 veces el valor máximo recomendado por el Ministerio de Salud Italiano (69.3 μg/kg), muy por encima de nuestros resultados. A su vez, esto difiere a lo encontrado en Croacia por Pleadin *et al*. 2015 con el 10.2 % de muestras positivas a OTA analizadas mediante ELISA y LC-FLD, 105 muestras de jamones, 205 muestras de salchichas secas fermentadas. El valor de los niveles máximos de las concentraciones fue mayor a las obtenidas por nosotros; aunque nuestros resultados caen dentro de los obtenidos por ellos. El nivel máximo de OTA observado en las salchichas y jamones fermentados fue de alrededor de 5 veces (5.10 μg/kg) a 10 veces (9.95 μg/kg) más alto que el nivel máximo recomendado (1 μg/kg). De acuerdo a esto, podemos decir que si bien nuestras muestras tenían niveles por encima de lo recomendado no estaban tan contaminadas como las analizadas en otros estudios. La diferencia entre estos valores puede deberse al derivado en carne de cerdo analizado, así como las condiciones de elaboración del alimento, el cómo fue alimentado el animal del que se tomó la carne para producir los derivados de cerdo (Marín *et al*., 2013; Kaushik, 2015), e incluso de cómo se trató el producto una vez terminado, cuanto paso desde su elaboración hasta la toma de muestra para su análisis.

Nuestros resultados dan pie a la posibilidad de utilizar un tipo de cromatografía diferente a HPLC, como una opción más económica y accesible a la mencionada. De acuerdo con nuestros resultados, podemos afirmar que HPTLC es un tipo de cromatografía adecuada para

la determinación de concentraciones de OTA presente en los alimentos. Siempre y cuando se tenga el equipo necesario para realizar el análisis y teniendo en cuenta la capacitación necesaria para el personal que realizara los estudios. Sería interesante la realización de análisis futuros empleando HPTLC para poder concluir de una mejor manera las ventajas y desventajas frente HPLC y si valiese la pena considerarlo como un sustito de esta en pequeños laboratorios de bajo presupuesto.

Finalmente, es adecuado tener en cuenta que, actualmente no existe una normativa en México o Estados Unidos que regule los niveles de OTA en alimentos, lo que lleva a una desregulación de esta y por tanto un mayor riesgo de exposición a la OTA. Por otro lado, en México son pocos o bastante escasos los trabajos enfocados en determinar las concentraciones de OTA en los alimentos, en especial los de alto consumo como lo son el maíz, derivados de trigo y productos derivados de la carne de cerdo. Sería adecuado estudiar a mayor profundidad esta toxina debido a los posibles riesgos a la salud que puede ocasionar y así tener un panorama más claro del riesgo en el que se encuentra la población en nuestro país al consumir alimentos contaminados con dicha micotoxina. Así como, un mejor control de la misma y con ello prevenir posibles efectos nocivos a la salud en un futuro, es decir, un mejor manejo de los alimentos y aseguramiento de la inocuidad alimentaria, que al final es traducido como un problema de salud pública.

Conclusiones

Los resultados del presente estudio muestran que ambas técnicas de análisis para micotoxinas empleados son adecuadas para la determinación de las concentraciones de OTA. Es importante el empleo de dos técnicas analíticas de principios diferentes para garantizar la fiabilidad de los resultados y poder conocer si el procedimiento de extracción afecta o no a los mismos. El presente estudio hizo evidente que de acuerdo al alimento y a la técnica de análisis ciertos solventes serán más adecuados que otros.

De acuerdo a los resultados obtenidos, nuestra hipótesis planteada en el presente trabajo se cumplió parcialmente, menos de la mitad de las muestras de alimentos analizados estuvieron por encima de los niveles máximos establecidos, mientras que las concentraciones de OTA en maíz estuvieron adentro de lo establecido (5 μg/kg), tres muestras de bolillo estuvieron por encima de la norma (3 μg/kg) y el chorizo se encontró alrededor de cinco veces por encima de lo recomendado por el Ministerio de Salud de Italia (1 μg/kg).

Hay que tener en cuenta que OTA se acumula en el organismo y los efectos de OTA se presentan ante su exposición crónica; entonces, la exposición continua de pequeñas cantidades de esta, puede producir un efecto toxico en nuestro organismo. Así mismo nuestra alimentación no se basa únicamente en maíz, bolillo o chorizo, sino en un conjunto de alimentos que pueden ser contaminados por OTA. Dando de este modo, una mayor exposición a la ocratoxina A si no se tiene un control adecuado. Aumentando el riesgo de padecer alguna de las afecciones atribuidas a OTA como es el caso de la ERCEND. Sin olvidar que el desarrollo de algún padecimiento dependerá del organismo en cuestión, de los hábitos alimenticios de la persona y la dosis de OTA a la que está expuesta.

Referencias

Alhajj, M. y Farhana, A. (2021). *Enzyme Linked Immunosorbent Assay.* StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. PMID: 32310382.

Alshannaq, A., y Yu, J. H. (2017). *Occurrence, Toxicity, and Analysis of Major Mycotoxins in Food*. International journal of environmental research and public health, 14(6), 632. Doi: 10.3390/ijerph14060632.

Attimarad, M., Ahmed, K. K., Aldhubaib, B. E., & Harsha, S. (2011). *High-performance thin layer chromatography: A powerful analytical technique in pharmaceutical drug discovery*. Pharmaceutical methods, 2(2), 71–75. Doi: 10.4103/2229-4708.84436.

Arce-López, B., Lizarraga, E., Vettorazzi, A., & González-Peñas, E. (2020). *Human Biomonitoring of Mycotoxins in Blood, Plasma and Serum in Recent Years: A Review.* Toxins, 12(3), 147. Doi: 10.3390/toxins12030147.

Agarwal, P., Singh, D., Raisuddin, S., & Kumar, R. (2019). *Amelioration of ochratoxin-A induced cytotoxicity by prophylactic treatment of N-Acetyl-L-Tryptophan in human embryonic kidney cells.* Toxicology, 152324. Doi: 10.1016/j.tox.2019.152324.

Arroyo-Manzanares, N., Rodríguez-Estévez, V., Arenas-Fernández, P., García-Campaña, A.M., & Gámiz-Gracia, L. (2019). *Occurrence of Mycotoxins in Swine Feeding from Spain.* Toxinas, 11(6), 342. Doi: 10.3390/toxinas11060342.

Attimarad, M., Ahmed, K. K., Aldhubaib, B. E., & Harsha, S. (2011). *High-performance thin layer chromatography: A powerful analytical technique in pharmaceutical drug discovery*. Pharmaceutical methods, 2(2), 71–75. Doi: 10.4103/2229-4708.84436

BMJ Best Practice. (2021). *Enfermedad Crónica Renal.*

https://bestpractice.bmj.com/topics/es-es/84

Cabezas Núñez B. (2023). *Estado nutricional y concentraciones séricas de ocratoxina A en habitantes del Municipio de Hidalgo, Michoacán*. [Tesis de Maestría].

Castillo Najar. 2015. Determinación de Ocratoxina A en café, cerveza y maíz de Morelia Michoacán por un método E.L.I.S.A.

Carrillo Vega, M. F., Pelcastre Villafuerte, B. E., Salinas Escudero, G., Durán Arenas, L., y López Cervantes, y M. (2017). *Empoderamiento y apoyo social en pacientes con enfermedad renal crónica: estudio de caso en Michoacán, México.* Revista Panamericana de Salud Pública, 41, 1. Doi: 10.26633/RPSP.2017.164

Chávez-Gómez, N.L., Cabello-López, A., Gopar-Nieto, R., Aguilar-Madrid, G., Marín-López, K.S., Aceves-Valdez, M., Jiménez-Ramírez, C., Cruz-Angulo, M.C., Juárez-Pérez, C.A. (2017). *Enfermedad renal crónica en México y su relación con los metales pesados.* Revista Médica Instituto Mexicano Seguro Social. 2017;55(6):725-34

Cheng S, Feng X, Liu G, Zhao N, Liu J, Zhang Z, Yang N, Zhou L, Pang M, Tang B, Dong J, Zhao B, Liu Y. (2022). *Natural Occurrence of Mycotoxins in Maize in North China*. Toxins (Basel). 14(8):521. Doi: 10.3390/toxins14080521.

Chulze, S. N. (2010). *Strategies to reduce mycotoxin levels in maize during storage: a review.* Aditivos alimentarios y contaminantes: Parte A, 27(5), 651–657. Doi: 10.1080/19440040903573032.

Daou, R., Joubrane, K., Khabbaz, L. R., Maroun, R. G., Ismail, A., & El Khoury, A. (2021). *Aflatoxin B1 and ochratoxin A in imported and Lebanese wheat and -products.* Food Additives & Contaminants: Part B, 14(3), 227–235. Doi: 10.1080/19393210.2021.1933203.

De Boevre, M., Di Mavungu, J. D., Landschoot, S., Audenaert, K., Eeckhout, M., Maene, P., Haesaert, G y De Saeger, S. (2012). *Natural occurrence of mycotoxins and their masked forms in food and feed products.* World Mycotoxin Journal, 5(3), 207–219. Doi: 10.3920/WMJ2012.1410.

De Ruyck K, Huybrechts I, Yang S, Arcella D, Claeys L, Abbeddou S, De Keyzer W, De Vries J, Ocke M, Ruprich J, De Boevre M, De Saeger S. (2020). *Mycotoxin exposure*

assessments in a multi-center European validation study by 24-hour dietary recall and biological fluid sampling. Environ Int. Doi: 10.1016/j.envint.2020.105539.

De Santis, B., Debegnach, F., Sonego, E., Mazzilli, G., Buiarelli, F., Ferri, F., Giorgi Rossi, P., Collini, G., y Brera, C. (2019). *Biomonitoring Data for Assessing Aflatoxins and Ochratoxin A Exposure by Italian Feedstuffs Workers.* Toxins, 11(6), 351. Doi: 10.3390/toxins1106035.1

De Santis, B., Gregori, E., Debegnach, F., Moracci, G., Saitta, C., & Brera, C. (2020). *Determination of ochratoxin A in pork meat products: single laboratory validation method and preparation of homogeneous batch materials.* Mycotoxin Research. Doi:10.1007/s12550-020-00386-9.

Duarte, S.C., Pena, A., y Lino, C.M. (2010). *A review on ochratoxin A occurrence and effects of processing of cereal and cereal derived food products.* Food Microbiology, 27(2), 187–198. Doi:10.1016/j.fm.2009.11.016.

European Commission Assessment of dietary intake of ochratoxin A by the population of EU Member States (2006). Report of the Scientific Cooperation, Task 3.2.7 Directorate-General Health and Consumer Protection, European Commission.

Gillani SWUHS, Sadef Y, Imran M, Raza HMF, Ghani A, Anwar S, Ashraf MY, Hussain S. (2022). *Determination and detoxification of aflatoxin and ochratoxin in maize from different regions of Pakistan.* Environ Monit Assess. 194(9):613. Doi: 10.1007/s10661-022-10197-3.

Glaser, J., Lemery, J., Rajagopalan, B., Diaz, H. F., Garcia, R., Taduri, G., Madero, M., Amarasinghe, M., Abraham, G., Anutrakulchai, S., Jha, V., Stenvinkel, P., Roncal, C., Lanaspa, M. A., Correa, R., Sheikh, D., Burdmann, E. A., Andrés, A. , Milagres, T., Weiss, I., Kanbay, M., Wesseling, C., Sánchez-Lozada, L. G. y Johnson, R. J. (2016). *Climate Change and the Emergent Epidemic of CKD from Heat Stress in Rural Communities: The Case for Heat Stress Nephropathy.* Clinical Journal of the American Society of Nephrology, 11(8), 1472–1483. Doi: 10.2215/CJN.13841215.

Haque MA, Wang Y, Shen Z, Li X, Saleemi MK, He C. (2020). *Mycotoxin contamination and control strategy in human, domestic animal and poultry: A review*. Microb Pathog. Doi: 10.1016/j.micpath.2020.104095

Hathout AS, Abel-Fattah SM, Abou-Sree YH, Fouzy ASM. (2020). *Incidence and exposure assessment of aflatoxins and ochratoxin A in Egyptian wheat.* Toxicol Rep. Doi: 10.1016/j.toxrep.2020.07.003

Heussner A. H., Bingle L. E. *Comparative Ochratoxin Toxicity: A Review of the Available Data.* Toxins (Basel). 2015 Oct 22;7(10):4253-82. Doi: 10.3390/toxins7104253.

Hill, N. R., Fatoba, S. T., Oke, J. L., Hirst, J. A., O'Callaghan, C. A., Lasserson, D. S., y Hobbs, F. D. R. (2016). *Global Prevalence of Chronic Kidney Disease – A Systematic* Review and Meta-Analysis. PLOS ONE, 11(7), e0158765. Doi: 10.1371/journal.pone.0158765.

IARC. (2018). *Agents Classified by the IARC Monographs, Volumes 1–123.* https://monographs.iarc.who.int/wp-content/uploands/2018/09/ClassificationsAlpha Order.pdf

Imaoka, T., Yang, J., Wang, L., McDonald, M. G., Afsharinejad, Z., Bammler, T. K., van Ness, K., Yeung, C. K., Rettie, A. E., Himmelfarb, J. y Kelly, E. J. (2020). *Mycrophysological System Modeling of Ochratoxin A-Associated Nephrotoxicity*. Toxicology, 152582. Doi: 10.1016/j.tox.2020.152582.

Instituto Nacional de Salud Pública. (2020). *La Enfermedad Renal Crónica en México.* https://www.insp.mx/avisos/5296-enfermedad-renal-cronica-mexico.html#sup2

Italian Ministry of Health (1999). Direttive in materia di controllo ufficiale sui prodotti alimentari: Valori massimi ammissibili di micotossine nelle derrate alimentari di origine nazionale, comunitaria e Paesi terzi. GU n.135. Author.

Johnson, R. J., Sánchez-Lozada, L. G., Newman, L. S., Lanaspa, M. A., Diaz, H. F., Lemery, J., Rodriguez-Iturbe, B., Tolan, D. R., Butler-Dawson, J., Sato, Y., Garcia G,

Hernando, A. A, Roncal-Jiménez, C. A. (2019). *Climate Change and the Kidney.* Ann Nutr Metab. 74(Suppl. 3), 38–44. Doi: 10.1159/000500344.

Kaushik, G. (2015). *Effect of Processing on Mycotoxin Content in Grains.* Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 55(12), 1672–1683. Doi: 10.1080/10408398.2012.701254.

Kępińska-Pacelik, J., & Biel, W. (2021). *Alimentary Risk of Mycotoxins for Humans and Animals*. Toxins, 13(11), 822. Doi: 10.3390/toxins13110822.

Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *KDIGO 2012 clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease*. Kidney Int Suppl. 2013 Jan;3(1):1-150.

Khoi, C. S., Chen, J. H., Lin, T. Y., Chiang, C. K., y Hung, K. Y. (2021). *Ochratoxin A-Induced Nephrotoxicity: Up-to-Date Evidence.* International journal of molecular sciences, 22(20), 11237. Doi:10.3390/ijms222011237.

Konstantinou, G. N. (2017). *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).* Food Allergens, 79–94. Doi:10.1007/978-1-4939-6925-8_7.

Kőszegi, T., y Poór, M. (2016). *Ochratoxin A: Molecular Interactions, Mechanisms of Toxicity and Prevention at the Molecular Level.* Toxins, 8(4), 111. Doi: 10.3390/toxins8040111.

Magnoli, C. E., Astoreca, A. L., Chiacchiera, S.M., y Dalcero, A.M. (2007). *Occurrence of ochratoxin A and ochratoxigenic mycoflora in corn and corn-based foods and feeds in some South American countries.* Mycopathologia, 163(5), 249–260. Doi: 10.1007/s11046-007-9005-z.

Li, Q., Dong, Z., Lian, W., Cui, J., Wang, J., Shen, H., … Cui, H. (2019). *Ochratoxin A causes mitochondrial dysfunction, apoptotic and autophagic cell death and also induces mitochondrial biogenesis in human gastric epithelium cells. Archives of Toxicology, 93(4), 1141–1155.* Doi:10.1007/s00204-019-02433-6

Li, X., Ma, W., Ma, Z., Zhang, Q., & Li, H. (2021). *Recent progress in determination of ochratoxin a in foods by chromatographic and mass spectrometry methods.* Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 1–32. Doi:10.1080/10408398.2021.1885340.

Marín, S., Ramos, A. J., Cano-Sancho, G., y Sanchis, V. (2013). *Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment.* Food and Chemical Toxicology, 60, 218–237. Doi: 10.1016/j.fct.2013.07.047.

Nolan P, Auer S, Spehar A, Elliott CT, Campbell K. (2019). *Current trends in rapid tests for mycotoxins.* Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess. 36(5):800-814. Doi: 10.1080/19440049.2019.1595171.

Reynoso Magaña A. (2021). *Análisis de patrones alimentarios y su asociación con concentraciones séricas de ocratoxina A en pacientes con enfermedad renal en estadios 3, 4 y 5 de clasificación de KDIGO.* [Tesis de maestría].

Santos, E.A. y Vargas, E.A. (2002). *Immunoaffinity column clean-up and thin layer chromatography for determination of ochratoxin A in green coffee.* Food Additives & Contaminants. 19:5, 447-458. Doi: 10.1080/02652030110213717.

Scudamore, K. A. (2005). *Prevention of ochratoxin A in commodities and likely effects of processing fractionation and animal feeds.* Food Addit Contam. 2005;22 Suppl 1:17-25. Doi: 10.1080/02652030500309392.

Secretaria de Salud del Estado de Michoacán. (2019). *Busca SSM prevenir enfermedad renal crónica.* https://salud.michoacan.gob.mx/noticias/busca-ssm-prevenir-enfermedad-renal-cronica/.mx)

Silva, LJG, Rodrigues, AP, Pereira, AMPT, Lino, CM, & Peña, A. (2019). *Ocratoxina A en el Mercado del Vino Portugués, Evaluación de Riesgos y Ocurrencia.* Aditivos alimentarios y contaminantes: Parte B, 1–5. Doi:10.1080/19393210.2019.1595169.

Stoev, S. D. (2013). *Food Safety and Increasing Hazard of Mycotoxin Occurrence in Foods and Feeds.* Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 53(9), 887–901. Doi: 10.1080/10408398.2011.571800.

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), 329. Doi: 10.3390/toxins11060329.

Oplatowska-Stachowiak, M., Kleintjens, T., Sajic, N., Haasnoot, W., Campbell, K., Elliott, C. T., & Salden, M. (2017). *T-2 Toxin/HT-2 Toxin and Ochratoxin A ELISAs Development and In-House Validation in Food in Accordance with the Commission Regulation (EU) No 519/2014.* Toxins, 9(12), 388. Doi: 10.3390/toxins9120388.

Pei, K., Xiong, Y., Xu, B., Wu, K., Li, X., Jiang, H., & Xiong, Y. (2018). *Colorimetric ELISA for ochratoxin A detection based on the urease-induced metallization of gold nanoflowers.* Sensors and Actuators B: Chemical, 262, 102–109. Doi: 10.1016/j.snb.2018.01.193.

Pereira, V. L., Fernandes, J. O., y Cunha, S.C. (2014). *Mycotoxins in cereals and related foodstuffs: A review on occurrence and recent methods of analysis.* Trends in Food Science &Technology, 36(2), 96–136. Doi: 10.1016/j.tifs.2014.01.005.

Pleadin J., Stayer MM, Vahcic N., Kovatcevic D., Milone S., Saftic L., Scortichini G. (2015). *Survey of aflatoxin B1 and ochratoxin A occurrence in traditional meat products coming from Croatian households and markets.* Control de Alimentos. 2015; 52 :71–77. Doi: 10.1016/j.foodcont.2014.12.027.

Pyo, M. C., Choi, I. G., y Lee, K. W. (2021). *Transcriptome Analysis Reveals the AhR, Smad2/3, and HIF-1α Pathways as the Mechanism of Ochratoxin A Toxicity in Kidney Cells.* Toxins, 13(3), 190. Doi: 10.3390/toxins13030190.

Tabarani, A., Zinedine, A., Bouchriti, N., & Hassane Abdennebi, E. (2020). *Exposure assessment to ochratoxin A through the intake of three cereal derivatives from the Moroccan market.* Food Research International, 109464. Doi: 10.1016/j.foodres.2020.109464.

Tao, Y., Xie, S., Xu, F., Liu, A., Wang, Y., Chen, D., Pana, Y., Huangb, L., Penga, D., Wanga, Xu y Yuan, Z. (2018). *Ochratoxin A: Toxicity, oxidative stress and*

metabolism. Food and Chemical Toxicology, 112, 320–331. Doi:1 0.1016/j.fct.2018.01.002.

Tolosa J., Rodríguez-Carrasco Y., Ruiz MJ., Vila-Donat P. (2021). *Multi-mycotoxin occurrence in feed, metabolism and carry-over to animal-derived food products: A review.* Food Chem Toxicol. Doi: 10.1016/j.fct.2021.112661.

Trucksess, M. W., y Zhang, K. (2016). *Cutting-Edge Techniques for Mycotoxin Analysis.* Journal of AOAC International, 99(4), 835–836. Doi: 10.5740/jaoacint.16-0109.

Wang, J., Rios, A., Lisova, K., Slavik, R., Chatziioannou, A. F., y Van Dam, R. M. (2020). *High-throughput radio-TLC analysis.* Nuclear medicine and biology, 82-83, 41–48. Doi: 10.1016/j.nucmedbio.2019.12.003.

Wang, Y., Zhao, M., Cui, J., Wu, X., Li, Y., Wu, W., & Zhang, X. (2020). *Ochratoxin A induces reprogramming of glucose metabolism by switching energy metabolism from oxidative phosphorylation to glycolysis in human gastric epithelium GES-1 cells in vitro.* Toxicology Letters. Doi: 10.1016/j.toxlet.2020.08.008.

Webster, A. C., Nagler, E. V., Morton, R. L., y Masson, P. (2017). *Chronic Kidney Disease*. The Lancet, 389(10075), 1238–1252. Doi: 10.1016/S0140-6736(16)32064-5.

Zadraveca, M., Vahčićb, N., Brnićc, D., Markovb, K., Freceb, J., Beckd, R., Tina Lešiće, T., y Jelka Pleadine, J. (2020). *A study of surface moulds and mycotoxins in Croatian traditional dry-cured meat products.* International Journal of Food Microbiology. 317.1084 59. Doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108459.