



UNIVERSIDAD DE CUENCA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
MAESTRÍA EN TOXICOLOGÍA INDUSTRIAL Y AMBIENTAL

**EVALUACIÓN DE LA CALIDAD E INOCUIDAD POR CONTAMINACIÓN CON
OCRATOXINA A DE LA CERVEZA ARTESANAL EXPENDIDA EN BARES
DE LA CIUDAD DE CUENCA**

Trabajo de Titulación previo a la
obtención del título de: Magister en
Toxicología Industrial y Ambiental

AUTOR:

Evelyn Michelle Castro Arteaga
C.I. 0104827068

DIRECTORA:

Dra. Silvia Johana Ortiz Ulloa PhD
C.I. 0301082897

CUENCA – ECUADOR
2018



RESUMEN

En este trabajo se evaluó la calidad e inocuidad de la cerveza artesanal expendida en bares de Cuenca mediante la determinación de parámetros físico-químicos y microbiológicos, según norma INEN 2262 y la determinación del grado de contaminación por ocratoxina A. En 42 muestras previamente degasificadas se analizó el pH y la acidez mediante métodos potenciométricos. El recuento de aerobios mesófilos, de mohos y levaduras se realizaron por siembra en placa a profundidad. La cuantificación de ocratoxina A se analizó por cromatografía líquida de alta resolución con detección de fluorescencia (HPLC-FLD). El 2,4% (n=1) y 33, 3% (n=14) de las cervezas muestreadas estuvieron fuera de los rangos establecidos por la norma para pH y acidez, respectivamente. El 95% (n=40) de los recuentos fueron elevados tanto para aerobios mesófilos como para mohos y levaduras, con una media de $9.7 \cdot 10^6$ UFC/cm³ y $7.6 \cdot 10^6$ UP/cm³, respectivamente. Por otro lado, el 23.8% (n=10) de las cervezas artesanales analizadas resultaron contaminadas con ocratoxina A, sin embargo, no superaron el límite máximo establecido por el JECFA.

Se concluye que la calidad microbiológica de la cerveza artesanal es deficiente y resultaría por la falta de regulaciones de organismos responsables del control en la producción de cerveza artesanal.

Palabras clave: cerveza artesanal, ocratoxina, HPLC-FLD, control microbiológico



ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the quality and the safety of crafts beers expended in Cuenca pubs by determining the physicochemical and microbiological parameters according to INEN 2262 and through the determination of ochratoxin A level contamination. The samples investigated were 42 samples previously degassed. The pH and acidity were analyzed by potentiometric methods. Counting of aerobic mesophilic bacterias, and molds and yeasts were determined by viable standard plate count. The contamination for ochratoxin A was determined by high performance liquid chromatography with fluorescence detection (HPLC-FLD). The 2.4% (n=1) and 33.3% (n=14) of crafts beers were over the established range of the applicable regulations for pH and total acidity, respectively. Respecting to microbiological parameters, 95% (n=40) achieved high counts outside of the range recommended by the regulations with an average of $9.7 \cdot 10^6$ UFC/cm³ and $7.6 \cdot 10^6$ UP/cm³ for aerobic mesophilic bacterias and for molds and yeasts, respectively. On the other hand, the 23.8% (n=10) of crafts beers were contaminated with ochratoxin A, whose found levels weren't above the maximum limit according to JECFA. It is concluded that the microbiological quality of crafts beers is deficient and it would be the result of the lack of regulations by the responsible entities that they do not have any control over production of crafts beers.

Key words: craft beer, ochratoxin, HPLC-FD, microbiological control



ÍNDICE

RESUMEN	2
ABSTRACT	3
ÍNDICE DE FIGURAS	7
ÍNDICE DE TABLAS.....	7
INTRODUCCIÓN	12
OBJETIVOS.....	14
OBJETIVO GENERAL	14
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
1. MARCO TEÓRICO	15
1.1 CERVEZA	15
1.1.1 HISTORIA	15
1.1.2 CLASIFICACIÓN DE LA CERVEZA	15
1.1.3 ELABORACIÓN DE CERVEZA	16
1.2 MICOTOXINAS	27
1.2.1 CONCEPTO	27
1.2.2 EFECTOS NOCIVOS DE LAS MICOTOXINAS	28
1.2.3 MICOTOXINAS EN CERVEZA.....	29
1.3 OCRATOXINA A.....	30
1.3.1 GENERALIDADES	30
1.3.2 COMPOSICIÓN QUÍMICA.....	30
1.3.3 PRODUCCIÓN DE OCRATOXINA A	31
1.3.4 TOXICIDAD	32
1.3.5 OCRATOXINA A EN CEREALES Y PRODUCTOS DERIVADOS.....	33
1.3.6 TÉCNICAS DE DETERMINACIÓN DE OTA EN CERVEZA	34
1.3.7 LEGISLACIÓN PARA OCRATOXINA A	34
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	36



2.1 TIPO DE ESTUDIO	36
2.2 ÁREA DE ESTUDIO	36
2.3 MUESTREO, TAMAÑO DE LA MUESTRA Y RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA.....	36
2.3.1. MUESTREO	36
2.2 DETERMINACIÓN DE OCRATOXINA A.....	38
2.2.1 FUNDAMENTO	38
2.2.2 EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS	38
2.2.3 EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA CON CARTUCHOS DE INMUNOAFINIDAD	39
2.2.6 CONDICIONES PARA HPLC	40
2.2.7 CURVAS DE CALIBRACIÓN	41
2.3 DETERMINACIÓN DE PH EN BEBIDAS ALCOHÓLICAS.....	41
2.3.1 FUNDAMENTO	41
2.3.2 EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS	42
2.3.3 PROCEDIMIENTO	42
2.3.4 REPORTE DE RESULTADOS.....	42
2.4 DETERMINACIÓN DE LA ACIDEZ TOTAL POR EL MÉTODO DE TITULACIÓN POTENCIOMÉTRICA.....	42
2.4.1 FUNDAMENTO	42
2.4.2 EQUIPOS, REACTIVOS Y MATERIALES	42
2.4.3 PROCEDIMIENTO	43
2.4.4 CÁLCULOS	43
2.4.5 REPORTE DE RESULTADOS.....	43
2.5 DETERMINACIÓN DE MICROORGANISMOS AEROBIOS MESÓFILOS, RECuento EN PLACA REP	44
2.5.1 FUNDAMENTO	44
2.5.2 EQUIPOS, REACTIVOS Y MATERIALES	44
2.5.3 PROCEDIMIENTO	45
2.5.5 PRESENTACIÓN DE RESULTADOS.....	46
2.6 RECuento EN PLACA POR SIEMBRA EN PROFUNDIDAD DE MOHOS Y LEVADURAS VIABLES	46
2.6.1 FUNDAMENTO	46
2.6.2 EQUIPOS, REACTIVOS Y MATERIALES	46
2.6.3 PROCEDIMIENTO	47
2.6.4 CÁLCULOS	48
2.6.5 PRESENTACIÓN DE RESULTADOS.....	48
2.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	48



3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	49
3.1 DETERMINACIÓN DE PH	49
3.2 DETERMINACIÓN DE ACIDEZ TOTAL	50
3.3 RECUENTO DE AEROBIOS MESÓFILOS.....	51
3.4 RECUENTO DE MOHOS Y LEVADURAS	53
3.5 DETERMINACIÓN DEL NIVEL DE CONTAMINACIÓN POR OCRATOXINA A (OTA).....	54
CONCLUSIONES	57
RECOMENDACIONES	58
REFERENCIAS	59
ANEXOS.....	64



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del almidón y zonas de acción de las enzimas amilasas	21
Figura 2. Escala de colores de la European Brewer Convention	25
Figura 3. Fases de crecimiento fúngico y localización de la síntesis de micotoxinas	28
Figura 4. Estructura molecular de la ocratoxina A, B y C	31

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de cerveza por grado alcohólico	25
Tabla 2. Micotoxinas, hongos y afecciones en animales y humanos	29
Tabla 3. Lugares seleccionados para muestreo de cerveza artesanal en la ciudad de Cuenca	37
Tabla 4. Condiciones analíticas para determinación de ocratoxina A por HPLC-FLD	40
Tabla 5. Preparación de soluciones estándares para la cuantificación de ocratoxina A.....	41
Tabla 6. Resultados de la medición de pH en cervezas artesanales	49
Tabla 7. Resultados de la determinación de acidez total en cerveza artesanal, expresado como % ácido láctico.....	50
Tabla 8. Resultados de la determinación de aerobios mesófilos por recuento en placa, expresado en UFC/cm ³	51
Tabla 9. Resultados de la determinación de mohos y levaduras en cerveza, expresado en UP/cm ³	53
Tabla 10. Resultados de la determinación de ocratoxina en cerveza artesanal por HPLC-FLD, expresado en ng/ml de cerveza	55



Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio
Institucional

Evelyn Michelle Castro Arteaga, en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "EVALUACIÓN DE LA CALIDAD E INOCUIDAD POR CONTAMINACIÓN CON OCRATOXINA A DE LA CERVEZA ARTESANAL EXPENDIDA EN BARES DE LA CIUDAD DE CUENCA", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, Enero de 2018

Una firma manuscrita en tinta azul que parece decir "Evelyn Michelle Castro Arteaga", escrita sobre una línea horizontal.

Evelyn Michelle Castro Arteaga

C.I. 0104827068



Cláusula de Propiedad Intelectual

Evelyn Michelle Castro Arteaga, autora del trabajo de titulación "EVALUACIÓN DE LA CALIDAD E INOCUIDAD POR CONTAMINACIÓN CON OCRATOXINA A DE LA CERVEZA ARTESANAL EXPENDIDA EN BARES DE LA CIUDAD DE CUENCA", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor/a.

Cuenca, Enero de 2018

Evelyn Michelle Castro Arteaga

C.I. 0104827068



DEDICATORIA

Este trabajo es el inicio del crecimiento personal y esfuerzo por ser cada día mejor, se la dedico con todo mi cariño:

A Dios,

Por darme la oportunidad de llegar a este hermoso momento de mi vida y por tantas bendiciones para conmigo.

A mis padres,

Por el apoyo incondicional, día a día me animan a seguir adelante. Significan para mí el pilar fundamental de la persona en la que me he convertido. Gracias por enseñarme tanto de la vida y por estar ahí cuando más los necesito, LES AMO PAPITOS.

A mi Esposo,

Cris, mi amor, no encuentro las palabras para decirte en este momento lo importante que es tenerte a mi lado pero gracias por ser exactamente mi complemento perfecto. Eres más de lo que siempre soñé. Gracias por seguir caminando junto a mí todos estos años y por siempre formar parte de mis travesías. Eres mi bendición, TE AMO.

A mi hermoso Joaquín,

Eres nuestra bendición, el regalo que siempre esperé con ansias. Cuando crezcas leeremos esto juntos, TE ADORO MI CHIQUITO.

A mis familiares y amigos,

Quienes han estado pendientes de todo este proceso, muchas gracias por el apoyo y su amistad incondicional.

Michelle

10



AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradezco a Dios por todas las bendiciones recibidas, por permitirme vivir hermosas y enriquecedoras experiencias en este periodo de estudio.

A mis padres Raúl y Emma, por sus palabras sabias en los momentos más difíciles; por sus enseñanzas de que no hay nada en la vida que no se pueda superar, por ser mi ejemplo. A mis hermanos Oscar y Angie, gracias por el apoyo incondicional, por su cariño y gracias por mi chiquito.

A mi esposo, Cris, por su paciencia, buena voluntad, comprensión y amor. No existe mejor medicina que tu compañía. Sigue sujetando mi mano por siempre y caminemos juntos por más aventuras.

Agradezco a la Dra. Silvana Donoso, por permitirme usar las instalaciones del laboratorio de “Alimentación, Nutrición y Salud” del Departamento de Biociencias para la realización de este trabajo de investigación.

A mi directora y amiga Johana Ortiz, gracias por el tiempo dedicado para enseñarme y compartir sin límites sus conocimientos. Muchas gracias de corazón por todo el apoyo que me ha brindado en este trabajo.

A mis amigas de laboratorio Gaby, Diany y Katty por todo su apoyo, por levantarme, por soportarme y por acompañarme a lo largo de este trabajo, gracias por su sincera amistad.

Michelle



INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, los países en vías de desarrollo mantienen prácticas artesanales de cultivo, cosecha y almacenamiento de diversos alimentos como maíz, arroz, trigo, cebada, caña de azúcar, entre otros (FAO, 2010, Martínez et al., 2010, CAC, 2015). Esto podría conllevar a una falta de control de la calidad del alimento, debido a que son más vulnerables a contaminación por plagas, roedores, pesticidas por la falta de medidas preventivas que cuiden su integridad (Duarte Vogel and Villamil Jiménez, 2006, Soriano del Castillo, 2007, Martínez et al., 2010). Estos factores de riesgo pueden persistir hasta la manufactura de productos derivados como harinas, alimentos para animales, bebidas alcohólicas, entre otros (Volkova, 2013, Kuruc et al., 2015b). El tratamiento post-cosecha de los alimentos, en especial de los cereales, debe ser bien controlado debido a que un alto grado de humedad del grano lo convierten en una fuente nutritiva para el crecimiento de hongos productores de micotoxinas, lo que representa un peligro latente para la salud animal y humana (Tangni et al., 2002, Martínez et al., 2010, Volkova, 2013, CAC, 2015, Kuruc et al., 2015b, Kuruc et al., 2015a).

La cerveza es un producto fermentado de cereales como trigo, centeno, avena, maíz, arroz y cebada, siendo este último el más utilizado en la cervecería de occidente (Lasram et al., 2013). A nivel mundial, se han realizado varios estudios en esta bebida alcohólica en los que determinan la presencia de micotoxinas (Varelis et al., 2006, Wu et al., 2011, Vaclavikova et al., 2013, Kuruc et al., 2015b). La Ocratoxina A (OTA), producida por hongos del género *Penicillium* y *Aspergillus*, es la micotoxina que principalmente se ha reportado en este producto (Visconti et al., 2000, Lasram et al., 2013, Bellver Soto et al., 2014, Bauer et al., 2016, Wu et al., 2011). Esta toxina en los alimentos representa un riesgo potencial para quien lo consume debido a su acción neurotóxica, teratogénica, inmunotóxica, hepatotóxica y cancerígena (Jorgensen, 1998, Mateo et al., 2007, Wu et al., 2011). Según la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC), OTA ha sido clasificada como posible carcinógeno del grupo 2B en seres humanos (IARC, 2013).

En Ecuador la elaboración de cerveza artesanal ha alcanzado gran importancia desde el 2010. Según la Sociedad Ecuatoriana de Cerveceros Artesanales (SECA), la producción de cerveza artesanal inició como emprendimientos entre amigos y familiares, y hoy en día se cuentan con cerca de 55 microcerveceras artesanales en todo el país (SECA, 2016). Por lo general, la cerveza se elabora en áreas domésticas



con instrumentación básica sin vigilancia física ni microbiológica del lugar, ni del producto resultante (El-Tiempo, 2016). En la ciudad de Cuenca, el expendio de este producto en bares no tiene ningún control ni se exige el cumplimiento de ninguna norma, lo que hace que se desconozca el grado de inocuidad química y/o microbiológica.

La presente investigación tiene por objeto evaluar la calidad y el grado de inocuidad de cerveza artesanal en bares de la ciudad de Cuenca con respecto al cumplimiento de Normativa Ecuatoriana INEN 2262 que incluye parámetros fisicoquímicos y microbiológicos, así como también al nivel de contaminación por Ocratoxina A, lo que permitirá establecer medidas correctivas en su elaboración y la regulación del producto en la ciudad.



OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar la calidad y el grado de inocuidad de la cerveza artesanal expendida en bares de la ciudad de Cuenca mediante la determinación de los parámetros físico-químicos y microbiológicos establecidos por la normativa ecuatoriana INEN 2262 y la determinación del grado de contaminación por ocratoxina A.

Objetivos Específicos

- Evaluar la calidad de la cerveza artesanal expendida en bares de la ciudad de Cuenca mediante la determinación de los parámetros físico-químicos y microbiológicos establecido por la Norma INEN 2262 (acidez total, pH, recuento estándar en placa de aerobios mesófilos, y recuento de mohos y levaduras).
- Evaluar el grado de inocuidad de la cerveza artesanal expendida en los bares de la ciudad de Cuenca mediante la determinación del nivel de contaminación de ocratoxina A por cromatografía líquida de alta presión y detección por fluorescencia (HPLC-RP) y su posterior comparación con normativas internacionales.



1. MARCO TEÓRICO

1.1 CERVEZA

1.1.1 Historia

La cerveza es la bebida resultante de la fermentación alcohólica producida por la levadura contenida en el mosto procedente de la malta de cebada y aromatizada con lúpulo (Hornsey, 2003, IICA, 2000, SECA, 2016). La cerveza es uno de los productos más antiguos de la civilización. Hallazgos arqueológicos del año 3000 a.C. demuestran su producción en el Antiguo Egipto como agente protector para evitar la peste (Martínez, 2015, Artesana, 2003). Tradicionalmente, la cerveza se componía de tres ingredientes básicos: cebada malteada, agua y levadura transportada por el aire (Cervebel, 2012). La cebada remonta su existencia a los 3000 a.C. y los mejores cultivos de cebada se encontraban en países nórdicos como Alemania o Inglaterra que se convirtieron en principales productores de cerveza (SECA, 2016). Antiguamente, en el año 999 se agregaba a la malta el gruit (grutum) que es una mezcla de hierbas secas con resina de pino que aromatizaban y actuaba como conservante de la cerveza, lo que hizo que los grutereros fueran los hombres más ricos de la época medieval (Cervebel, 2012).

En el siglo XII se reemplazó el gruit por el lúpulo promovidos por mercaderes flamencos y holandeses. Su uso mejoraba la calidad de la cerveza por combatir levaduras silvestres y su sabor amargo la hacía más ligera (Cervebel, 2012, Behre, 1999). A partir del siglo XVIII todas las cervezas se elaboran con lúpulo, aquellas que no fueron producidas con este ingrediente se conocían como "ale" (SECA, 2016, Behre, 1999). Entre 1981 y 1986 en Bélgica se duplicó la producción de cerveza, lo que resultó en la elaboración de una cerveza más homogénea en sabor y aroma. La escasez de tipos de cerveza, han permitido renacer microcerveceras tradicionales a nivel mundial (Cervebel, 2012, SECA, 2016).

1.1.2 Clasificación de la Cerveza

Existen diferentes tipos de cerveza que pueden clasificarse a partir de varios criterios, como se presenta a continuación:

a. **Según su aspecto:** Se basa en rasgos visuales como el color, pudiendo ser rubias, ámbar y negras; y por su turbiedad, pudiendo ser turbias o claras (Rodríguez, 2008).



b. **Según la materia prima:** Se refiere al cereal utilizado. Se denomina “cerveza” si procede de la cebada. Si la malta de cebada se reemplaza por otro cereal se indica como “cerveza de...” seguido de la malta de origen (Rodriguez, 2008, Gonzalez, 2017).

c. **Según el tipo de fermentación:** Esta constituye la clasificación de preferencia para categorizar las cervezas pues incluye casi todos los estilos existentes (Rodriguez, 2008, Gonzalez, 2017, Castillo A., 2014). Se diferencian tres tipos:

- *De baja fermentación o Lager:* Son cervezas ligeras cuya fermentación se da en la parte baja del tanque y en ambientes fríos entre 2 a 8 °C (Castillo A., 2014, Gonzalez, 2017).
- *De alta fermentación o Ale:* Son aquellas que realizan su fermentación en la parte alta del tanque a temperaturas de 15 a 25 °C, transformando los azúcares del mosto en cerveza (Castillo A., 2014, Gonzalez, 2017).
- *De fermentación espontánea:* Este tipo de cerveza se diferencia de las dos anteriores debido a que no fermentan en tanques sino en tinas grandes sin aporte de levaduras. La fermentación se da por las levaduras salvajes provenientes del ambiente (Castillo A., 2014).

d. **Según el contenido de extracto seco:** Esta clasificación constituye un criterio de calidad que refiere a la cantidad de cereales que se usan para la elaboración de la cerveza, conocido como Extracto Seco Primitivo (ESP). El extracto seco primitivo se expresa en gramos por cada 100 gramos de mosto (Rodriguez, 2008). De acuerdo a esta clasificación se distinguen los siguientes tipos de cerveza:

- Cervezas sin alcohol: ESP entre 2 y 4
- Cervezas Tradicionales: ESP entre 11 y 13
- Cervezas especiales: ESP entre 13 y 15
- Cervezas extra especiales: ESP 15 o más (Rodriguez, 2008)

1.1.3 Elaboración de Cerveza

La cerveza es la bebida resultante de la fermentación alcohólica producida por la levadura contenida en el mosto procedente de la malta de cebada y aromatizada con lúpulo (Hornsey, 2003, IICA, 2000, SECA, 2016).



1.1.3.1 *Materia prima*

a. Cebada: Los granos de cebada tienen forma ovoide y están rodeados de varias capas de cáscara que protegen el pericarpio, el endospermo que es fuente de nutrientes para nuevos brotes y al embrión (Baxter, 2001, Bamforth, 2004). La cebada utilizada para la elaboración de la cerveza pertenece a la especie de *Hordeum spp* en la que se distinguen la *Hordeum vulgare L.* con seis hileras y la *Hordeum distichum L.* con dos hileras, esta especies tienen una concentración moderada de proteínas de 10-12% lo que determina la calidad de la malta, la estabilidad de la espuma y la nutrición de las levaduras (Arias, 1991, Gonzalez, 2017). La selección de la cebada de buena calidad maltera evalúa el estado físico del grano. Por ejemplo, cuando el color del grano es amarillo pajizo resulta de buenas condiciones de maduración y cosecha, el exceso de lluvia decolora el grano y aparece una coloración negra que indica el crecimiento de hongos que disminuye la calidad de la malta. Se rechaza el lote cuando la alteración del color supera el 12% (Arias, 1991, Hornsey, 2003). El brillo es indicador de buenas condiciones de maduración, cosecha y almacenamiento, a menor humedad más brillo (Arias, 1991). El grano de cebada debe llegar completo al malteado para garantizar que el endospermo induzca a la aleurona a la producción enzimática necesaria para la producción de la cerveza (Gonzalez, 2017, Arias, 1991). Mientras más redondeados los granos de cebada, más homogénea es la distribución de las enzimas mejorando el extracto y las características de disolución (Hornsey, 2003, Gonzalez, 2017, Arias, 1991).

b. Lúpulo: Es una planta de la familia Cannabáceas del género *Humulus* en la que se distinguen tres especies *H. japonicus*, *H. yunnanensis* y *H. lupulus*. Esta última es utilizada en la industria cervecera por sus propiedades aromatizantes y conservantes (Fonnegra, 2007). La parte más importante a nivel comercial son las flores femeninas del lúpulo por contener glándulas de lupulina que es una sustancia amarillenta y amarga compuesto de resinas (α -ácidos), aceites esenciales y taninos usados en la industria de la cerveza (Martinez A. et al., 2007). El sabor amargo y característico de la cerveza se da por isomerización de las resinas durante la cocción del mosto (Hornsey, 2003, Martinez A. et al., 2007, Yepes, 2007).

Componentes de la Lupulina

- **Componentes amargos:** Representan del 5–20% del peso del lúpulo maduro. Se clasifican como α -ácidos y β -ácidos derivados del floroglucinol di o triprenilados. Los α -ácidos están en mayor proporción alrededor de 4 mg/mL



de cerveza y determina la calidad del lúpulo. Se han aislado la humulona (35-70%), cohumulona (20-65%) y adhumulona (10-15%), su función básicamente es la conservación de la cerveza dando estabilidad en la espuma y por su actividad antimicrobiana (Martinez A. et al., 2007, Fonnegra, 2007). Son susceptibles a la oxidación por altas temperaturas, por lo que pierden su capacidad de amargor. Los β -ácidos no tienen mucha importancia, contribuyen al amargor de la cerveza pero en menor proporción (Martinez A. et al., 2007, Gonzalez, 2017).

- **Componentes aromáticos:** Los aceites esenciales son volátiles, no soportan elevadas temperaturas, los lúpulos aromáticos se añaden al final de la cocción mientras que los lúpulos de amargor se adicionan al inicio para garantizar su isomerización (Hornsey, 2003, SECA, 2016, Milligan et al., 1999). Los aceites esenciales están compuesto por alcanos, monoterpenos entre ellos el *monoterpeno myrceno* y sesquiterpenos como β -cariofileno y humuleno que representan el 57-82% de los aceites esenciales (Martinez A. et al., 2007).
- **Flavonoides prenilados:** Son mezclas de chalconas secretadas por las glándulas lupulínicas que tienen efecto fitoestrogénico, la chalcona xantohumol es la más abundante en una concentración de 0.01-0.5% en el fruto fresco (Milligan et al., 1999)

c. Levadura: Proviene del latín “*levare*” que significa “levantar”, son organismos eucariotas, unicelulares pertenecientes a los *ascomicetos*, tienen forma redondeada u ovalada con diámetro de 5–10 micras (Dickinson, 2004, Bamforth, 2004, Gonzalez, 2017). La composición macromolecular de las levaduras incluyen proteínas (40-50% del peso seco), glicoproteínas, polisacáridos, polifosfatos, lípidos y ácidos nucleicos (Suárez-Machín et al., 2016, Otero et al., 2000).

La especie *Saccharomyces cerevisiae* deriva su nombre del vocablo *Saccharo* (azúcar), *myces* (*Hongo*) y *cerevisiae* (*Cerveza*). Es una levadura heterótrofa, con alto poder fermentativo, obtiene su energía de la glucosa (Suárez-Machín et al., 2016, Otero et al., 2000). Tienen amplio uso industrial en la panificación y en la elaboración de vinos, cerveza y otras bebidas alcohólicas (Suárez-Machín et al., 2016).



Las levaduras usadas para la producción de cerveza se dividen en dos grupos: Levadura alta o “de fermentación alta” y la levadura baja o “de fermentación baja”. Las levaduras altas como *Saccharomyces cerevisiae* son aquellas que pueden flocular y flotar formando una nata hacia el final de la fermentación, este tipo son comunes para cervezas tipo *ale*. La levadura baja como *Saccharomyces carlsbergensis* son aquellas que floculan y se hunden en el fermentador para cervezas tipo *lager* (SECA, 2016, García et al., 2004, Briggs, 2004). La utilización de otras cepas de levaduras pueden producir sabores desagradables, acidez excesiva, formar películas en la superficie y turbiedad en el producto final (García et al., 2004). La producción de etanol se da por conversión de hexosas, según la siguiente ecuación:



La velocidad de fermentación alcanza su máximo nivel a las 15 horas, es decir que para obtener una concentración final de alcohol entre 6 al 7 % de volumen son necesarias 24 a 30 horas de fermentación (Gonzalez, 2017, Suárez-Machín et al., 2016).

1.1.3.2 Fabricación de la Cerveza

La cebada destinada para la elaboración de cerveza recibe un pretratamiento de secado y tostado que se conoce como malteado, este procedimiento determina el color de la cerveza a preparar (SECA, 2016). El agua empleada en la producción de la cerveza debe ser potable y disponer de sistemas de control de calidad que garanticen su pureza. La selección de las materias primas deben estar a cargo de personas que puedan hacer la elección adecuada del producto, rechazando aquellos lotes que presenten contaminantes o en mal estado (SECA, 2016, Yepes, 2007). Los pasos que se deben seguir para la fabricación de la cerveza son: Maceración y formación del mosto, filtración, cocción y enfriamiento del mosto, fermentación, maduración y envasado que se detallan a continuación.

a. Pretratamiento de la cebada: Secado y tostado

Este proceso se emplea para la obtención de la malta y consiste en someter a la cebada a una primera fase de secado a baja temperatura para disminuir el contenido de agua del grano germinado y una segunda fase de tostado en el que se somete al grano seco a temperaturas más elevadas. Según el tipo de cerveza que prepare



dependerá la temperatura a la que se somete, siendo la mínima entre 80-85 °C para cervezas claras y entre 100-150 °C para cervezas oscuras (IICA, 2000, SECA, 2016).

Los granos de cebada tienen un bajo contenido de azúcares fermentables que se incrementan durante el malteado pues este proceso provoca un aumento de enzimas amilolíticas que degradan el almidón del mosto generando azúcares fermentables disponible para la fermentación (García et al., 2004). La principal característica de una cebada cervecera es germinar durante el malteo; aquellas que no germinan no producen enzimas fundamentales para hidrolizar componentes durante la sacarificación (SECA, 2016, Suárez-Machín et al., 2016).

b. Maceración de la malta y formación del mosto

Este proceso consiste en el desdoblamiento del almidón y proteínas en maltosa y aminoácidos para dar melanoidinas. Algunos cerveceros en esta etapa utilizan adjuntos que son cereales crudos como arroz y maíz, que han sido adicionados con la finalidad de aumentar la concentración de azúcares fermentables (IICA, 2000, SECA, 2016).

El almidón es hidrolizado por dos enzimas principalmente, la α -amilasa y la β -amilasa. La α -amilasa es una endoenzima que hidroliza enlaces alejados de los puntos de ramificación y como producto se obtienen dextrinas y oligosacáridos, su temperatura óptima es de 70 °C (Hornsey, 2003). La β -amilasa es una exoenzima que actúa en los extremos no reductores de la cadena liberando maltosa y dextrinas, su temperatura óptima es de 60 °C (Figura 1) (García et al., 2004).

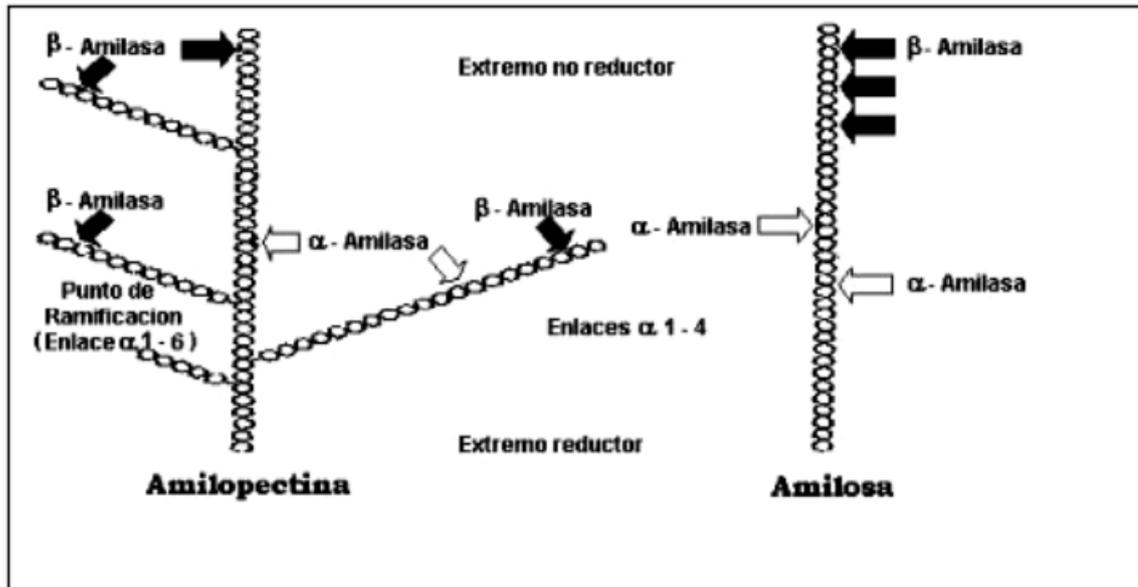


Figura 1. Estructura del almidón y zonas de acción de las enzimas amilasas

Fuente: Kunze et al. (1996)

Para dar inicio a la maceración se deja la malta en contacto con el agua para que se hidrate de 20 a 60 minutos. Las etapas de este proceso se detallan a continuación:

- **Peptonización a 45°C:** Consiste en la activación de la peptidasa que forma aminoácidos y péptidos simples. Además se activa la fitasa que incrementa la liberación del fósforo de los compuestos orgánicos, demora de 10 a 60 minutos.
- **Formación de azúcares:** Inicialmente, se forma la maltosa a 55-62.5°C y se inactiva la β-amilasa. Luego, a 67-74° se incrementa la actividad de la α-amilasa dando resultado gran cantidad de dextrinas en un lapso de 30-60 minutos.
- **Estabilización de masa 74-77.5 °C:** Se inactivan parcialmente las enzimas, se aplica esta temperatura por un lapso de 5-10 minutos. Este paso determina la viscosidad del mosto durante la filtración (Hornsey, 2003, SECA, 2016).

En base a esto, si se favorece la acción de la α-amilasa (altas temperaturas) se obtendrán altas cantidades de dextrinas en el mosto lo que generaran alta densidad y estabilidad de espuma; mientras que si se favorece la acción de β-amilasa (bajas temperaturas) tendrá abundantes azúcares fermentables y por lo tanto un alto contenido de alcohol en la cerveza (García et al., 2004, Hornsey, 2003).



c. Filtración del mosto

El producto final de la maceración es el mosto y el bagazo. El mosto está constituido por componentes solubles como azúcares, dextrinas, sustancias minerales y proteínas y el bagazo contiene los compuestos insolubles como almidón, celulosa y proteínas de alto peso molecular (SECA, 2016, IICA, 2000).

La filtración se realiza en dos pasos. El primer paso es escurrir el mosto del bagazo y el segundo paso es lavar el bagazo con agua a 78 °C para recuperar todo el extracto soluble retenido. El pH de 4.1-4.9 del agua de lavado juega un papel fundamental para evitar el arrastre de compuestos indeseados como taninos, compuestos amargos de la cáscara, ácido sílico que van a afectar la calidad de la cerveza (IICA, 2000, Priest and Stewart, 2006).

d. Cocción del Mosto

El proceso de cocción demora aproximadamente 2 horas. La cocción estabiliza el mosto tanto enzimática como microbiológicamente. Su objetivo es detener el proceso enzimático durante la fermentación y evitar turbiedad en la cerveza (Castillo A., 2014, SECA, 2016). La ebullición favorece la coagulación de las proteínas que se da en dos fases. La primera es la desnaturalización mediante la ruptura de puentes de hidrogeno pasando de hidratado a deshidratado. La siguiente fase es la coagulación mediante la formación de micelios deshidratados. El pH final es de 5.3 (Hornsey, 2003).

En este paso, el mosto aumenta su coloración por la formación de melanoidinas y por la oxidación de taninos. La isomerización de las isohumulonas del lúpulo de sabor liberan el amargor característico de la cerveza (Hornsey, 2003). Los lúpulos de aroma son volátiles por lo que deben ser agregados en los últimos minutos de la cocción del mosto para conservar sus propiedades aromáticas (SECA, 2016). Los polifenoles que forman parte de la composición del lúpulo intervienen en la floculación, en el cuerpo y amargor de la cerveza (IICA, 2000).

e. Enfriado del mosto

La levadura ejerce su poder fermentativo a bajas temperaturas, por lo que finalizada la cocción del mosto se debe enfriar rápidamente (SECA, 2016). Visualmente se aprecia que el mosto se enturbia cuando se enfría hasta 20°C. Para que se continúe con la



fermentación se debe suministrar aire a la levadura cuando el mosto está frío. Si el suministro de aire se da en el mosto caliente éste se oxida disminuyendo la actividad enzimática indispensable para la fermentación (Castillo A., 2014).

f. Fermentación

Químicamente el mosto debe contener aminoácidos, ácidos grasos, azúcar y oxígeno. (Baxter, 2001). La fermentación está a cargo de las enzimas de la levadura cuando toman contacto con el mosto rico en azúcares que serán convertidos en etanol y dióxido de carbono (SECA, 2016, Otero et al., 2000). Las levaduras luego de ser sometidas a la cocción utilizan energía de reserva celular antes de acostumbrarse al nuevo ambiente. Al tener una alta concentración de azúcar inician con la fermentación, consumen el oxígeno del aire disuelto y ayudan a las mitocondrias a recuperar su energía lo que permite propagarse por gemación (Hornsey, 2003).

Una vez que se agota el oxígeno del medio y que la cantidad de azúcares fermentables han disminuido, la levadura comienza a flocular debido a la saturación de etanol y de dióxido de carbono depositándose al fondo del tanque. Estos compuestos actúan como venenos celulares, lo que dará lugar a un proceso de autólisis (Baxter, 2001). La levadura debe ser retirada para evitar contaminación del producto por descomposición celular que influyen sobre las características organolépticas de la cerveza (Hornsey, 2003).

g. Maduración

La maduración se refiere al tiempo en que la cerveza es contenida en los tanques de fermentación cerrados herméticamente para evitar la salida del gas. Todo este conjunto evita la oxidación y facilita la clarificación del producto (SECA, 2016, IICA, 2000). El objetivo en esta etapa es dejar que sedimente la materia amorfa que se produce por la fermentación. Además permite la refinación del sabor mediante la volatilización de sustancias no deseadas y la formación de espuma (SECA, 2016, IICA, 2000).

La temperatura óptima de maduración es de 0–3 °C y si supera esta temperatura se da proceso a la autólisis de la levadura (Baxter, 2001). El tiempo de maduración óptimo es de 3 a 4 semanas, pues si es menor se obtendrán sabores desagradables y



concentrados, sin clarificado del producto. En cambio, si el tiempo es muy prolongado el sabor se suaviza, pierde cuerpo y amargor.

h. Filtración y envasado

Se realiza esta filtración con el objeto de eliminar todos los restos suspendidos que puedan producir turbiedad en la cerveza embotellada. Este proceso no se realiza en el caso de cervezas artesanales debido a que, en su mayoría, no se expende como producto embotellado sino que son servidas directamente al vaso. En otros casos, algunos cerveceros prefieren embotellar sus productos en vidrio color ámbar (SECA, 2016). En el caso de cervezas expeditas en botellas pueden ser sometidas a pasteurización sometiéndola a una temperatura de 70 °C (IICA, 2000).

1.1.3.3 Control de calidad de la cerveza

La calidad de la cerveza está basada en la ausencia de aspectos indeseables en el producto final (SECA, 2016). El impacto a nivel sensorial en el consumidor tanto en el gusto, sabor y color hacen que un producto sea deseado o rechazado. La alteración de la cerveza puede deberse a la calidad de materias primas utilizadas, proceso de elaboración y malas condiciones de almacenamiento del producto final.

Para valorar la calidad de la cerveza se utilizan parámetros fisicoquímicos tales como color, turbiedad, acidez total, grado alcohólico y pH, así como parámetros microbiológicos como determinación de aerobios mesófilos y de mohos y levaduras (Arias, 1991, INEN, 2013).

a. Control Físico-químico

Color: Está determinado por el tostado del cereal que se utiliza para su fabricación, mientras más tostado mayor intensidad de color, pudiendo ir desde el color dorado pálido hasta el marrón oscuro casi negro (Castillo A., 2014, Gonzalez, 2017). El pH de la cerveza es típicamente ácido; sin embargo, una mala conservación puede llegar a neutralizarla e incluso alcalinizarla. Este proceso da lugar a una serie de reacciones en cadena, donde los hemiacetales pasan a su forma carbonilo de azúcares reductores (aldehídos y cetonas reactivas). Éstos se unen con proteínas, péptidos y aminoácidos y se condensan dando paso a la reacción de Maillard, que oscurece el

producto a un color marrón e indica el inicio de la enolización de la glucosamina (Hornsey, 2003).

La European Brewer Convention (EBC) estableció una escala de color para evitar errores de apreciación al momento de determinar el color de la cerveza, malta y caramelo. Esta escala de colores está asignada por números que van del 1 al 100, partiendo desde el color amarillo pálido hasta el marrón negro. Por ejemplo, según la EBC la cerveza lager, sea esta blanca o rubia, tiene un color entre 8.0 y 10.0 EBC (Figura 3) (EBC, 1966, Baxter, 2001).

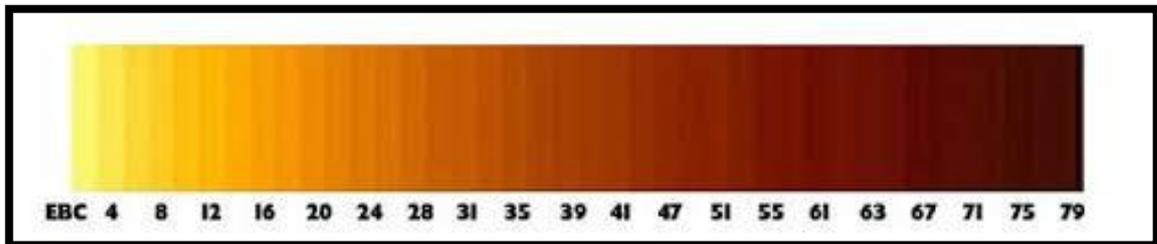


Figura 2. Escala de colores de la European Brewer Convention

Fuente: European Brewer Convention, (EBC, 1966)

Grado alcohólico: Es la relación entre el volumen del alcohol etílico y el volumen total de la mezcla hidroalcohólica medidas a una temperatura de 20°C. Se expresa en fracción volumétrica (%) (INEN, 2013). La clasificación de la cerveza según el grado alcohólico se presenta en la Tabla 1.

Tabla 1. Clasificación de cerveza por grado alcohólico

Tipo de Cerveza	Grado alcohólico (%)	Referencia
Sin alcohol	<1.0	(SECA, 2016)
Lager	4.0 a 5.0	(SECA, 2016)
Pilsen lager	3.0 a 6.0	(SECA, 2016)
Bitter	3.0 a 7.0	(Cervebel, 2012)
IPA (Indian Pale Ale)	5.0 a 7.0	(Cervebel, 2012)
Double	6.5 a 9.0	(Baxter, 2001)
Dark barley o negras	8.0 a 12.0	(SECA, 2016)

pH: La composición de sales propia del agua utilizada en la producción determina el pH del mosto y de la cerveza. Si el pH es elevado, la sacarificación es deficiente debido a la poca actividad enzimática, coagulación proteica débil y el sabor se vuelve



más amargo y astringente por el incremento de taninos y además de crecimiento microbiológico indeseable (Hornsey, 2003).

Espuma: Corresponde a la dispersión de burbujas de gas de dióxido de carbono y materias sólidas suspendidas en el seno de un líquido viscoso que se forman por la adsorción de moléculas reactivas en la interface gas-líquido (Hornsey, 2003). La presencia de espuma en la cerveza es un indicador de calidad para quien la consume. La formación de espuma está dada por la interacción entre proteínas de alto peso molecular de la malta y las isohumulonas del lúpulo, es decir, mientras menor sea la relación entre la malta y el lúpulo menor será la espuma generada (Castillo A., 2014).

Turbiedad: La pérdida de brillo, descenso de la transparencia, alto grado de enturbiamiento, floculación, precipitación y sedimentación son parámetros en cadena que indican la inestabilidad química de la cerveza. Las causas de la turbiedad de la cerveza pueden ser de origen biológico, coloidal y químico. Esta última se produce por sales insolubles producto de la actividad enzimática deficiente (IICA, 2000, SECA, 2016, Yepes, 2007).

- *Turbiedad biológica:* Factores como la concentración de alcohol, la ausencia de oxígeno y el pH ácido impiden el crecimiento de bacterias cuando el producto es estable. Sin embargo, la contaminación microbiológica se da por aporte de la materia prima, levaduras salvajes del medio y por mala manipulación del producto a lo largo de la producción (Martínez, 2015, Hornsey, 2003).
- *Turbiedad coloidal:* Los coloides que están presentes en la cerveza tienden a coagular y formar estructuras cada vez más grandes provocando el enturbiamiento y precipitado en la cerveza. Este proceso se favorece por pH básicos, proteínas de la cebada como la prolina, sustancias orgánicas como los taninos y por exposición a la luz. Se distinguen dos tipos: la turbiedad fría que es cuando la cerveza es enfriada a 0°C aparece un enturbiamiento que desaparece luego de atemperarse, y la turbiedad permanente que desaparece la turbiedad cuando se somete a calentamiento a 70°C y reaparece cuando baja la temperatura (Hornsey, 2003, SECA, 2016).



b. Control microbiológico

La cerveza dispone de factores antimicrobianos como el pH ácido, elevada concentración de dióxido de carbono, etanol y lúpulo, que le dan una potente actividad antimicrobiana contra bacterias grampositivas. Los α -ácidos del lúpulo actúan como ionóforos que regulan el pH a través de la membrana citoplasmática de las bacterias disminuyendo la fuerza protónica, por lo que la bacteria no puede incorporar nutrientes y muere. Cuando el producto está alterado no dispone de este mecanismo de defensa (Priest and Campbell, 1999, Hill, 2015).

La presencia de microorganismos se da por la malta contaminada o por la mala manipulación del operador durante la producción. Las bacterias que han sido aisladas e identificadas en la cerveza son: *Acetobacter spp.*, *Bacillus spp.*, *Brevibacillus spp.*, *Clostridium spp.*, *Gluconobacter spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Megasphaera spp.*, *Pectinatus spp.*, *Pediococcus spp.*, *Selenomonas spp.*, *Zymomonas spp.*, *Zymophilus spp.*, y Enterobacterias. De éstas, algunas cepas de *Lactobacillus* y *Pediococcus* son resistentes al lúpulo. En particular, las cervezas de producción artesanal han presentado contaminación por *Bacillus cereus* y *Bacillus licheniformis* (Hill, 2015, Priest and Campbell, 1999).

1.2 MICOTOXINAS

1.2.1 Concepto

La palabra micotoxina proviene del griego *mico* que significa hongo y *toxicum* que significa veneno (Wood, 1992, Soriano del Castillo, 2007). Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por diferentes géneros y especies de hongos que colonizan y contaminan sustratos que son utilizados en la alimentación humana y animal (Duarte Vogel and Villamil Jiménez, 2006, Requena et al., 2005).

Las micotoxinas son generadas por mohos que han alcanzado un grado de diferenciación bioquímica, fisiológica y morfológica. Los hongos utilizan metabolitos primarios como proteínas, carbohidratos y lípidos para su crecimiento. Entre el final de la fase exponencial y el inicio de la fase estacionaria se producen las micotoxinas como metabolitos secundarios (Figura 4) (Soriano del Castillo, 2007).

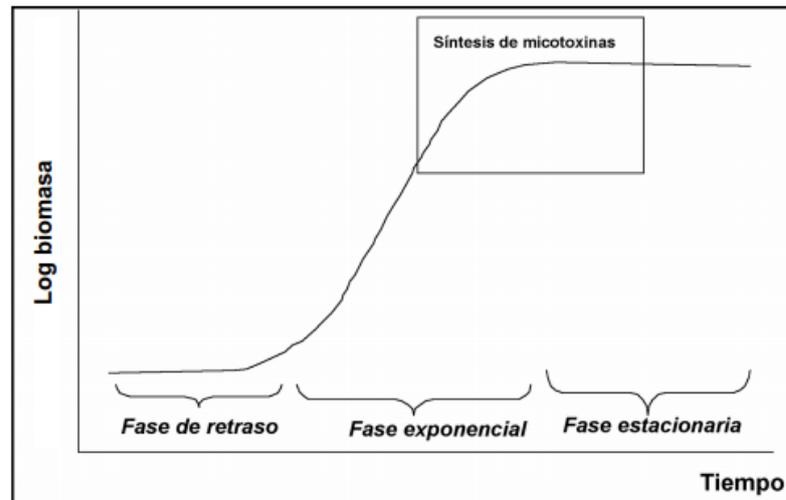


Figura 3. Fases de crecimiento fúngico y localización de la síntesis de micotoxinas

Fuente: (Soriano del Castillo, 2007)

La cantidad que se produzca depende de parámetros nutricionales y ambientales en las que crece el hongo. Los alimentos actúan como sustratos que favorecen el crecimiento de los hongos, siendo algunos alimentos más óptimos que otros. Aunque un alimento no presente cambios en su apariencia, olor o sabor estos pueden estar contaminados con micotoxinas (FAO, 2010). Por el contrario, no todos los hongos son productores de micotoxinas, ni todos los granos contaminados son tóxicos (Soriano del Castillo, 2007).

1.2.2 Efectos nocivos de las micotoxinas

El consumo de alimentos contaminados con micotoxinas trae consecuencias graves para la salud humana y animal. Los efectos producidos varían según el tipo de micotoxina consumida. Entre las principales alteraciones fisiológicas asociadas con las micotoxinas están el cáncer, hemorragias, depresión del sistema inmune, tumores, abortos, defectos de nacimiento, problemas digestivos y diarreas. Cabe destacar, que su mayor efecto patógeno se da en niños debido a que están en fase de crecimiento y maduración de los órganos depuradores, riñón e hígado, lo que favorece el potencial destructivo de la toxina. De hecho, sus efectos pueden pasar desapercibidos siendo evidente el daño producido cuando llegan a la adultez (Duarte Vogel and Villamil Jiménez, 2006, FAO, 2010).



1.2.3 Micotoxinas en Cerveza

La cerveza es propensa a la contaminación por micotoxinas al ser un producto derivado de cereales como la cebada, avena, trigo, maíz y arroz. La mala manipulación durante el almacenamiento a gran escala y el transporte a largas distancias contribuyen al desarrollo de hongos. El punto crítico para la contaminación es debido al uso de cereales adicionales crudos con el objeto de aumentar la cantidad de azúcares fermentables (Ikalafeng, 2008).

En la tabla 2 se detallan las micotoxinas aisladas e identificadas en la cerveza.

Tabla 2. Micotoxinas, hongos y afecciones en animales y humanos

Micotoxinas	Hongos	Afecciones	Referencia
Deoxynivalenol	<i>Fusarium graminearum</i> <i>Fusarium culmorum</i> <i>Cephalosporium spp</i> <i>Trichoderma spp</i> <i>Trichothecium spp</i>	Inhibidor de síntesis proteica.	(Piacentini et al., 2017, Harcz et al., 2007, Anselme et al., 2006)
Zearalenona	<i>Fusarium graminearum</i> <i>Fusarium sporotrichioides</i>	Efectos estrogénicos, vómitos y muerte.	(Ikalafeng, 2008, Pascari et al., 2017, Rubert et al., 2013)
Ocratoxina	<i>Aspergillus ochraceus</i> subgenus <i>Circundati</i> , <i>Aspergillus carbonarius</i> , <i>Penicillium verrucosum</i> y <i>P. viricatum</i>	Nefrotóxico y hepatotóxico	(Anselme et al., 2006, Aresta et al., 2006, Bellver Soto et al., 2014, Chu et al., 1975, Mateo et al., 2007)
Aflatoxinas	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. nomius</i> , <i>A. parasiticus</i>	Cáncer hepático, se excreta por la leche materna como aflatoxina M1, pasa al feto.	(Mably et al., 2005, Mateo et al., 2011, Bauer et al., 2016, Odhav and Naicker, 2002, Pascari et al., 2017)
Fumonisin	<i>Fusarium proliferatum</i> <i>Fusarium verticillioides</i>	Cáncer hepático, nefrotóxico y hepatotóxico	(Kawashima et al., 2007, Piacentini et al., 2017, Pietri et al., 2010)



1.3 OCRATOXINA A

1.3.1 Generalidades

La Ocratoxina A (OTA) fue aislada por primera vez en 1965 en Sudáfrica a partir de cultivos de *Aspergillus ochraceus* en cereales y legumbres, y de ahí nace su nombre (Soriano del Castillo, 2007). Las ocratoxinas son metabolitos secundarios tóxicos producidos por especies de hongos filamentosos superiores de los géneros *Penicillium* y *Aspergillus*, capaces de crecer sobre una amplia gama de sustratos orgánicos como vegetales particularmente cereales, café, derivados como el pan y alimentos de origen animal (Skarkova et al., 2013, Ravelo et al., 2011). Es considerada la micotoxina más frecuente en la contaminación de granos de cereales en climas templados y fríos (Bellver Soto et al., 2014).

1.3.2 Composición química

La Ocratoxina A tiene una composición química de 7-carboxi-5-cloro-8-hidroxi y un anillo -3,4-dihidro metilisocumarina enlazada por un grupo carboxilo y por un enlace tipo amida a una molécula de L-fenilalanina (Figura 5) (CAC, 2015). Es incolora, soluble en solventes orgánicos polares, poco soluble en agua, tiene características de ácido débil y emite fluorescencia al ser excitada con luz ultravioleta (Ravelo et al., 2011, Maaroufi et al., 2016, Schrenk and Cartus, 2017).

A más de la ocratoxina A, existen otros tipos de ocratoxina, el tipo B que se caracteriza por ser un derivado no clorado de la OTA y es menos tóxica, y la ocratoxina C que es un éster de la OTA que carece de potencial tóxico. La más importante de las ocratoxinas es la ocratoxina A al ser contaminante natural en productos vegetales y por su elevada toxicidad (Ravelo et al., 2011, CAC, 2015).



especie como el caso del *Aspergillus ochraceus* no supera el 50% a diferencia del *Aspergillus carbonarius* que alcanza el 100% (Soriano del Castillo, 2007). Para *Aspergillus niger*, las colonias son de color marrón oscuro, por tener conidios negros les proporciona protección contra el sol y los rayos ultravioletas manteniendo estable su morfología (Rodríguez, 2008, Soriano del Castillo, 2007).

1.3.4 Toxicidad

OTA es una micotoxina neurotóxica, nefrotóxica, inmunosupresora, genotóxica, carcinógena y teratógena que contamina alimentos de consumo humano. OTA ha sido clasificada dentro del grupo 2B de posibles cancerígenos según IARC (Requena et al., 2005, Soriano del Castillo, 2007, Martínez and Larrañaga, 2012, IARC, 2013). La ocratoxina A fue asociada en 1950 con la nefropatía endémica de los Balcanes que se manifiesta en insuficiencia renal crónica bilateral asociada a uroteliomas y carcinoma renal (López de Cerain et al., 2000, Pfohl-Leskowicz and Manderville, 2007).

La nefrotoxicidad generada por consumo de ocratoxina A presentan síntomas como: poliuria, glucosuria, proteinuria y enzimuria. Esto se explica por el daño en el túbulo contorneado proximal y la disminución de la tasa de filtración glomerular. La ocratoxina aumenta el pH de la orina por la inhibición de la reabsorción de HCO₃⁻ en los túbulos. Se debe considerar que la intensidad de los síntomas es directamente proporcional a la dosis que se consume y al tiempo de exposición (López de Cerain et al., 2000). La genotoxicidad producida por esta micotoxina afecta a los testículos formando aductos con el ADN, lo que epidemiológicamente se evidencia con cáncer testicular (Ravelo et al., 2011, Pfohl-Leskowicz and Manderville, 2007).

La Ocratoxina A ejerce su toxicidad mediante los siguientes mecanismos de acción:

a. Alteración de la respiración celular

Actúa por inhibición competitiva con la actividad de la ATPasa, la succinato deshidrogenasa y la citocromo C oxidasa lo que genera radicales hidroxilados por peroxidación lipídica, produciendo daño celular irreversible (Ravelo et al., 2011, Dopp et al., 1999).



b. Alteración de síntesis de proteínas

Se da a nivel post-transcripcional por inhibición competitiva de la Phe-ARNt sintetasa, induciendo la actividad de la caspasa y la poteincinasa que altera la síntesis de ADN (Størmer and Lea, 1995, Höhler, 1998).

c. Secuestro de calcio microsomal

Está ligado a la peroxidación lipídica. En estudios in-vitro, OTA inhibe el bombeo y captación de calcio a través del retículo endoplasmático del hepatocito en un 40% (Dopp et al., 1999).

d. Inmunotoxicidad

Se evidencia por la reducción en la producción de IL-2 y de la expresión de sus receptores, disminución de macrófagos, de IL-1, del factor de necrosis tumoral y de células natural killer (López de Cerain et al., 2000).

1.3.5 Ocratoxina A en cereales y productos derivados

La principal fuente de exposición para seres humanos y animales a esta micotoxina son los cereales, sin descartar su presencia en otros alimentos como granos de café, cacao, carne, uvas, pasas, legumbres, alimentos infantiles e incluso en bebidas alcohólicas como vino y cerveza (Bellver Soto et al., 2014, Ravelo et al., 2011) .

La presencia de OTA en los cereales se debe fundamentalmente a las malas condiciones de cosecha y almacenamiento del grano, operaciones de desecación incompletas, altos niveles de humedad y temperaturas óptimas medioambientales contribuyen al crecimiento de hongos y por tanto favorecen la contaminación del alimento (Volkova, 2013, Kabak, 2009). Cuando el contenido de humedad supera el 14% durante la cosecha produce un aumento en la concentración de ocratoxina, esto se ha comprobado tanto en la cebada y maíz. En el caso del arroz silvestre, estimula la producción de ocratoxina debido a la alta concentración de proteínas y aminoácidos en comparación con el arroz blanco (Kabak, 2009, Soriano del Castillo, 2007).

En el caso particular de la cerveza, la presencia de ocratoxina se da por contaminación en la materia prima como la malta de cebada o la mezcla de cereales utilizados para producir el mosto durante la elaboración de la cerveza (Aresta et al., 2006, Volkova, 2013). El lúpulo por su actividad antimicrobiana, la cocción del mosto y la fermentación pueden disminuir significativamente la concentración de la toxina. Sin



embargo, estudios han demostrado que no se elimina totalmente y puede estar presente en el producto final en concentraciones significativas (Wu et al., 2011, Vaclavikova et al., 2013, Běláková et al., 2011, Aresta et al., 2006).

1.3.6 Técnicas de determinación de OTA en cerveza

Los métodos para la determinación y cuantificación de ocratoxina tienen por objeto obtener los valores de detección lo más bajos posibles (Ravelo et al., 2011). Las técnicas más utilizadas son cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), cromatografía en capa fina y cromatografía de intercambio iónico debido a su alta eficiencia (Aresta et al., 2006, Ravelo et al., 2011).

Actualmente, existen técnicas combinadas que consisten en la purificación del extracto mediante el uso de columnas de inmunoafinidad y por HPLC en fase reversa y resultan más sensibles y precisas (Visconti et al., 2000, Skarkova et al., 2013, Lasram et al., 2013). Las técnicas pueden combinarse con otros métodos avanzados tales como espectrometría de masas, ELISA, inmunosensores nanoestructurados piezoeléctricos, bioensayos con *Artemia salina* para detección de metabolitos fúngicos (Ravelo et al., 2011).

1.3.7 Legislación para Ocratoxina A

Las legislaciones existentes para ocratoxina fijan niveles máximos admisibles que no pongan en riesgo la salud del consumidor. Para establecer estos límites es necesario hacer análisis de riesgos para determinar la inocuidad de los alimentos que más se consumen.

1.3.7.1 Nacional

El Instituto Nacional Ecuatoriano de Normalización (INEN) no dispone de una norma oficial para la determinación de OTA. El INEN dispone de revisiones basadas en normas ISO (INEN, 2013). Sin embargo, de las normas disponibles se cuenta con lo siguiente: para granos de café tostado (INEN 1123) cuyo valor máximo permitido para OTA es de 5 µg/kg; para cereales y derivados (INEN 2945) cuyo límite máximo es de 3 µg/kg; para bebidas alcohólicas (INEN 374) el nivel máximo es de 2 µg/kg.

En la actualidad, la normativa nacional no contempla un nivel máximo permitido para micotoxinas en la cerveza pasteurizada y no pasteurizada. Sin embargo, al ser la



cerveza un derivado de la cebada se podría considerar el límite máximo como 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (INEN, 2013).

1.3.7.2 Internacional

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) es la principal entidad en comunicar las diferentes legislaciones, incluyendo micotoxinas en alimentos y productos derivados, a nivel mundial (FAO, 2010). El Comité FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) ha recomendado una ingesta semanal tolerable de OTA de 100 ng/kg de peso corporal, correspondiente a aproximadamente 14 ng/kg de peso corporal de ingesta diaria (Varelis et al., 2006, Monaci and Palmisano, 2004, Ravelo et al., 2011). La Unión Europea (EU) y la JECFA han fijado valores límite de 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para cereales sin procesar y de 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en cereales procesados (FAO, 2010). Este último valor suele ser el límite máximo de OTA en cerveza referido en varias publicaciones (Mateo et al., 2007, Visconti et al., 2000, Wu et al., 2011, Tangni et al., 2002).



2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Tipo de estudio

El presente estudio fue de tipo descriptivo de corte transversal, que incluyó la evaluación de la calidad fisicoquímica y microbiológica de la cerveza artesanal y la determinación de la inocuidad del producto por contaminación con ocratoxina A.

2.2 Área de estudio

Este estudio se realizó en el Centro Histórico de la ciudad de Cuenca. Para identificar los lugares de expendio de cerveza artesanal se aplicaron encuestas en diversos lugares con el fin de definir la presentación (embotellada o al granel), producción propia o no, tipos de cerveza de expendio y la cerveza de preferencia por los consumidores; así como también identificar los lugares que servirían como puntos de muestreo (Anexo 1). Dichos lugares fueron bares, licorerías, supermercados, galerías, entre otros.

Todos los análisis posteriores al muestreo fueron procesadas con el apoyo de las instalaciones, materiales y reactivos del laboratorio de Grupo de Investigación "Alimentación, Nutrición y Salud" del Departamento de Biociencias de la Universidad de Cuenca.

2.3 Muestreo, tamaño de la muestra y recolección de la muestra

2.3.1. Muestreo

El muestreo se realizó a partir de los resultados de la encuesta antes mencionada. La unidad muestral fue el tipo de cerveza. Se identificaron 12 lugares de expendio directo de cerveza artesanal en vaso y 2 marcas embotelladas, de donde se recolectaron 3 tipos de cada lugar: una rubia, una roja y una negra. En total, se recolectaron 42 muestras de cervezas. La toma de muestras se realizó en el mes de octubre de 2017.

En la tabla 3 se detalla los bares donde se recolectó la muestra.



Tabla 3. Lugares seleccionados para muestreo de cerveza artesanal en la ciudad de Cuenca

Nº	Lugar	Tipo de Cerveza	Presentación
1	Curuchupa	Rubia Roja Negra	Granel o vaso
2	The Pub	Rubia Roja Negra	Granel o vaso
3	Golden Prague	Rubia Roja Negra	Granel y botella
4	Latitud Cero	Rubia Roja Negra	Botella
5	Inca Bar	Rubia Roja Negra	Granel o vaso
6	Jodoco Belgian Brew	Rubia Roja Negra	Granel o vaso
7	Beer Factory	Rubia Roja Negra	Granel o vaso
8	La Compañía	Rubia Roja Negra	Granel o vaso
9	Bar Far Out	Rubia Roja Negra	Granel o vaso
10	Father & Son	Rubia Roja Negra	Granel o vaso
11	Piazza Cadillac	Rubia Roja Negra	Granel o vaso
12	Nórdica	Blanca Rubia Negra	Botella
13	4 Ríos	Rubia Roja Negra	Granel o vaso
14	Becken	Rubia Roja Negra	Granel o vaso



2.3.2. Toma de la muestra

De cada cerveza se tomó una muestra equivalente a una porción. Para el caso de la cerveza artesanal expedida al granel, la porción mínima fue 500 mL; mientras que para la cerveza embotellada fue de 330 mL. Las muestras fueron divididas en 3 porciones en recipientes etiquetados y esterilizados para análisis físico-químico, microbiológico y toxicológico. Las muestras fueron almacenadas a una temperatura de 2-8 °C hasta el momento de su procesamiento (Jorgensen, 1998, Wu et al., 2011, Visconti et al., 2000)

2.3.3 Pretratamiento de la muestra

Las muestras de cerveza artesanal fueron degasificadas para proceder a los análisis de laboratorio subsecuentes (INEN, 2013). Para esto, se toma el envase etiquetado de la cerveza con la prueba a realizarse y se coloca directamente en el agitador horizontal (Advanced digital shaker, VWR, 3500, USA) durante 60 minutos a 200 rpm y luego se colocó en el baño ultrasónico a temperatura ambiente (Branson, 3510R-DTH, USA) por 30 minutos más (Scott and Kanhere, 1995, Visconti et al., 2000).

2.2 Determinación de ocratoxina A

2.2.1 Fundamento

La determinación de OTA se realizó mediante extracción en fase sólida (SPE) de la toxina, utilizando cartuchos de inmunoafinidad, cuantificación por HPLC en fase reversa y detección por fluorometría.

2.2.2 Equipos, materiales y reactivos

Equipos

- Centrífuga refrigerada (Hettich, mikro 220R, Alemania)
- Manifold (Waters, 20 positions, USA)
- Purificador de agua (Barnstead, D11931, USA)
- Bomba de vacío (Heidolph, D-91126, Alemania)
- Generador de nitrógeno (Dominick hunter, G4510W, Inglaterra)
- Refrigerador (Indurama, FI-425, Ecuador)
- Cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC) con bomba cuaternaria, automuestreador y detector de fluorescencia (FLD) (Agilent technologies, 1200, USA)



- Columna cromatográfica Zorbax Eclipse C₁₈ (250 x 4.6 mm, 5 µm) (Agilent technologies, USA)

Reactivos

- Solución buffer de fosfato (pH 7.4) (Sigma Aldrich, USA)
- Cartuchos de inmunoafinidad "Ochraprep"(R-Biopharm, Rhone LTD, Escocia)
- Metanol grado HPLC (Sigma Aldrich, Canadá)
- Acetonitrilo grado HPLC (Sigma Aldrich, Francia)
- Ácido acético glacial anhydrous (Merck, Alemania)
- Agua ultrapurificada
- Estándar de ocratoxina A (extracto seco de *Aspergillus ochraceus*) (Sigma Aldrich, CasNº303-47-9, USA)

Materiales

- Tubos cónicos 50 mL
- Pipetas pasteur
- Gradillas
- Vasos de precipitación de 100 mL
- Viales de HPLC
- Filtros de membrana de PTFE de 13 mm de diámetro y 0.45 µm de tamaño de poro

2.2.3 Extracción en fase sólida con cartuchos de inmunoafinidad

Se toman 30 mL de cerveza degasificada, se adicionan 15 mL de solución buffer de fosfato (pH 7.4) y se agita vigorosamente. La mezcla se centrifuga a 3000 rpm (820 g) durante 10 minutos a una temperatura de 5-10 °C y el sobrenadante representa la muestra a aplicarse en los cartuchos de inmunoafinidad (IAC) (Anselme et al., 2006, Tangni et al., 2002). Antes de aplicar la muestra, los IAC deben estar adaptados a una cámara de vacío (manifold) y acondicionados mediante un prelavado con 3 mL de solución buffer de fosfato (pH 7.4). Sin dejar secar el IAC, se aplican 30 mL del sobrenadante (equivalente a 20 mL de la muestra de cerveza) y se deja pasar por gravedad (alrededor 1 ml/min). Una vez que pasa todo este volumen, se realiza un post-lavado de la columna con 20 mL de agua a una velocidad de 5 ml/min, seguido de un vacío durante 5 segundos para eliminar todo el líquido de lavado del cartucho. Para la elución de la micotoxina retenida en el IAC se agregan 1.5 mL de una mezcla de metanol/ácido acético en una proporción 98:2 (v/v). Se realiza un backflushing con ayuda de una jeringa y se deja pasar por gravedad. El eluido se recoge en un tubo de vidrio pequeño y con ayuda de la misma jeringa se pasa aire a través de la IAC para



recolectar hasta la última gota. Finalmente se lava la columna con 1 mL de agua ultrapurificada (0.5 mL x 2). El volumen final de eluido es 2.5 mL. Posteriormente se evapora a sequedad bajo una corriente de nitrógeno gaseoso a temperatura ambiente y se almacena a 4°C hasta el momento del análisis (Wu et al., 2011, Lasram et al., 2013, Cao et al., 2013) (Anexo 2).

2.2.6 Condiciones para HPLC

Para el análisis de OTA por HPLC-FLD se redisuelve el extracto con 1000 µL de una solución de acetonitrilo/agua (ACN:H₂O) en una proporción 50/50 (v/v). Se homogeniza en un vórtex por 3 minutos y se le coloca en un baño ultrasónico por 5 minutos, asegurando que se redisuelva en su totalidad. Se filtra el extracto con un filtro de membrana 0.45 µm sobre un vial para HPLC.

El análisis se realizó mediante un método estandarizado por HPLC-FLD cuyos parámetros de análisis se presentan en la tabla 4. Con este métodos, la separación de OTA se consigue con una columna Zorbax Eclipse C₁₈ (250 x 4.6 mm, 5 µm) y cada corrida cromatográfica se realiza en 25 minutos (incluyendo el periodo de lavado y equilibración de la columna). Los límites de detección y cuantificación del método fueron 0.126 y 0.252 ng/mL de extracto orgánico (equivalente 0.0063 y 0.0126 ng/mL de cerveza), respectivamente. El rango dinámico lineal de trabajo fue 0.1-40 ng/mL de extracto orgánico y la linealidad fue de R²=0.9999.

Tabla 4. Condiciones analíticas para determinación de ocratoxina A por HPLC-FLD

Modo elución	Isocrático
Fase móvil	ACN/H ₂ O/HAc (50:49:1, v/v/v)
Detección	Fluorescencia: λ excitación = 247 nm λ emisión = 480 nm
Velocidad de flujo	1 mL/min
Temperatura de Columna	25°C
Volumen de inyección	100 µl (extracto filtrado)
Tiempo de retención	10.2 – 10.7 min

Fuente: (Ortiz, 2011)



2.2.7 Curvas de Calibración

Para la curva de calibración se trabajó con el estándar seco con una concentración de 20 µg/mL (40 µL) y se redisolvió con 1000 µL acetonitrilo:agua (50/50; v/v), obteniendo una solución madre de 800 ng/mL de la cual se partió para la preparación de diluciones de 40, 20, 10, 5, 2, 1, 0.5, 0.1, 0.05 y 0.01 ng/mL utilizando una solución de acetonitrilo/agua en una proporción 50/50 (v/v). Los estándares fueron analizados por HPLC-FLD siguiendo el mismo método indicado en el punto 2.2.6 (Ortiz, 2011).

Tabla 5. Preparación de soluciones estándares para la cuantificación de ocratoxina A

Concentración (ng/mL)	Solución Madre (µL)	Acetonitrilo:H ₂ O 50:50 (v/v) (µL)
800 ng/mL		
40	50	950
20	25	975
40 ng/mL		
10	150	450
5	75	525
2	25	475
1	25	975
1 ng/mL		
0,5	200	200
0,1	50	450
0,05	25	475
0,01	10	990

2.3 Determinación de pH en bebidas alcohólicas

2.3.1 Fundamento

Mide la tendencia de acidez o alcalinidad de una solución acuosa. Se expresa como el logaritmo de la concentración de iones hidrógeno en moles por litro. La alteración del pH puede ser indicativo de contaminación (INEN, 2013).



2.3.2 Equipos, materiales y reactivos

Equipos

- Potenciómetro (Mettler Toledo, 8603, Suiza)
- Agitador magnético (VELP científica, ARE 115V, Italia)

Materiales

- Vaso de precipitación de 250 cm³

2.3.3 Procedimiento

La determinación se realizó por duplicado sobre la misma muestra degasificada. Según norma INEN 2325, se colocan en un vaso de precipitación aproximadamente 100 cm³ de muestra y se introduce el electrodo del medidor de pH, cuidando que no toquen las paredes del recipiente. Agitar constantemente y leer el valor de pH obtenido con precisión 0.01 (INEN, 2013).

2.3.4 Reporte de resultados

En el informe se reporta la media aritmética de las dos lecturas con dos decimales (INEN, 2013).

2.4 Determinación de la acidez total por el método de titulación potenciométrica

2.4.1 Fundamento

La acidez total representa la suma de las sustancias ácidas valorables por titulación en la cerveza degasificada con una solución de hidróxido de sodio 0.1 N hasta pH 8.2 (INEN, 2013).

2.4.2 Equipos, reactivos y materiales

Equipos

- Potenciómetro (Mettler Toledo, 8603, Suiza)
- Agitador magnético (VELP científica, ARE 115V, Italia)

Materiales

- Vaso o Erlenmeyer de 100 cm³



- Bureta de 25 cm³, precisión 0.05

Reactivos

- Solución de hidróxido de sodio 0.1 N (Merck, Alemania)

2.4.3 Procedimiento

Según norma INEN 2323, en un vaso de precipitación de 100 cm³ colocar 50 cm³ de cerveza degasificada con una barra magnética. Lavar los electrodos del potenciómetro con agua destilada e introducirlos en el vaso con cerveza. Agitar la mezcla con un agitador y titular con NaOH 0.1 N. Se adiciona inicialmente cantidades de 1.5 cm³ hasta un pH de 7.6, luego en volúmenes más pequeños de 0.15 cm³ hasta llegar a un pH de 8.2. Leer el volumen de álcali adicionado en la bureta (INEN, 2013).

2.4.4 Cálculos

La acidez se calcula como porcentaje de ácido láctico mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Acidez total (AcLac)} = \frac{\text{cm}^3 \text{ de NaOH } 0.1\text{N} \times 10}{\text{cm}^3 \text{ de cerveza} \times \text{gravedad específica de la cerveza}} \times 0.09$$

Donde:

0.09 = cm³ equivalentes de una solución de ácido láctico 0,1N

$$\text{Acidez total (AcLac)} = \frac{\text{cm}^3 \text{ de NaOH } 0.1\text{N} \times 0.9}{\text{cm}^3 \text{ de cerveza} \times \text{gravedad específica de la cerveza}}$$

2.4.5 Reporte de resultados

La acidez de la cerveza se expresa como porcentaje de ácido láctico con dos decimales (INEN, 2013).



2.5 Determinación de microorganismos aerobios mesófilos, recuento en placa REP

2.5.1 Fundamento

La técnica se basa en contar las unidades formadoras de colonias (UFC) de los microorganismos mesófilos presentes en un gramo o mililitro de muestra. Se considera que un microorganismo viable presente en una muestra de alimento se reproducirá en el medio nutritivo de cultivo a una temperatura óptima de 37 °C durante 72 horas. Las diluciones de la muestra facilitan el conteo de las colonias cuando la muestra contiene grandes cargas de microorganismos (INEN, 2013).

2.5.2 Equipos, reactivos y materiales

Equipos

- Autoclave (Tuttnauer, 2340MK, Israel)
- Balanza analítica (Boeco, BBL31, Alemania)
- Cámara de flujo laminar (Labconco, logic purifier, USA)
- Incubadora a 37°C (Heidolph, unimax 1010, Alemania)

Medios de Cultivo

- Agua de peptona (Kluka analytical, España)
- Plate count agar (Difco TM, USA)
 - ✓ Triptona (peptona de caseína) 5.0 g
 - ✓ Extracto de levadura 2.5 g
 - ✓ D(+) glucosa 1.0 g
 - ✓ Agar 15.0 g
 - ✓ Agua destilada 1.0 L

Materiales estériles

- Cajas petri
- Pipetas serológicas de 1,2,5,10 mL
- Erlenmeyer de 500 cm³
- Tubos tapa rosca
- Gradillas
- Gasa
- Algodón
- Papel de empaque
- Parafilm
- Alcohol 70%



2.5.3 Procedimiento

a. Preparación de medio de cultivo

Según norma INEN 1529-1, disolver todos los componentes del medio de cultivo en 1 litro de agua destilada, dejar en reposo durante 15 minutos. Ajustar el pH a 7.0 de ser necesario. Calentar a ebullición agitando frecuentemente hasta que se disuelvan completamente los componentes y quede una solución homogénea. Esterilizar durante 15 minutos a 121°C (INEN, 2013).

b. Preparación de la muestra

Según norma INEN 1529-5, se realizan diluciones en agua de peptona al 0.1%, por cada dilución se siembra por duplicado. Utilizar por cada dilución una pipeta distinta y estéril. Se coloca 1 cm³ de muestra en la caja petri y por vertido se adiciona 20 cm³ del medio de cultivo estéril y temperado a 45 °C. Se homogeniza el contenido de la caja petri con movimientos circulares hacia todos los sentidos para asegurar la mezcla del inóculo.

Una vez que el medio de cultivo solidifique, se tapan y se colocan dentro de una funda o se envuelven con rolo plástico según recomendación de la norma INEN 1529-5, esta medida previene la contaminación externa del medio de cultivo durante la incubación. Posteriormente, de manera invertida se incuban las cajas petri a 30 °C por 48 a 72 horas. No se deben apilonar más de 6 cajas. Transcurrido el tiempo de incubación se seleccionan las placas de dos diluciones consecutivas que presenten entre 15-300 colonias. Considerar las colonias de todos los tamaños incluidas las más pequeñas, utilizar lupa si es necesario. Se registra el número de colonias contadas y la dilución correspondiente (INEN, 2013).

2.5.4 Cálculos

$$N = \frac{\Sigma c}{V(n1 + 0,1n2)d}$$

En donde:

Σc = Suma de todas las colonias contadas en todas las placas seleccionadas

V= Volumen inoculado en cada caja Petri

n1= Número de placas de la primera dilución seleccionada

n2= Número de placas de la segunda dilución seleccionada

d= Factor de dilución de la primera dilución seleccionada (d=1 muestra sin diluir).



2.5.5 Presentación de resultados

Los resultados se presentan con unidades formadoras de colonias UFC de aerobios mesófilos por cm^3 de muestra utilizando solo dos cifras significativas multiplicadas por 10^n (INEN, 2013).

2.6 Recuento en placa por siembra en profundidad de mohos y levaduras viables

2.6.1 Fundamento

El método se basa en inocular una cantidad conocida de muestra en un medio de cultivo específico enriquecido con polisacáridos como nutriente principal, además de extracto de levadura y sales minerales. La hidrólisis de estas macromoléculas está a cargo de enzimas propias de estos microorganismos. La acidificación del medio de cultivo a un pH 3.5, limita y elimina el crecimiento bacteriano lo que permite el desarrollo de mohos y levaduras. La temperatura óptima de crecimiento es de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ (INEN, 2013).

2.6.2 Equipos, reactivos y materiales

Equipos

- Autoclave (Tuttnauer, 2340MK, Israel)
- Balanza analítica (Boeco, BBL31, Alemania)
- Cámara de flujo laminar (Labconco, logic purifier, USA)
- Incubadora a 25°C (Mettler, INB200, Alemania)

Medios de Cultivo

- Agua de peptona (Fluka analytical, España)
- Agar sal-levadura de Davis:

✓ Sulfato de amonio	1.0 g
✓ Nitrato de amonio	1.0 g
✓ Fosfato disódico (anhidro)	4.0 g
✓ Fosfato monopotásico	2.0 g
✓ Cloruro de sodio	1.0 g
✓ D(+) glucosa	10.0 g
✓ Extracto de levadura	1.0 g



✓ Agar	15.0 g
✓ Agua destilada	1.0 L
✓ Ácido cítrico	57 cm ³

Materiales estériles

- Cajas petri
- Pipetas serológicas de 1,2,5,10 mL
- Erlenmeyer de 500 cm³
- Tubos tapa rosca
- Gradillas
- Gasa
- Algodón
- Papel de empaque
- Parafilm
- Alcohol 70%

2.6.3 Procedimiento

a. Preparación del medio de cultivo

Según norma INEN 1529-1, se disuelven en primer lugar las sales y luego el agar. Una vez disuelto los componentes se deja en reposo a temperatura ambiente por 15 minutos. Someter a ebullición con agitación constante hasta que la solución sea homogénea. Esterilizar en autoclave 15 minutos a 121 °C. El pH del medio es de 6.6. Antes de verter el medio de cultivo fundido y templado a 50°C en las placas, se debe acidificar agregando 57 cm³ de una solución estéril de ácido cítrico al 10% lo que ajusta el pH a 3.5. No se debe calentar el medio de cultivo nuevamente (INEN, 2013).

b. Preparación de la muestra

Según norma INEN 1529-10, se preparan las diluciones en agua de peptona al 0,1%. Por cada dilución que se prepare se siembra por duplicado. Se inoculan las placas por el método de vertido, colocando 1 cm³ de la muestra en la caja petri y por vertido se agrega 20 cm³ del medio de cultivo fundido y templado a 45 °C. Se debe homogenizar la caja petri con movimientos circulares hacia todos los sentidos para garantizar la mezcla adecuada de la muestra con el medio de cultivo. Una vez que el medio esté solidificado, se envuelven las cajas con plástico.

Se incuban las cajas Petri aeróbicamente, apiladas en grupos de no más de 5 placas. Incubar a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 5 días. Para el recuento de colonias se seleccionan aquellas cajas petri que contienen menos de 150 colonias (INEN, 2013).

2.6.4 Cálculos

$$N = \frac{\text{número total de colonias contadas}}{\text{cantidad total de muestra sembrada}}$$

$$N = \frac{\Sigma c}{V(n_1 + 0,1n_2)d}$$

Donde,

Σc = suma de colonias contadas en las placas elegidas

n_1 = número de placas contadas de la primera dilución contada

n_2 = número de placas contadas de la segunda dilución contada

d = dilución de la cual se obtuvieron los primeros recuentos

V = volumen del inóculo sembrado en cada placa

2.6.5 Presentación de resultados

Los resultados se presentan con unidades propagadoras UP de mohos y levaduras por cm^3 de muestra utilizando solo dos cifras significativas multiplicadas por 10^n (INEN, 2013).

2.7 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se presentan con estadística descriptiva (medidas de tendencia central). Además, la desviación de los resultados con respecto a lo establecido por las normativas de control se evaluó estadísticamente utilizando análisis de varianza (ANOVA). El análisis estadístico se realizó con el software estadístico STATA 10.0.



3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las cervezas muestreadas fueron clasificadas como rubia, roja y negra para la presentación de los resultados de la investigación en esta sección. El reporte detallado de las muestras analizadas se adjunta en el apartado de anexos (anexo 3).

3.1 Determinación de pH

Se determinó el pH de todas las muestras de cerveza recolectadas y detalladas en la tabla 4 del capítulo anterior. Para esto se siguió la metodología especificada en el apartado 2.3. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Resultados de la medición de pH en cervezas artesanales

Tipos de Cerveza	N	Media	Desviación estándar	Mínimo	Máximo
Rubia	14	4.32	0.29	3.99	5.07
Roja	14	4.41	0.14	4.23	4.71
Negra	14	4.25	0.23	3.84	4.73

El rango de pH para los distintos tipos de cerveza fue relativamente diferente. El pH de las cervezas rubias (n=14) osciló entre 3.99 y 5.07, para cervezas rojas (n=14) entre 4.23 y 4.71, y para cervezas negras (n=14) entre 3.84 y 4.73. Sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($P > 0.05$, ANOVA).

La norma técnica ecuatoriana INEN 2262 establece que el valor de pH aceptado para cervezas va de 3.5 a 5.0, por lo tanto las cervezas analizadas estuvieron dentro de este rango, a excepción de la 7GP del tipo rubia cuyo pH de 5.07 excedió ligeramente el máximo permitido.

Adicionalmente, Kunze (2006) sugiere que valores de pH menores que 4.4 permiten un sabor más refinado de la cerveza y mejoran la estabilidad biológica. Al respecto, los pH de 32 de las cervezas analizadas estuvieron dentro de este rango por lo que presentarían dichas características organolépticas. Sin embargo, 7 de estos pH fueron menores a 4.1, condición que las conduciría a un sabor más ácido, según lo propuesto por el mismo autor.



3.2 Determinación de acidez total

La acidez total de las cervezas fue determinada con base en la metodología especificada en el apartado 2.4. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 7.

Tabla 7. Resultados de la determinación de acidez total en cerveza artesanal, expresado como % ácido láctico

Tipos de Cerveza	N	Media %	Desviación estándar	Mínimo %	Máximo %
Rubia	14	0.29	0.0620	0.19	0.41
Roja	14	0.27	0.0487	0.16	0.34
Negra	14	0.33	0.0940	0.16	0.50

Los valores de acidez para cervezas rubias estuvieron entre 0.19 y 0.41 %, para cervezas rojas entre 0.16 y 0.34 %, y para cervezas negras entre 0.16 y 0.5 %, sin presentar una diferencia estadísticamente significativa entre los tipos de cerveza ($P > 0.05$, ANOVA).

La norma ecuatoriana INEN 2262 indica que el valor de acidez total aceptado para cerveza, expresado como ácido láctico, es de 0 a 0.3. Bajo esta especificación, del total de muestras de cervezas procesadas, 8 rubias, 12 rojas y 8 negras presentaron valores dentro del rango aprobado por la norma. En las cervezas restantes, la acidez total varió desde 0.32 hasta 0.41 % en rubias, entre 0.32 y 0.34 % en rojas, y las más ácidas fueron las cervezas negras con un rango de 0.31 a 0.5 %.

En este punto es necesario diferenciar el pH de la acidez. El pH representa la fuerza de un ácido, mientras que la acidez se refiere a la cantidad de este presente en una solución (Gonzalez, 2017). Según González (2017), mientras menor sea la acidez de una cerveza, mejor será la estabilidad de la espuma y su sabor será más suave. Al respecto, y con base en los resultados obtenidos, las 14 cervezas que no cumplieron con la normativa porque presentaron una acidez mayor a la permitida tendrían menor capacidad de mantener estable su espumabilidad y su sabor.



3.3 Recuento de aerobios mesófilos

En la presente investigación, se determinó la presencia de microorganismos aerobios mesófilos como un indicador importante de la calidad sanitaria del producto, ya que reflejaría los parámetros de la calidad de las materias primas y las condiciones higiénicas durante la producción y almacenamiento de la cerveza.

Las cervezas fueron analizadas según la metodología especificada en el apartado 2.5. Los resultados obtenidos se detallan en la tabla 8.

Tabla 8. Resultados de la determinación de aerobios mesófilos por recuento en placa, expresado en UFC/cm³

Tipos de Cerveza	N	Media	Desviación estándar	Mínimo	Máximo
Rubia	14	1,1*10 ⁷	4,1*10 ⁷	2,0*10 ¹	1,6*10 ⁸
Roja	14	3,9*10 ⁵	1,2*10 ⁶	1,8*10 ¹	4,4*10 ⁶
Negra	14	1,7*10 ⁷	6,3*10 ⁷	1,5*10 ¹	2,4*10 ⁸

Los mayores valores para el recuento total de aerobios mesófilos correspondieron a las cervezas rubias y negras, con medias de 1,1*10⁷ UFC/cm³ y 1,7*10⁷ UFC/cm³, respectivamente. Por otro lado, las cervezas rojas presentaron una media de 3,9*10⁵ UFC/cm³.

A nivel internacional no existe una norma regulatoria específica para cerveza artesanal. En el Instituto Nacional de Administración Pública de España cuentan con una norma para control de calidad de la cerveza en la que no incluyen el control microbiológico como un requisito. Esto está fundamentado en que las propiedades físico-químicas de la cerveza que inhiben el crecimiento microbiano. De acuerdo a esta consideración, los resultados obtenidos en este estudio demuestran lo contrario por los elevados recuentos de aerobios mesófilos en las cervezas artesanales producidas en la ciudad. En Latinoamérica, la norma Nacional de Nicaragua para la cerveza no pasteurizada ha establecido que el recuento máximo para aerobios mesófilos es de 1,0*10² UFC/cm³. Con este valor referencial, 39 de las 42 cervezas artesanales procesadas en esta investigación no cumplirían con este requerimiento.

Las cervezas artesanales analizadas en este estudio no son sometidas al proceso de pasteurización durante su producción, por lo que deberían cumplir con el recuento máximo de aerobios mesófilos, 8,0*10¹ UFC/cm³, valor asignado para cervezas no



pasteurizadas, según la norma INEN 2262. Sin embargo, de las 42 cervezas analizadas únicamente 3, que pertenecen a la misma marca y son comercializadas en botellas, estuvieron por debajo del valor máximo permitido. Se presume que esta marca, como parte de su proceso de producción, incluye un proceso de filtración previo al embotellado, lo que disminuiría el recuento de microorganismos aerobios mesófilos en placa.

En el recuento de aerobios mesófilos se incluyen a todas las bacterias, mohos y levaduras propias de la microflora de la cerveza (Hornsey, 2003). Sin embargo, en esta investigación no se realizó la caracterización de los microorganismos, por lo que esta podría ser motivo de futuras investigaciones. Es necesario especificar que los recuentos elevados registrados en este estudio tales como $1.6 \cdot 10^8$ UFC/cm³ y $2.4 \cdot 10^8$ UFC/cm³ no aseguran la presencia de patógenos. Así mismo, los recuentos bajos para el caso de $1.5 \cdot 10^1$, $1.8 \cdot 10^1$ y $2.0 \cdot 10^1$ UFC/cm³, que son valores dentro de la norma, no certifican que el producto esté libre de flora patógena y toxinas (Bamforth, 2004, Baxter, 2001, Hill, 2015).

La cerveza tiene diferentes propiedades físicas y químicas que le dan estabilidad y protección contra microorganismos. Por ejemplo, el pH ácido, la baja acidez, las isohumulonas del lúpulo, el bajo contenido de nutrientes y elevadas cantidades de anhídrido carbónico disuelto en la cerveza limita el crecimiento bacteriano. Sin embargo, en este trabajo de investigación los elevados recuentos podrían ser consecuencia de las condiciones de producción y dar lugar a alteraciones en las características propias de la cerveza (Bamforth, 2004).

Con respecto a los recuentos de mesófilos de las 39 cervezas restantes, los altos valores obtenidos reflejarían una falta de control de higiene en el lugar, del material utilizado durante la producción y almacenamiento, y del operador. Por ejemplo, la mayoría de cerveceros artesanales producen sus cervezas en localidades insalubres tales como cocheras, bodegas y áticos, lugares no asépticos para la elaboración de productos de consumo humano (SECA, 2016).



3.4 Recuento de mohos y levaduras

El recuento de mohos y levaduras en la cerveza se realizó tal como lo descrito en el apartado 2.6. Los resultados obtenidos se detallan en la tabla 9.

Tabla 9. Resultados de la determinación de mohos y levaduras en cerveza, expresado en UP/cm³

Tipos de Cerveza	N	Media	Desviación estándar	Mínimo	Máximo
Rubia	14	9,4*10 ⁶	3,0*10 ⁷	3,8*10 ²	1,1*10 ⁸
Roja	14	4,6*10 ⁵	1,1*10 ⁶	3,1*10 ¹	4,0*10 ⁶
Negra	14	1,3*10 ⁷	4,1*10 ⁷	1,5*10 ¹	1,6*10 ⁸

El recuento de mohos y levaduras fue más elevado en las cervezas negras, con una media de 1.3*10⁷ UP/cm³, seguida de las rubias con 9.4*10⁶ UP/cm³ y finalmente las rojas con 4.6*10⁵ UP/cm³. Las diferencias entre los recuentos de los tres tipos de cervezas estudiados no fue estadísticamente significativa (P > 0.05, ANOVA).

A nivel internacional no se cuenta con normativa para el control de calidad de cerveza artesanal. En la norma Nicaragüense, consta el control microbiológico para aerobios mesófilos. Sin embargo, en esta normativa se incluye solamente el recuento total de mohos, a diferencia de la normativa ecuatoriana en el que consideran un solo recuento para mohos y levaduras. Por este motivo, no se tiene ninguna normativa adicional para comparar los resultados encontrados en esta investigación.

El valor máximo establecido por la norma ecuatoriana INEN 2262 para recuento de mohos y levaduras en cerveza no pasteurizada es de 5.0*10¹ UP/cm³. Sin embargo, de las 42 cervezas analizadas solamente 2 presentaron resultados por debajo de la norma, siendo estos 3.1*10¹ UP/cm³ y 1.5*10¹ UP/cm³. Con la misma consideración para el recuento de aerobios mesófilos, los dos tipos de cerveza pertenecen a la marca comercial embotellada que presumiblemente incluye como parte de su proceso de producción la filtración del producto final, lo que disminuye el recuento de mohos y levaduras.

El valor establecido por la norma ecuatoriana incluye la microflora propia de la cerveza (García et al., 2004, Hornsey, 2003). El recuento elevado de mohos y levaduras en 40 de las cervezas procesadas presentaron valores comprendidos entre 3.8*10² UP/cm³ y 1.6*10⁸ UP/cm³. Debido a que la producción de la cerveza es artesanal, como se ha



recalcado en este estudio, los lugares y condiciones de producción no garantizan la inocuidad de la cerveza, lo que resultaría en el alto recuento de microorganismos.

El uso de otras cepas de levaduras para la fermentación alteran el sabor y amargor propios de la cerveza, volviéndola más agria, astringente y turbia (Otero et al., 2000). Esto se da debido a que la levadura tiene un limitado poder de floculación que impide que sedimente en el fondo del recipiente lo que dificulta su remoción. Este inconveniente se manifiesta en el producto final como una película característica sobre la superficie del líquido (García et al., 2004, Otero et al., 2000, Vera, 2008).

En esta investigación no se realizó la caracterización de mohos y levaduras en las cervezas analizadas. Sin embargo, se presume la presencia de levaduras salvajes provenientes del medio ambiente que habrían contaminado el producto durante su elaboración debido a las condiciones aeróbicas de las instalaciones. Esta hipótesis se fundamenta en la turbiedad que presentaron las cervezas con mayor recuento de mohos y levaduras, ya que se ha observado que las levaduras salvajes son responsables del deterioro de la cerveza en sus características organolépticas como el sabor y turbiedad (Bamforth, 2004, Baxter, 2001).

3.5 Determinación del nivel de contaminación por ocratoxina A (OTA)

Las concentraciones de ocratoxina A en las cervezas fueron analizadas según la metodología especificada en el apartado 2.2. La extracción de la ocratoxina de las cervezas para su análisis se realizó mediante la aplicación de la técnica con columnas de inmovilización. Esta selección se basó en la evidencia científica presentada por Scott et al. (2009) en la que se compara la extracción en fase sólida (SPE) con las columnas de inmovilización (Ochraprep); estas últimas presentaron menor interferencia, mayor sensibilidad y mejor recuperación de la toxina (Scott and Kanhere, 1995).

Los cromatogramas típicos de muestras positivas se adjuntan en el anexo 4. Los resultados obtenidos se detallan en la tabla 10.



Tabla 10. Resultados de la determinación de ocratoxina en cerveza artesanal por HPLC-FLD, expresado en ng/mL de cerveza

Tipos de Cerveza	Positivas/Total	Media	Desviación estándar	Mínimo	Máximo
Rubia	4/14	0.15	0.2380	0.025	0.512
Roja	4/14	0.12	0.1731	0.027	0.377
Negra	2/14	0.20	0.1811	0.073	0.329

De las 42 cervezas analizadas, 4 rubias, 4 rojas y 2 negras presentaron concentraciones de la toxina en valores comprendidos entre 0.025 ng/mL y 0.51 ng/mL, 0.027 ng/mL y 0.38 ng/mL, y 0.073 ng/mL y 0.33 ng/mL, respectivamente. Si bien, 10 de las cervezas procesadas estuvieron contaminadas con ocratoxina A, las concentraciones no excedieron los límites máximos establecidos por la JECFA para el consumo humano.

El 23.8% de las 42 cervezas procesadas durante esta investigación resultaron positivas a la presencia de ocratoxina A, lo cual fue menor a lo observado en varios estudios, tales como prevalencias en República Checa con 39% de muestras contaminadas de un total de 115, Bélgica con el 42.5% de 82, Túnez con 48% de 35, Italia con 52% de 61, Japón con 90% de 15 y Dinamarca con 100%, (Běláková et al., 2011, Jorgensen, 1998, Nakajima et al., 1999, Tangni et al., 2002, Visconti et al., 2000, Lasram et al., 2013). Sin embargo, en la investigación realizada por Kawashima (2007) en Brasil se obtuvieron resultados que indican que el 4.8% de 58 cervezas analizadas estuvieron contaminadas con ocratoxina A, siendo substancialmente menor al encontrado en la presente investigación.

A nivel mundial, en Brasil se han reportado las concentraciones más altas de contaminación por ocratoxina A, 18.0 ng/mL, seguida de España con 0.498 ng/mL. En otras investigaciones realizadas en República Checa y Dinamarca, los niveles de contaminación por ocratoxina más altos fueron 0.24 ng/mL y 0.185 ng/mL, respectivamente (Běláková et al., 2011, Kawashima et al., 2007, Lasram et al., 2013, Tangni et al., 2002, Araguás et al., 2005). En esta investigación el nivel de contaminación más elevado fue de 0.512 ng/mL semejante a aquel presentado por Araguás et al. en España. Cabe recalcar que no existen datos publicados de estudios similares al presente en el Ecuador.

La presencia de ocratoxina A en algunas de las cervezas podría deberse a la contaminación por hongos de la materia prima, especialmente de la cebada (Tangni et



al., 2002, Běláková et al., 2011, Kuruc et al., 2015a, Mateo et al., 2011). Por otro lado, existen cerveceros artesanales en Ecuador que con el objeto de mantener la tradición propia de su país de origen, adquieren materias primas importadas desde Alemania, República Checa y Argentina (SECA, 2016). Esta constituye un punto crítico para la contaminación por hongos debido a que se desconocen sus condiciones de almacenamiento.

Si bien ninguna de las cervezas excedió el máximo permisible de ocratoxina A, esta no es la única fuente de exposición pues diariamente se consumen productos alimenticios, que al igual que la cerveza, presentan bajos niveles de contaminación que incrementarían el nivel de exposición a la toxina (Steinberg, 2013). Por ejemplo, la ocratoxina A podría estar presente en alimentos tales como carne y sus derivados; café; derivados del cacao; cereales y sus derivados; frutas tales como uvas y pasas; bebidas tales como vino, té y cerveza; aceite de oliva; entre otros (Bui-Klimke and Wu, 2015, Ravelo et al., 2011). Además, se debe considerar que el tiempo de vida media de la toxina es de 35 días, por lo que al existir una mayor frecuencia de consumo de alimentos contaminados, mayor será la acumulación a nivel plasmático, lo que desencadenaría en graves problemas de salud (López de Cerain et al., 2000).

La mayoría de cervezas analizadas presentaron concentraciones de ocratoxina A por debajo del límite de detección. Si bien la selección adecuada de los granos de cebada contaminada por hongos disminuiría la presencia de la toxina, esta no garantizaría que el lote no contenga micotoxinas debido a su distribución tan heterogénea en los alimentos (Skarkova et al., 2013, Varelis et al., 2006). Además, durante el proceso de elaboración de la cerveza la concentración de ocratoxina A podría haber disminuido por la cocción del mosto y durante la fermentación (Chu et al., 1975).



CONCLUSIONES

En la presente investigación se llevaron a cabo estudios para analizar los parámetros físicoquímicos y microbiológicos así como también los niveles de contaminación por ocratoxina A de la cerveza artesanal expedida en bares de la ciudad de Cuenca.

Los resultados obtenidos para el pH demostraron que solo una cerveza artesanal de las analizadas no está dentro del rango comprendido entre 3.5 y 5.0, y establecido por la norma INEN 2262. En el caso de la acidez total, 14 de las muestras procesadas excedieron el límite máximo de 0.3%, establecido por la norma INEN 2262. De igual manera, se evaluaron los parámetros de control microbiológico según la norma INEN 2262. Los resultados demostraron que más del 92% de las muestras analizadas no cumplen con lo establecido en esta norma. Por ejemplo, para aerobios mesófilos el valor límite es de $8.0 \cdot 10^1$ UFC/cm³; mientras que, los resultados de esta investigación identificaron recuentos que fueron desde $5.2 \cdot 10^2$ hasta $2.4 \cdot 10^8$ UFC/cm³. Para mohos y levaduras la normativa específica que el recuento no debe superar las $5.0 \cdot 10^1$ UP/cm³. Por el contrario, en esta investigación se obtuvieron altos recuentos que fueron de $3.8 \cdot 10^2$ a $1.6 \cdot 10^8$ UP/cm³. De manera general, se puede concluir que la calidad microbiológica de la cerveza artesanal expedida en bares de la ciudad de Cuenca es deficiente, y se debería a la falta de regulaciones por parte de los organismos responsables del control en la producción de esta bebida alcohólica.

Por otro lado, la determinación de los niveles de contaminación por ocratoxina A se realizó mediante la extracción con cartuchos de inmunoafinidad y HPLC-FLD. Los resultados de este estudio revelaron que el 23.8% de las cervezas artesanales analizadas están contaminada con ocratoxina A, siendo la concentración más elevada 0.512 ng/mL. Este valor obtenido no supera el límite máximo establecido por el Comité FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) para el consumo humano. Sin embargo, no se puede afirmar que los consumidores no estén expuestos a la contaminación dietaria de ocratoxina A, ya que la cerveza artesanal no es la única fuente de exposición a esta toxina. Además, su prolongado tiempo de vida media podría desencadenar en graves efectos de salud a largo plazo.



RECOMENDACIONES

A partir de los resultados de este trabajo de investigación se puede recomendar:

- Realizar vigilancias periódicas en los establecimientos como bares, que son los lugares de expendio de cerveza artesanal, para controlar la producción y el riesgo del consumo de estas bebidas contaminadas con microorganismos.
- Socializar con los cerveceros artesanales acerca de buenas prácticas de manufactura y control de puntos críticos para producir una cerveza de mejor calidad.
- Considerando la elevada contaminación de las cervezas analizadas, se debería realizar la caracterización de bacterias aerobias mesófilas, y de mohos y levaduras para identificar especies patógenas que puedan estar presentes en la cerveza artesanal.
- Realizar estudios complementarios para determinar la ingesta diaria de ocratoxina A de la población de Cuenca considerando que la cerveza no es la única fuente de exposición a esta toxina.
- En la última actualización de la norma consta solamente la cerveza pasteurizada, por lo que se recomienda a la entidad gubernamental a cargo, incluir nuevamente la cerveza no pasteurizada como parte de la normativa pues la naturaleza de su fabricación es diferente y los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos ayudarían en el mejoramiento de la calidad del producto.



REFERENCIAS

- 1) Anselme, M., Tangni, E., Pussemier, L., Motte, J.-C., Van Hove, F., Schneider, Y.-J., Van Peteghem, C. and Larondelle, Y. (2006) 'Comparison of ochratoxin A and deoxynivalenol in organically and conventionally produced beers sold on the Belgian market', *Food additives and contaminants*, 23(9), pp. 910-918.
- 2) Araguás, C., González-Peñas, E. and De Cerain, A. L. (2005) 'Study on ochratoxin A in cereal-derived products from Spain', *Food chemistry*, 92(3), pp. 459-464.
- 3) Aresta, A., Palmisano, F., Vatinno, R. and Zambonin, C. G. (2006) 'Ochratoxin A determination in beer by solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography with fluorescence detection: A fast and sensitive method for assessment of noncompliance to legal limits', *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(5), pp. 1594-1598.
- 4) Arias, G. (1991) *Calidad industrial de la Cebada Cervecera*. INIA.
- 5) Artesana, C. (2003) *Cerveza Artesana Homebrew S.L.* España. Available at: <https://cervezartesana.es/tienda/quienes-somos/>.
- 6) Bamforth, C. (2004) *Beer: Health and Nutrition*. Blackwell.
- 7) Bauer, J. I., Gross, M., Gottschalk, C. and Usleber, E. (2016) 'Investigations on the occurrence of mycotoxins in beer', *Food Control*, 63, pp. 135-139.
- 8) Baxter, D. (2001) *Beer: Quality, safety and nutritional aspects*. United Kingdom.
- 9) Behre, K.-E. (1999) 'The history of beer additives in Europe—a review', *Vegetation History and Archaeobotany*, 8(1-2), pp. 35-48.
- 10) Bellver Soto, J., Fernández-Franzón, M. n., Ruiz, M.-J. and Juan-García, A. (2014) 'Presence of ochratoxin A (OTA) mycotoxin in alcoholic drinks from southern European countries: Wine and beer', *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(31), pp. 7643-7651.
- 11) Briggs, D. E. (2004) *Brewing : science and practice*. Cambridge: Woodhead.
- 12) Bui-Klimke, T. R. and Wu, F. (2015) 'Ochratoxin A and human health risk: A review of the evidence', *Critical reviews in food science and nutrition*, 55(13), pp. 1860-1869.
- 13) Běláková, S., Benešová, K., Mikulíková, R. and Svoboda, Z. (2011) 'Determination of ochratoxin A in brewing materials and beer by ultra performance liquid chromatography with fluorescence detection', *Food Chemistry*, 126(1), pp. 321-325.
- 14) CAC, C. A. 2015. Codex Alimentarius - Normas Internacionales de los Amlimentos. *Codex Alimentarius - Normas Internacionales de los Amlimentos*.
- 15) Cao, J., Kong, W., Zhou, S., Yin, L., Wan, L. and Yang, M. (2013) 'Molecularly imprinted polymer-based solid phase clean-up for analysis of ochratoxin A in beer, red wine, and grape juice', *J Sep Sci*, 36(7), pp. 1291-7.
- 16) Castillo A., J. (2014) *Guía de cervezas artesanas españolas*. Segunda edn. España: Visión Libros.
- 17) Cervebel (2012) *La cerveza*. España: Cervebel. Available at: http://www.cervebel.es/cerveza_descubrimiento.htm.
- 18) Chu, F., Chang, C., Ashoor, S. H. and Prentice, N. (1975) 'Stability of aflatoxin B1 and ochratoxin A in brewing', *Applied microbiology*, 29(3), pp. 313-316.



- 19) Dickinson, R. (2004) *Metabolism and Molecular Physiology of Saccharomyces Cerevisiae*,. Second edn. Canada: CRC Press.
- 20) Dopp, E., Müller, J., Hahnel, C. and Schiffmann, D. (1999) 'Induction of genotoxic effects and modulation of the intracellular calcium level in syrian hamster embryo (SHE) fibroblasts caused by ochratoxin A', *Food and chemical toxicology*, 37(7), pp. 713-721.
- 21) Duarte Vogel, S. and Villamil Jiménez, L. C. (2006) 'Micotoxinas en la salud pública', *Revista de Salud Pública*, 8(supplement 1), pp. 129-135.
- 22) EBC, E. B. C. (1966) 'Test of the EBC colour discs for wort and beer', *Brewing Institute*.
- 23) El-Tiempo (2016) 'Cerveza artesanal, hágala usted mismo en casa'.
- 24) ELIKA (2013) 'Fundación Vasca para la Seguridad Alimentaria', *Fundación Vasca para la Seguridad Alimentaria*.
- 25) FAO 2010. Depósito de Documentos de la FAO.
- 26) Fonnegra, R. (2007) *Plantas medicinales aprobadas en Colombia*. Segunda edn. Colombia: Universidad de Antioquia.
- 27) García, M., Quintero, R. and Agustin, L.-M. (2004) *Bioteconología Alimentaria*. Balderas, México.
- 28) Gonzalez, M. (2017) *Principios de Elaboración de las Cervezas Artesanales*. USA: Lulu Press Inc.
- 29) Harcz, P., Tangni, E., Wilmart, O., Moons, E., Van Peteghem, C., De Saeger, S., Schneider, Y.-J., Larondelle, Y. and Pussemier, L. (2007) 'Intake of ochratoxin A and deoxynivalenol through beer consumption in Belgium', *Food additives and contaminants*, 24(8), pp. 910-916.
- 30) Hill, A. (2015) *Brewing Microbiology, managing microbes, ensuring quality and valorising waste*. Elsevier.
- 31) Hornsey, I. S. (2003) *Elaboración de cerveza: microbiología, bioquímica y tecnología*.
- 32) Höhler, D. (1998) 'Ochratoxin A in food and feed: occurrence, legislation and mode of action', *Zeitschrift fur Ernährungswissenschaft*, 37(1), pp. 2-12.
- 33) IARC (2013) 'International Agency for Research on Cancer', Available: World Health Organization.
- 34) IICA (2000) *Industria de la Cerveza*. Primera edn.: Interamericano de Cooperación para la Agricultura.
- 35) Ikalafeng, B. K. (2008) *Microbiota and mycotoxins in traditional beer of the greater Kimberley area and associated brewing and consumption practices*. Bloemfontein: Central University of Technology, Free State.
- 36) INEN, N. (2013) 2262 *Bebidas Alcoholicas, Cerveza, Requisitos*: Norma Técnica Ecuatoriana.
- 37) Jorgensen, K. (1998) 'Survey of pork, poultry, coffee, beer and pulses for ochratoxin A', *Food Additives & Contaminants*, 15(5), pp. 550-554.
- 38) Kabak, B. (2009) 'Ochratoxin A in cereal-derived products in Turkey: occurrence and exposure assessment', *Food and Chemical Toxicology*, 47(2), pp. 348-352.
- 39) Kawashima, L. M., Vieira, A. P. and Soares, L. M. V. (2007) 'Fumonisin B1 and ochratoxin A in beers made in Brazil', *Food Science and Technology (Campinas)*, 27(2), pp. 317-323.



- 40) Kuruc, J., Hegstad, J., Lee, H. J., Simons, K., Ryu, D. and Wolf-Hall, C. (2015a) 'Infestation and Quantification of Ochratoxigenic Fungi in Barley and Wheat Naturally Contaminated with Ochratoxin A', *Journal of food protection*, 78(7), pp. 1350-1356.
- 41) Kuruc, J., Schwarz, P. and Wolf-Hall, C. (2015b) 'Ochratoxin A in stored US barley and wheat', *Journal of food protection*, 78(3), pp. 597-601.
- 42) Lasram, S., Oueslati, S., Chebil, S., Mliki, A. and Ghorbel, A. (2013) 'Occurrence of ochratoxin A in domestic beers and wines from Tunisia by immunoaffinity clean-up and liquid chromatography', *Food Additives and Contaminants: Part B*, 6(1), pp. 1-5.
- 43) López de Cerain, A., Jiménez, A., Ezpeleta, O. and Bello, J. (2000) 'Efectos tóxicos de la ocratoxina A', *Revista de toxicología*, 17, pp. 61-69.
- 44) Maaroufi, K., Achour, A., Hammami, M., El May, M., Betbeder, A., Ellouz, F., Creppy, E. and Bacha, H. (2016) 'Ochratoxin A in human blood in relation to nephropathy in Tunisia'.
- 45) Mably, M., Mankotia, M., Cavlovic, P., Tam, J., Wong, L., Pantazopoulos, P., Calway, P. and Scott, P. (2005) 'Survey of aflatoxins in beer sold in Canada', *Food additives and contaminants*, 22(12), pp. 1252-1257.
- 46) Martínez A., J., Valls, V. and Villarino, A. (2007) *El lúpulo contenido en la cerveza, su efecto antioxidante en un grupo controlado de población*. primera edn. España: Cerveza y Salud.
- 47) Martínez, R. and Larrañaga, A. (2012) *Micotoxinas: Toxicología alimentaria*. Madrid - España.
- 48) Martínez, A. (2015) *Análisis comparativo de compuestos bioactivos en cerveza artesanal y cerveza industrial*.
- 49) Martínez, M., Moschini, R., Barreto, D., Bodega, J., Comerio, R., Forjan, H., Piatti, F., Presello, D. and Valentinuz, O. (2010) 'Factores ambientales que afectan el contenido de fumonisina en granos de maíz', *Tropical Plant Pathology*, 35(5), pp. 277-284.
- 50) Mateo, E. M., Gil-Serna, J., Patiño, B. and Jiménez, M. (2011) 'Aflatoxins and ochratoxin A in stored barley grain in Spain and impact of PCR-based strategies to assess the occurrence of aflatoxigenic and ochratoxigenic *Aspergillus* spp', *International Journal of Food Microbiology*, 149(2), pp. 118-126.
- 51) Mateo, R., Medina, Á., Mateo, E. M., Mateo, F. and Jiménez, M. (2007) 'An overview of ochratoxin A in beer and wine', *International journal of food microbiology*, 119(1), pp. 79-83.
- 52) Milligan, S., Kalita, J., Heyerick, A., Rong, H., De Cooman, L. and De Keukeleire, D. (1999) 'Identification of a potent phytoestrogen in hops (*Humulus lupulus* L.) and beer', *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 84(6), pp. 2249-2249.
- 53) Monaci, L. and Palmisano, F. (2004) 'Determination of ochratoxin A in foods: state-of-the-art and analytical challenges', *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378(1), pp. 96-103.
- 54) Nakajima, M., Tsubouchi, H. and Miyabe, M. (1999) 'A survey of ochratoxin A and aflatoxins in domestic and imported beers in Japan by immunoaffinity and liquid chromatography', *JOURNAL-AOAC INTERNATIONAL*, 82, pp. 897-902.



- 55) Odhav, B. and Naicker, V. (2002) 'Mycotoxins in South African traditionally brewed beers', *Food Additives & Contaminants*, 19(1), pp. 55-61.
- 56) Ortiz, J. (2011) 'Ochratoxin A Determination', *Mycotoxin HPLC Analysis Protocol*, pp. 15.
- 57) Otero, M., Cabello, A., Vasallo, M., García, L. and López, J. (2000) 'Tecnología para la utilización integral de la levadura de cerveza en la industria alimenticia', *Arch. Latinoam. de Nutr*, 50(4), pp. 361-365.
- 58) Pascari, X., Ramos, A. J., Marín, S. and Sanchís, V. (2017) 'Mycotoxins and beer. Impact of beer production process on mycotoxin contamination. A review', *Food Research International*.
- 59) Pfohl-Leskowicz, A. and Manderville, R. A. (2007) 'Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans', *Molecular nutrition & food research*, 51(1), pp. 61-99.
- 60) Piacentini, K. C., Rocha, L. O., Fontes, L. C., Carnielli, L., Reis, T. A. and Corrêa, B. (2017) 'Mycotoxin analysis of industrial beers from Brazil: The influence of fumonisin B 1 and deoxynivalenol in beer quality', *Food chemistry*, 218, pp. 64-69.
- 61) Pietri, A., Bertuzzi, T., Agosti, B. and Donadini, G. (2010) 'Transfer of aflatoxin B1 and fumonisin B1 from naturally contaminated raw materials to beer during an industrial brewing process', *Food Additives and Contaminants*, 27(10), pp. 1431-1439.
- 62) Priest, F. and Campbell, I. (1999) *Brewing Microbiology*. second edn. United Kingdom.
- 63) Priest, F. G. and Stewart, G. G. (2006) *Handbook of brewing*. 2nd ed. edn. Boca Raton: CRC/Taylor & Francis.
- 64) Ravelo, A., Rubio, C., Gutiérrez, A. and Hardisson, A. (2011) 'La ocratoxina A en alimentos de consumo humano: revisión', *Nutrición Hospitalaria*, 26(6), pp. 1215-1226.
- 65) Requena, F., Saume, E. and León, A. (2005) 'Micotoxinas: Riesgos y prevención', *Zootecnia Tropical*, 23(4), pp. 393-410.
- 66) Rodríguez, M. (2008) *Bases de la Alimentación Humana*. España: Netbiblo.
- 67) Rubert, J., Soler, C., Marín, R., James, K. and Mañes, J. (2013) 'Mass spectrometry strategies for mycotoxins analysis in European beers', *Food Control*, 30(1), pp. 122-128.
- 68) Schrenk, D. and Cartus, A. (2017) *Chemical contaminants and residues in food*. Woodhead Publishing.
- 69) Scott, P. and Kanhere, S. (1995) 'Determination of ochratoxin A in beer', *Food Additives & Contaminants*, 12(4), pp. 591-598.
- 70) SECA (2016) *Elaboración de Cerveza Artesanal*, Cuenca: Sociedad Ecuatoriana de Cerveceros Artesanales.
- 71) Skarkova, J., Ostry, V., Malir, F. and Roubal, T. (2013) 'Determination of Ochratoxin A in Food by High Performance Liquid Chromatography', *Analytical Letters*, 46, pp. 1495-1504.
- 72) Soriano del Castillo, J. M. (2007) *Micotoxinas en alimentos*. Ediciones Díaz de Santos.
- 73) Steinberg, P. (2013) 'A food toxicological contemplation of mycotoxins', *Ernaehrungs Umschau in-ternational*, 60(9), pp. 146-151.



- 74) Størmer, F. C. and Lea, T. (1995) 'Effects of ochratoxin A upon early and late events in human T-cell proliferation', *Toxicology*, 95(1), pp. 45-50.
- 75) Suárez-Machín, C., Garrido-Carralero, N. A. and Guevara-Rodríguez, C. A. (2016) 'Levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la producción de alcohol. Revisión bibliográfica', *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 50(1).
- 76) Tangni, E., Ponchaut, S., Maudoux, M., Rozenberg, R. and Larondelle, Y. (2002) 'Ochratoxin A in domestic and imported beers in Belgium: occurrence and exposure assessment', *Food Additives & Contaminants*, 19(12), pp. 1169-1179.
- 77) Vaclavikova, M., Malachova, A., Veprikova, Z., Dzuman, Z., Zachariasova, M. and Hajslova, J. (2013) 'Emerging mycotoxins in cereals processing chains: changes of enniatins during beer and bread making', *Food chemistry*, 136(2), pp. 750-757.
- 78) Varelis, P., Leong, S.-L. L., Hocking, A. and Giannikopoulos, G. (2006) 'Quantitative analysis of ochratoxin A in wine and beer using solid phase extraction and high performance liquid chromatography–fluorescence detection', *Food additives and contaminants*, 23(12), pp. 1308-1315.
- 79) Vera, G. (2008) *Introducción a la Microbiología*. EUNED.
- 80) Visconti, A., Pascale, M. and Centonze, G. (2000) 'Determination of ochratoxin A in domestic and imported beers in Italy by immunoaffinity clean-up and liquid chromatography', *Journal of Chromatography A*, 888(1), pp. 321-326.
- 81) Volkova, T. (2013) 'Mycotoxins in Brewing Grain Raw Material (Barley, Malt) in Russia', *Journal of Food Science and Engineering*, 3(9), pp. 496.
- 82) Wood, G. (1992) 'Mycotoxins in foods and feeds in the United States', *Journal of Animal Science*, 70(12), pp. 3941-3949.
- 83) Wu, J., Tan, Y., Wang, Y. and Xu, R. (2011) 'Occurrence of ochratoxin A in wine and beer samples from China', *Food Additives and Contaminants*, 4(1), pp. 52-56.
- 84) Yepes, D. (2007) 'Características e Identidad de la Cerveza', *Elaboración y Producción de la cerveza*.

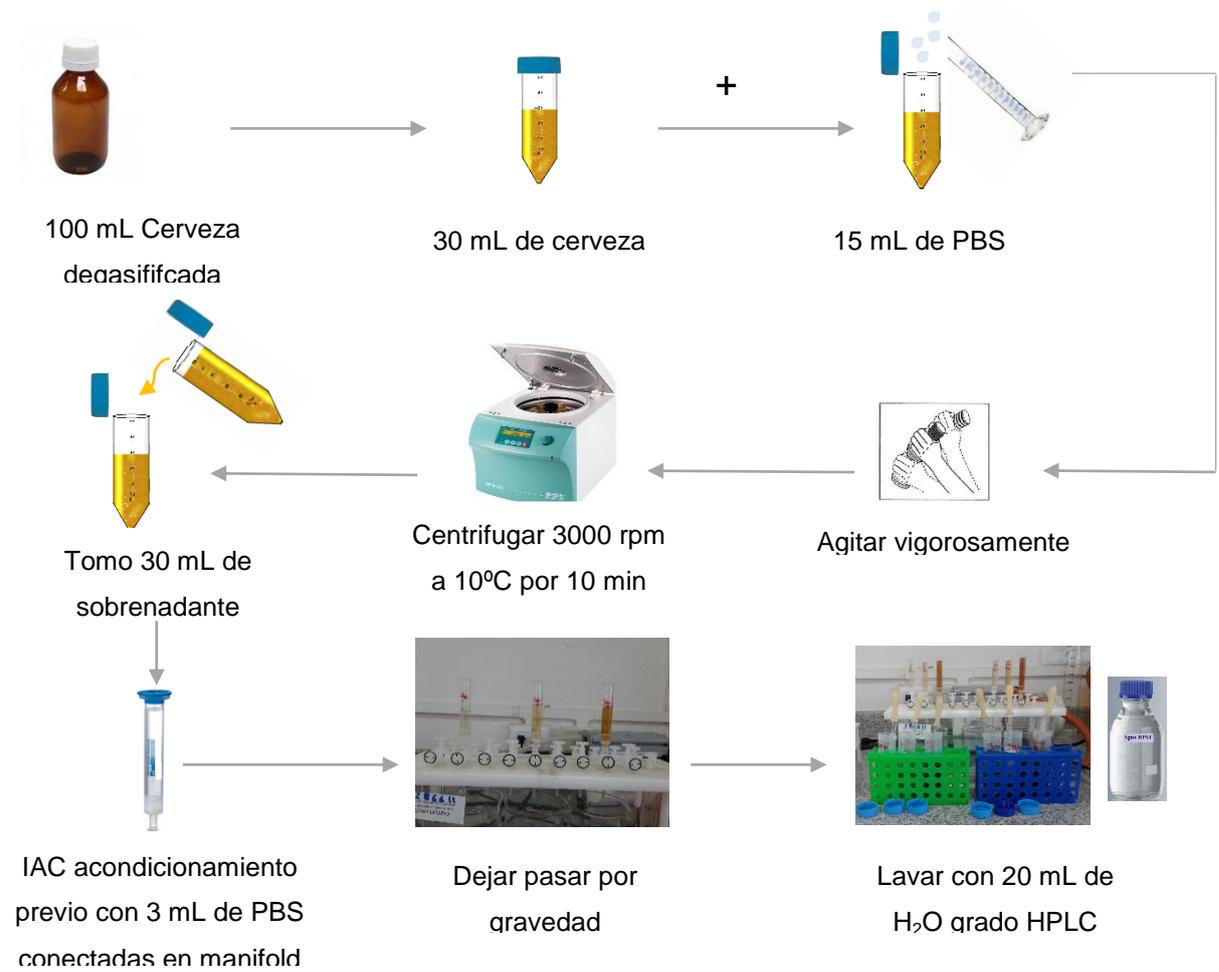


ANEXOS

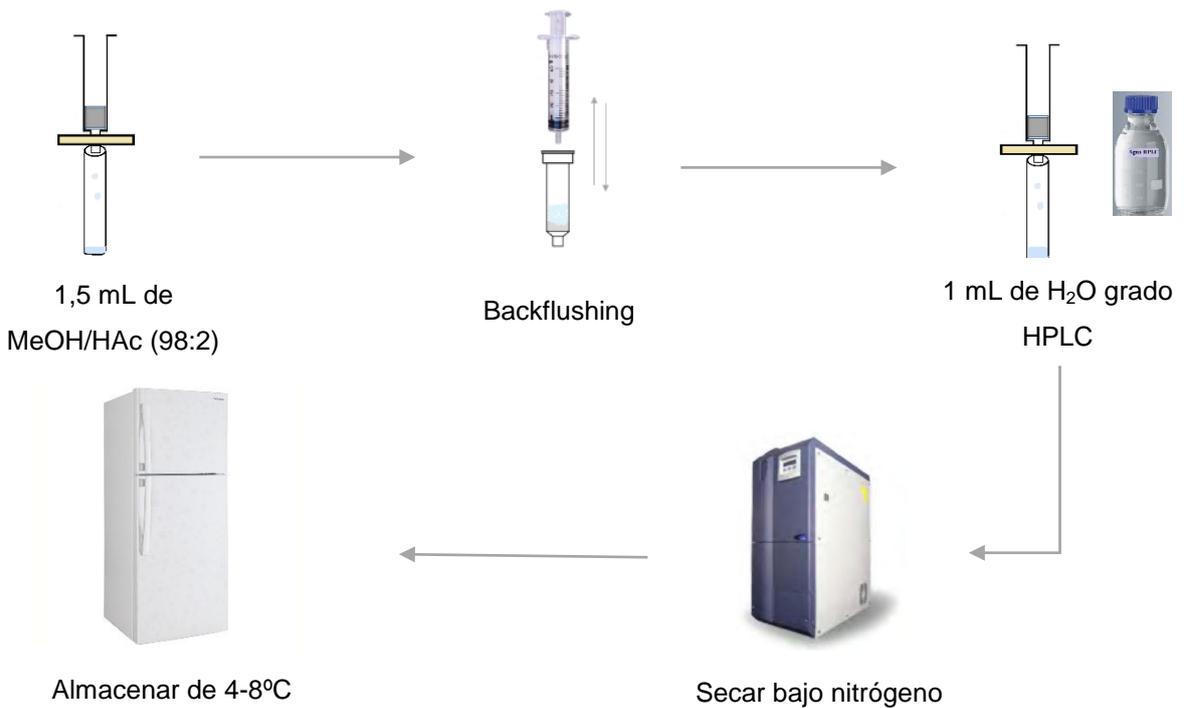
Anexo 1. Encuesta sobre cerveza artesanal en la Ciudad de Cuenca

UNIVERSIDAD DE CUENCA			
<i>ENCUESTA SOBRE CERVEZA ARTESANAL EN LA CIUDAD DE CUENCA</i>			
ENCUESTA SOBRE CERVEZA ARTESANAL EN LA CIUDAD DE CUENCA			
Número de registro	<input style="width: 100%;" type="text"/>		
Fecha de la encuesta (dd/mm/aa)	<input style="width: 100%;" type="text"/>		
DATOS GENERALES:			
Nombre del Encuestado	<input style="width: 100%;" type="text"/>		Teléfono <input style="width: 100%;" type="text"/>
Nombre del Local:	<input style="width: 100%;" type="text"/>		
Tipo de Local:	<input style="width: 100%;" type="text"/>		
Dirección:	<input style="width: 100%;" type="text"/>		
1. En su establecimiento en cuanto a la Cerveza Artesanal, usted:			
1. Vende	Si <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>	→ Pregunta 2 y Pregunta 3
2. Produce	Si <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>	
3. Provee	Si <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>	→ Pregunta 4
4. Otro (especifique)	<input style="width: 100%;" type="text"/>		
2. Conoce Usted el proveedor que lo abastece:		4. ¿A cuántos y a cuáles locales distribuye su producto?:	
Proveedor	<input style="width: 100%;" type="text"/>		Cuántos <input style="width: 100%;" type="text"/>
			Cuáles <input style="width: 100%;" type="text"/>
3. Conoce Usted la marca de cerveza que lo abastece:			
Marca	<input style="width: 100%;" type="text"/>		<input style="width: 100%;" type="text"/>
5. ¿Qué tipo de cerveza artesanal vende, produce o provee en su establecimiento?:			
1. Rubia	<input style="width: 100%;" type="text"/>		
2. Roja	<input style="width: 100%;" type="text"/>		
3. Negra	<input style="width: 100%;" type="text"/>		
4. Otro (especifique)	<input style="width: 100%;" type="text"/>		
	<input style="width: 100%;" type="text"/>		
	<input style="width: 100%;" type="text"/>		
5. No Sabe	<input style="width: 100%;" type="text"/>		
6. De estas cervezas ¿Cuál es la de mayor consumo en su establecimiento?:			
<input style="width: 100%;" type="text"/>			
<input style="width: 100%;" type="text"/>			
GRACIAS POR SU COLABORACIÓN !			

Anexo 2. Extracción en fase sólida con cartuchos de inmunoafinidad



Para la elución





Anexo 3. Tabla de resultados de cerveza artesanal expendida en bares de la ciudad de Cuenca

id	Código	Tipo de cerveza	pH	Acidez total,%	Rcto Aerobios mesófilos, UFC/cm ³	Rcto Mohos y levaduras, UP/cm ³	OTA ng/mL
1	1C	Rubia	4,27	0,19	9,75*10 ⁴	2,80*10 ⁴	
2	2C	Roja	4,33	0,16	4,40*10 ⁶	3,95*10 ⁶	
3	3C	Negra	4,02	0,27	2,96*10 ⁵	6,20*10 ⁴	
4	4TP	Rubia	4,31	0,27	5,95*10 ⁴	4,65*10 ⁴	
5	5TP	Roja	4,55	0,27	1,53*10 ⁴	6,15*10 ³	
6	6TP	Negra	4,40	0,30	1,40*10 ⁴	2,30*10 ⁴	
7	7GP	Rubia	5,07	0,23	3,00*10 ³	2,30*10 ⁴	0,5117
8	8GP	Roja	4,71	0,26	2,00*10 ³	4,60*10 ³	0,3767
9	9GP	Negra	4,73	0,27	3,90*10 ³	2,00*10 ³	0,3289
10	10LC	Rubia	4,53	0,36	1,95*10 ¹	3,80*10 ²	
11	11LC	Roja	4,33	0,29	1,80*10 ¹	3,05*10 ¹	
12	12LC	Negra	4,21	0,33	1,45*10 ¹	1,50*10 ¹	
13	13IB	Rubia	4,20	0,30	2,00*10 ⁵	1,43*10 ⁵	0,0246
14	14IB	Roja	4,57	0,32	1,41*10 ⁵	1,41*10 ⁵	0,0267
15	15IB	Negra	4,37	0,29	2,15*10 ³	1,35*10 ³	0,0728
16	16JBB	Rubia	4,58	0,41	1,89*10 ⁵	1,50*10 ⁵	0,0405
17	17JBB	Roja	4,61	0,34	1,61*10 ⁵	1,11*10 ⁵	0,0351
18	18JBB	Negra	4,58	0,50	9,90*10 ⁴	1,44*10 ⁵	
19	19BF	Rubia	4,38	0,26	2,35*10 ⁴	6,65*10 ⁴	0,0428
20	20BF	Roja	4,30	0,25	2,00*10 ⁴	2,85*10 ⁴	0,0297
21	21BF	Negra	4,03	0,26	8,80*10 ⁴	9,45*10 ⁴	
22	22LC	Rubia	4,21	0,21	8,55*10 ⁴	2,70*10 ⁴	
23	23LC	Roja	4,37	0,20	1,24*10 ⁵	1,15*10 ⁵	
24	24LC	Negra	4,35	0,16	2,52*10 ⁶	1,37*10 ⁷	
25	25BFO	Rubia	4,51	0,31	2,26*10 ⁵	7,45*10 ⁵	



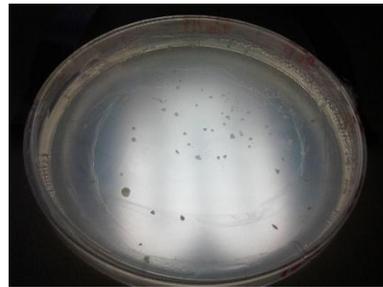
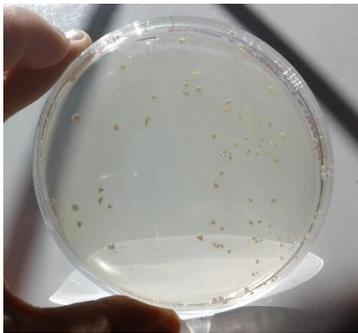
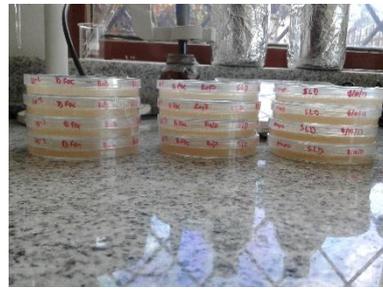
id	Código	Tipo de cerveza	pH	Acidez total,%	Rcto Aerobios mesófilos, UFC/cm3	Rcto Mohos y levaduras, UP/cm3	OTA ng/mL
26	26BFO	Roja	4,44	0,28	$1,32 \cdot 10^5$	$1,08 \cdot 10^6$	
27	27BFO	Negra	3,84	0,50	$1,78 \cdot 10^5$	$6,95 \cdot 10^5$	
28	28FS	Rubia	3,99	0,35	$1,55 \cdot 10^8$	$1,14 \cdot 10^8$	
29	29FS	Roja	4,40	0,30	$2,83 \cdot 10^5$	$7,30 \cdot 10^5$	
30	30FS	Negra	4,29	0,31	$7,50 \cdot 10^4$	$5,30 \cdot 10^4$	
31	31PC	Rubia	4,00	0,25	$4,90 \cdot 10^5$	$1,26 \cdot 10^6$	
32	32PC	Roja	4,30	0,23	$8,15 \cdot 10^4$	$9,00 \cdot 10^4$	
33	33PC	Negra	4,31	0,41	$2,90 \cdot 10^4$	$3,20 \cdot 10^4$	
34	34N	Blanca	4,37	0,35	$5,15 \cdot 10^2$	$6,05 \cdot 10^2$	
35	35N	Rubia	4,23	0,32	$7,55 \cdot 10^3$	$1,15 \cdot 10^4$	
36	36N	Negra	4,13	0,27	$3,90 \cdot 10^3$	$4,70 \cdot 10^3$	
37	37R	Rubia	4,04	0,29	$1,88 \cdot 10^5$	$4,35 \cdot 10^5$	
38	38R	Roja	4,28	0,29	$1,11 \cdot 10^5$	$1,18 \cdot 10^5$	
39	39R	Negra	4,11	0,30	$2,79 \cdot 10^6$	$1,15 \cdot 10^7$	
40	40B	Rubia	4,02	0,30	$2,90 \cdot 10^6$	$1,42 \cdot 10^7$	
41	41B	Roja	4,36	0,26	$2,55 \cdot 10^4$	$1,30 \cdot 10^4$	
42	42B	Negra	4,18	0,38	$2,36 \cdot 10^8$	$1,56 \cdot 10^8$	

Anexo 4. Flujoograma del control microbiológico de cerveza artesanal



Recuento en placa de aerobios mesófilos *Plate count agar*

Recuento de mohos y levaduras *Sal-levadura de Davis*





Anexo 5. Cromatograma de ocratoxina en muestras contaminadas

