"EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE OCRATOXINA "A" EN ALMENDRAS DE CACAO, MEDIANTE EL MÉTODO DE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (HPLC), USANDO COLUMNAS DE FASE – REVERSA (SPE) Y CARACTERIZACIÓN AL HONGO PRODUCTOR DE OCRATOXINA "A"".

Alexander J. Toaza M.[1]
[1]Escuela Politécnica del Ejército, Departamento de Ciencias de la vida. Carrera de Biotecnología. Sangolquí-Ecuador. E-mail: alexandertoho@hotmail.com

RESUMEN

Los principales géneros de hongos de gran importancia asociados a la producción de Ocratoxina "A" (OTA) son *Aspergillus* y *Penicillium*. La Ocratoxina "A" es un metabolito secundario con propiedades neurotóxicas, inmunotóxicas, genotóxicas y teratogénicas sobre animales, y además ha sido clasificada por la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer como un posible cancerígeno en humanos (del grupo 2B). En Ecuador no existe una normativa de regulación para Ocratoxina "A" ni un programa sistemático de vigilancia y monitoreo en cacao. En este trabajo se realizó la evaluación de los niveles de Ocratoxina "A" por HPLC y la caracterización de los hongos que presentaron niveles de Ocratoxina "A" en las almendras de cacao. Para esto, se tomaron 42 muestras de las provincias de Esmeraldas, Los Ríos, Manabí, Guayas, El Oro y Santo Domingo. Al finalizar el estudio se determinó que en un 86% de las muestras analizadas no se encontró contaminación por OTA, mientras que en el 14% restante, presentaron bajas concentraciones de Ocratoxina "A", con valores inferiores a los límites establecidos en las normativas internacionales que corresponden a 10 $\mu g*Kg^{-1}$. Además en las muestras que fueron positivas en el análisis por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC), se determinó la presencia de hongos de los géneros: *Aspergillus, Cladosporium, Mucor, Moniliophthora, Epicoccum y Alternaria*. Por lo que se garantiza la calidad e inocuidad del cacao de producción nacional.

PALABRAS CLAVE: Ocratoxina "A" (OTA), Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC), caracterización de los hongos.

ABSTRACT

Main fungi genera of great importance associated with ochratoxin A (OTA) production are *Aspergillus* and *Penicillium*. Ochratoxin A is a secondary metabolite with neurotoxic, immunotoxic, genotoxic and teratogenic properties on animals, and has also been classified by the International Agency for Research on Cancer as possibly carcinogenic to humans (Group 2B). In Ecuador, there are no regulatory rules concerning ochratoxin A, nor a surveillance and monitoring systematic program of cocoa. In this work, an evaluation of ochratoxin A levels by HPLC and characterization of fungi that presented ochratoxin A levels in cocoa beans were carried out. To do this, 42 samples were taken from the following provinces: Esmeraldas, Los Ríos, Manabí, Guayas, El Oro and Santo Domingo. When the study ended, it was determined that 86% of the analyzed samples were not contaminated by OTA, whereas the remaining 14% had low ochratoxin A concentrations, with values below the limits set by international standards, corresponding to 10 $\mu g*Kg^{-1}$. Besides, samples that tested positive in the analysis by High-performance liquid chromatography (HPLC), it was determined that fungi of the genera *Aspergillus, Cladosporium, Mucor, Moniliophthora, Epicoccum* and *Alternaria* were present. Thus, quality and harmlessness of the national cocoa production are guaranteed.

KEY WORDS: ochratoxin A (OTA), High-performance liquid chromatography (HPLC), characterization of fungi.

INTRODUCCIÓN

Los contaminantes microbiológicos y químicos representan un riesgo concreto para la salud. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha caracterizado tres tipos fundamentales de contaminantes en los alimentos: las micotoxinas, ficotoxinas y toxinas vegetales; que provocan enfermedades trasmitidas por los alimentos (OMS, 2002). De éstas, las micotoxinas son las que provocan mayores daños a nivel económico y de salud, por lo que han merecido tanta atención hasta ahora. En varios países representan un tema de vital importancia relacionado con la inocuidad de los alimentos (FAO, 2004). Las condiciones de producción, almacenamiento, transporte y distribución desempeñan un papel muy importante en el crecimiento y proliferación de los hongos productores de micotoxinas.

De acuerdo con la Organización de Agricultura y Alimentos de las Naciones Unidas (FAO, 1996), hasta un 25% de las cosechas de alimentos a nivel mundial están contaminadas con algún tipo de toxina de origen fúngico. Aunque resulta difícil de cuantificar, las pérdidas económicas causadas por las micotoxinas representan una carga enorme tanto a nivel de salud pública como de productividad animal. Es por eso que el aseguramiento de la inocuidad de los alimentos se ha constituido en los últimos años en una meta importante de acción internacional y nacional (FAO, 2004).

El estudio de las micotoxinas es muy importante debido a su alto nivel de toxicidad y por las crecientes demandas legislativas sobre el contenido de micotoxinas de los diferentes productos (Anklam *et al*., 2002, citado por Bunaciu, 2010); sin embargo, en el Ecuador no existen parámetros de control dentro de la norma INEN para ningún tipo de producto susceptible a contaminación, ni investigaciones referentes a la incidencia de ocratoxina "A" en los productos de consumo humano. En consecuencia, la presencia de micotoxinas constituye un serio problema para la salud debido a su elevada toxicidad y a sus efectos nocivos y/o cancerígenos.

Estudios sobre micotoxinas tienen gran transcendencia a nivel mundial, debido a los daños que éstas causan a la salud de la población, así como las pérdidas económicas ocasionadas por los alimentos contaminados. Investigaciones en todo el mundo indican que las pérdidas de alimentos a causa de las micotoxinas rodean los 1000 millones de toneladas al año, la contaminación de aquellos productos susceptibles, ocurre como resultado de las condiciones medio ambientales en el campo, así como también por las condiciones inadecuadas en que son realizadas las operaciones de cosecha, almacenamiento y procesamiento del producto (FAO, 2011).

MATERIALES Y MÉTODOS

Protocolo de Muestreo

El muestreo se realizó en diferentes provincias del país, donde se comercializa cacao: Esmeraldas, Los Ríos, Manabí, Guayas, El Oro y Santo Domingo de los Tsáchilas, en las que se tomarán 7 muestras de 300 gramos en cada provincia. El muestreo fue aleatorio para garantizar que cada uno de los elementos de la población tenga la misma oportunidad de ser incluidos en la muestra. Se

recolectaron 42 muestras de 300 g para que el estudio sea estadísticamente significativo y se analizaron por duplicado, con un total de 84 ensayos experimentales.

Protocolo de Curva de Calibración

Para la preparación de la curva de calibración se partió de una solución stock de 102 $ng*mL^{-1}$ de Ocratoxina "A" en acetonitrilo, la cual se mantuvo almacenada en congelación.

En base a esta solución stock se pipetearon los volúmenes listados en la tabla 2.2, en balones aforados de 10 mL. Cada balón fue aforado con fase móvil acetonitrilo-agua-ácido trifluoroacético (TFA) (40:59.7:0.3, v/v/v). Estas soluciones se debieron preparar cada vez que se realice una curva de calibración.

Protocolo de Extracción, Purificación y Cuantificación

Método de Extracción

Para la extracción se molieron las almendras de cacao, obteniendo partículas de tamaño pequeño, lo que permitió una mayor superficie de contacto entre el material molido y el solvente. La muestra de almendras de cacao más ácido ascórbico, fueron extraídos con Metanol – Agua. Posteriormente al extracto metanólico se le ajustó a un pH adecuado y una cierta cantidad fue retirada y evaporada a sequedad por corriente de nitrógeno y ulteriormente se redisolvió.

Método de Purificación

Se colocaron las columnas de Fase – Reversa: Varian - Bond Elut C18, 500mg de 3 mL en el Manifold, se las pretrató y posteriormente se cargaron las muestras, las cuales fueron lavadas y eluídas.

Método de Cuantificación

El equipo de HPLC que fue usado en esta investigación es un *Ultimate 3000 ×2 Dual Analytical LC System* de Dionex, con un detector de fluorescencia modelo FLD-3400RS con una longitud de onda de excitación de 330nm y una longitud de onda de emisión de 460nm. La columna del equipo fue una Dionex Acclaim 120; C_{18}, 5µm; 120Å, 4.6×150 mm con una fase móvil de acetonitrilo - agua- ácido trifluoroacético (TFA) (40:59.7:0.3, v/v/v). Ulteriormente se inyectó 50 uL de cada muestra en el equipo HPLC a una velocidad de flujo de 1.5 mL/min y se cuantificó la concentración de la ocratoxina "A" comparando la área del pico o cantidad con la curva de calibración del estándar en el software del equipo CHROMELEON.

Caracterización de hongos presentes en almendras de cacao

Las muestras que fueron utilizadas para la caracterización, son las que presentaron niveles de Ocratoxina "A" positivos en cantidades menores a 10 $µg.Kg^{-1}$ y de una muestra negativa (Blanco).

A las muestras se las homogenizó para la selección de submuestras al azar, posteriormente se sembraron diez submuestras por caja Petri que contenían PDA (Potato Dextrosa Agar) y cloranfenicol, en un pH de 5.5. El proceso de siembra se realizó de acuerdo a la metodología propuesta por Agrios (2005) y ulteriormente la incubación se llevó a

cabo a 25°C por cuatro semanas, en una incubadora Memmert.

Una vez transcurrida una semana, se realizó la purificación mediante el traslado de las colonias a tubos de ensayo que contenían PDA. Los tubos fueron colocados en incubación a 25°C. Una vez que los hongos manifestaron crecimiento pleno, éstos fueron cubiertos con aceite de vaselina esterilizado para su conservación, conforme manifiestan French & Herbert (1982).

Los hongos fueron clasificados de acuerdo a sus características, elaborando tablas con información de cada uno de los aislamientos con la ayuda de montajes de placas con Lactofenol, en una cabina de seguridad ThermoForma. Y se realizaron observaciones para identificar su taxonomía.

Todas las estructuras encontradas fueron fotografiadas empleando el objetivo de 40X con un microcoscopio Binocular Olympus, para realizar la identificación taxonómica a nivel de género, se utilizo la clave taxonómica formulada por Barnett & Hunter (2003).

RESULTADOS

Los resultados de está investigación se dividieron en dos partes: la primera fue la evaluación de los niveles de Ocratoxina "A" por HPLC y la segunda parte, la caracterización de los hongos, presentes en almendras de cacao.

El muestreo de cacao se realizó en varias provincias del país, según la Norma Técnica Ecuatoriana INEN 177:95, que establece el procedimiento para la toma de muestras del cacao en grano.

En el gráfico 1 se observa que en las muestras de cacao procedentes de las provincias de Santo Domingo de los Tsáchilas y Manabí, no se estableció la presencia de Ocratoxina "A"; en contraste, en las provincias de Esmeraldas, El Oro, Los Ríos y Guayas, si se determinó la presencia de OTA; sin embargo no existió diferencia estadística, debido a que las concentraciones de Ocratoxina "A" no difirieron significativamente entre si.

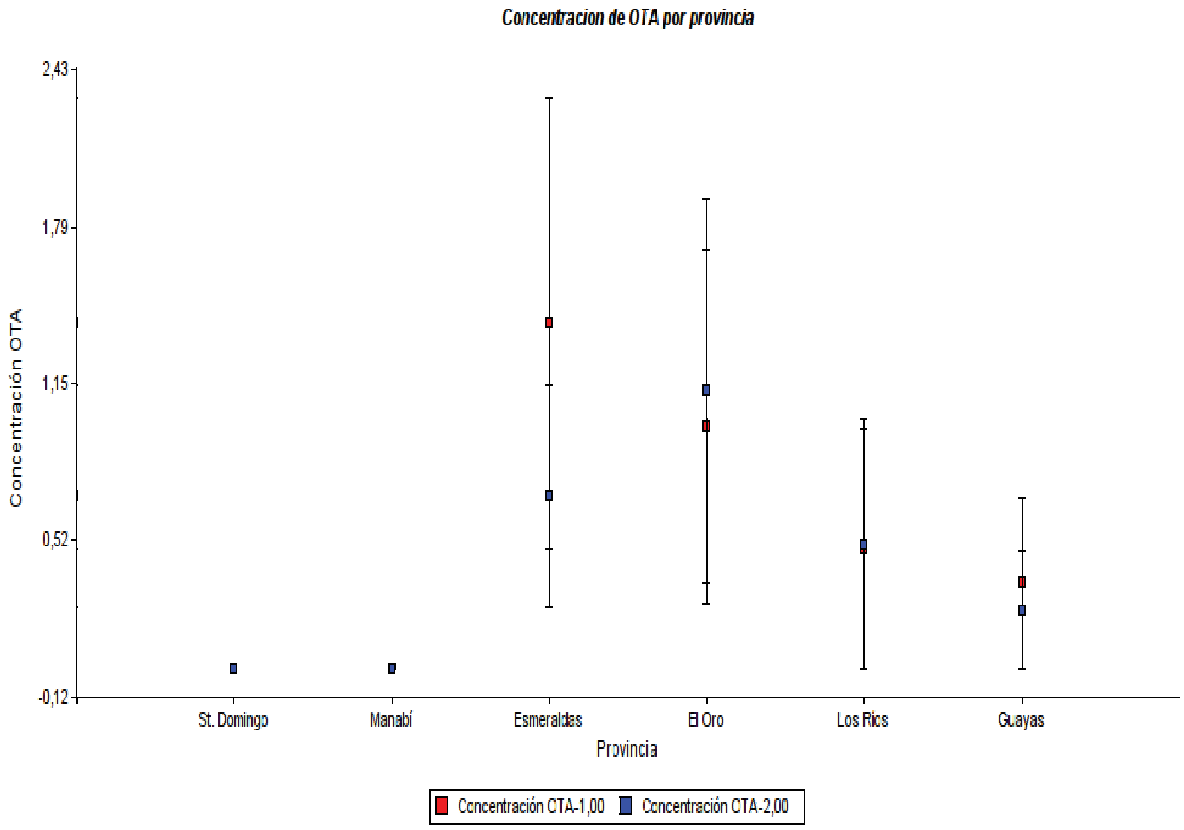

Gráfico 1: Gráfico de puntos para las concentraciones de Ocratoxina "A" en µg*Kg^{-1} por provincias (Toaza, 2012).

En el gráfico 2 se estableció que las concentraciones de Ocratoxina "A" obtenidas en el análisis de las muestras correspondieron a valores que se ubicaron por debajo de los señalados en la normativa para cacao, indicando que no existe contaminación superior a los límites permisibles. En el gráfico 3 se observa que algunas muestras se encuentran fuera del límite superior, indicando la ocurrencia de comportamiento dentro de la población de muestras analizadas. Esta realidad obliga a que se tenga un plan de control, para que se atenúe el incremento en la concentración de Ocratoxina "A", en las almendras de cacao.

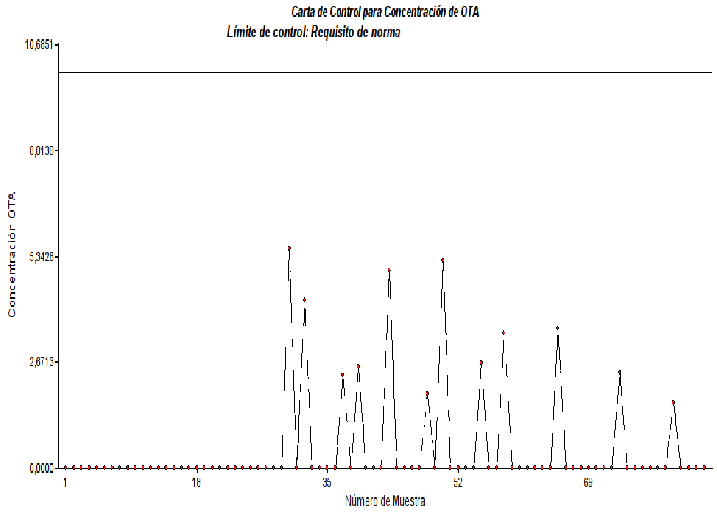

Gráfico 2: Carta de control para las concentraciones de OTA comparadas con el límite permisible del Códex Alimentario (Toaza, 2012).

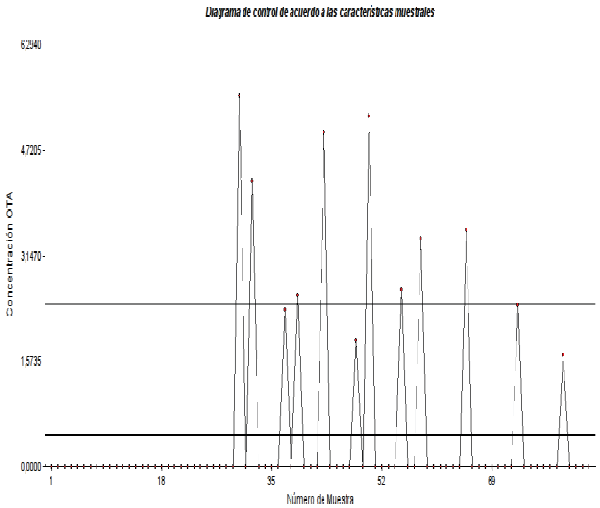

Gráfico 3: Carta de control para las concentraciones de OTA según los límites característicos de la población (Toaza, 2012).

Del análisis de la tabla 1 y del gráfico 4, se concluye que los datos obtenidos presentaron, en la primera categoría, una alta frecuencia correspondiente al 86% del total de muestras, que no acusaban contaminación de OTA. En las demás clases (2 – 6) se determinó que en el 14% de las observaciones, si existió contaminación por OTA; sin embargo, los niveles que se presentaron en la investigación fueron menores a la normativa. Por lo que se deduce que el 100% de las muestras cumple con la norma establecida por el Códex Alimentario, en lo referente a los niveles de Ocratoxina "A", permitidos en grano de cacao.

Tabla 1: Frecuencias de niveles de concentración de OTA (Toaza, 2012).

Variable	Clase	LI	LS	MC	FA	FR
Concentración OTA	1	0.00	0.92	0.46	72	0.86
Concentración OTA	2	0.92	1.84	1.38	1	0.01
Concentración OTA	3	1.84	2.77	2.31	5	0.06
Concentración OTA	4	2.77	3.69	3.23	2	0.02
Concentración OTA	5	3.69	4.61	4.15	1	0.01
Concentración OTA	6	4.61	5.53	5.07	3	0.04

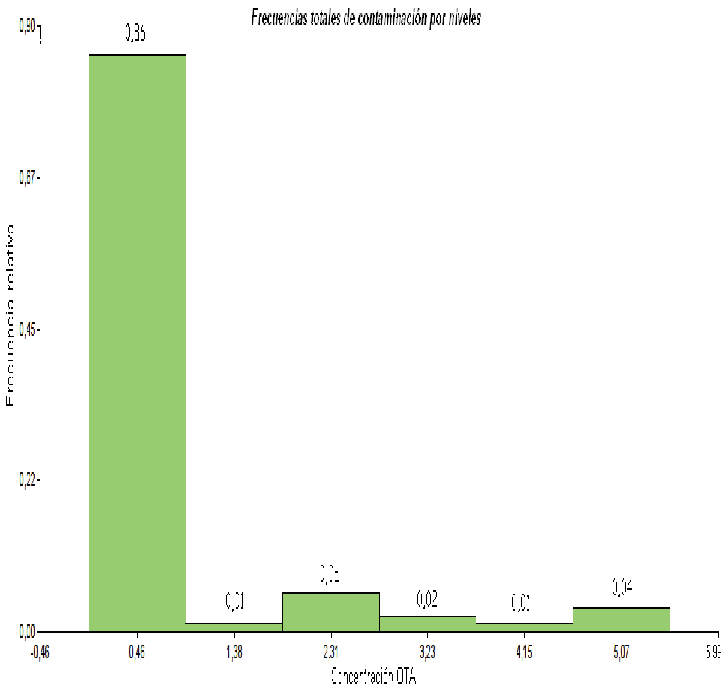

Gráfico 4: Frecuencias relativas para las concentraciones de Ocratoxina "A" en las muestras de almendras de cacao (Toaza, 2012).

También se realizó la Prueba de t para una media con un nivel de significancia de 0,05.

Se tomaron en cuenta las siguientes hipótesis:

a) **Hipótesis nula:** La concentración de Ocratoxina "A" presente en almendras de cacao es mayor o igual que el límite permisible por el Códex Alimentario Internacional, estableciendo Brasil un nivel máximo para la OTA en las semillas de cacao de 10 $\mu g*Kg^{-1}$.

b) **Hipótesis alterna:** La concentración de Ocratoxina "A" presente en almendras de cacao es menor que el límite permisible por el Códex Alimentario Internacional, estableciendo Brasil un nivel

máximo para la OTA en las semillas de cacao de 10 µg*Kg^{-1}.

En tabla 2 se consigna el valor de t igual a -68,02 y con una p < 0,0001 este valor de significancia es menor que 0,05, por lo que se rechaza la hipótesis nula y se acepta la alterna, afirmando que las concentraciones de Ocratoxina "A" fueron menores que el límite permisible establecido por el Códex Alimentario Internacional.

Tabla 2: Prueba de t para una media, en base a los niveles de concentración de OTA (Toaza, 2012).

Valor de la media bajo la hipótesis nula : 10

Variable	n	Media	DE	LS(95)	T	p(Unilateral I)
Concentración OTA	84	0,48	1,28	0,71	-68,02	<0,0001

Resultado de la caracterización de los hongos.

Para los análisis micológicos se realizó cinco repeticiones de cada muestra, de aquellas que presentaron niveles de Ocratoxina "A" inferiores a la normativa establecida, mediante el análisis realizado por HPLC, y de una muestra que no presentó Ocratoxina "A" (Blanco).

En las figuras 5, 6 y 7 se observa la distribución de hongos que afectan a las almendras de cacao muestradas en cada provincia y sus porcentajes de ocurrencia correspondientes. Como se puede notar, el hongo que manifestó una mayor prevalencia fue *Mucor*, seguido por *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Aspergillus*, *Moniliophthora* y *Alternaria*. En las provincias de Esmeraldas, El Oro, Los Ríos y Guayas fue donde se encontró mayor presencia de *Mucor*.

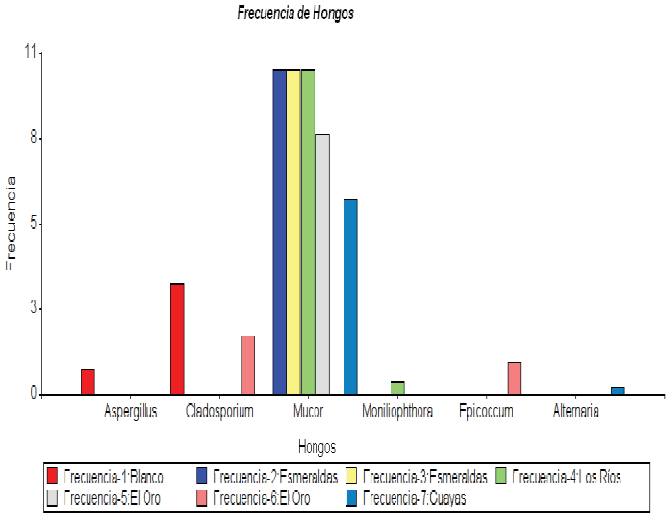

Gráfico 5: Distribución de hongos presentes en almendras de cacao, de muestras procedentes de las provincias (Toaza, 2012).

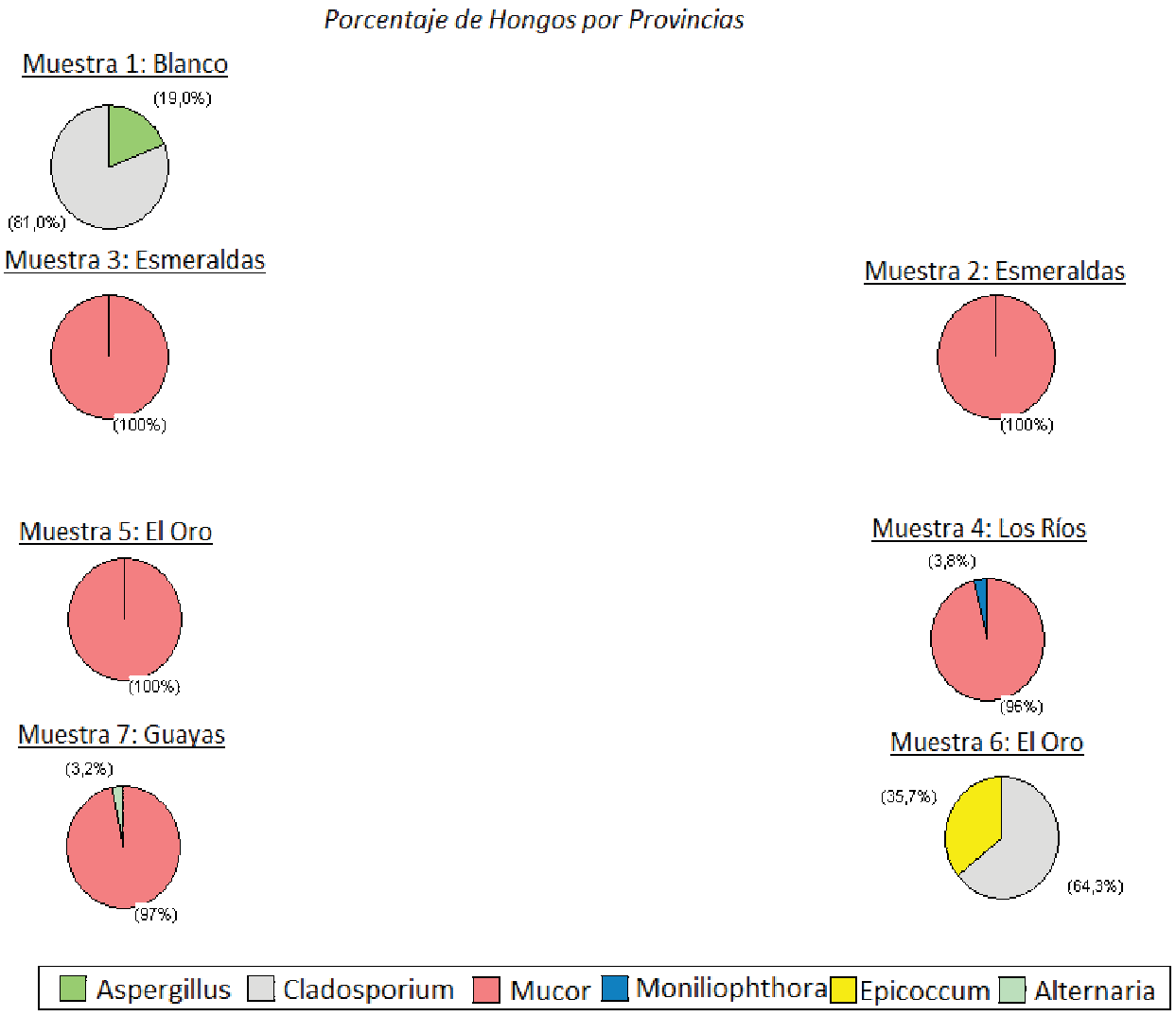

Gráfico 6: Distribución porcentual de hongos aislados de almendras de cacao presentes en muestras obtenidas de cada provincia (Toaza, 2012).

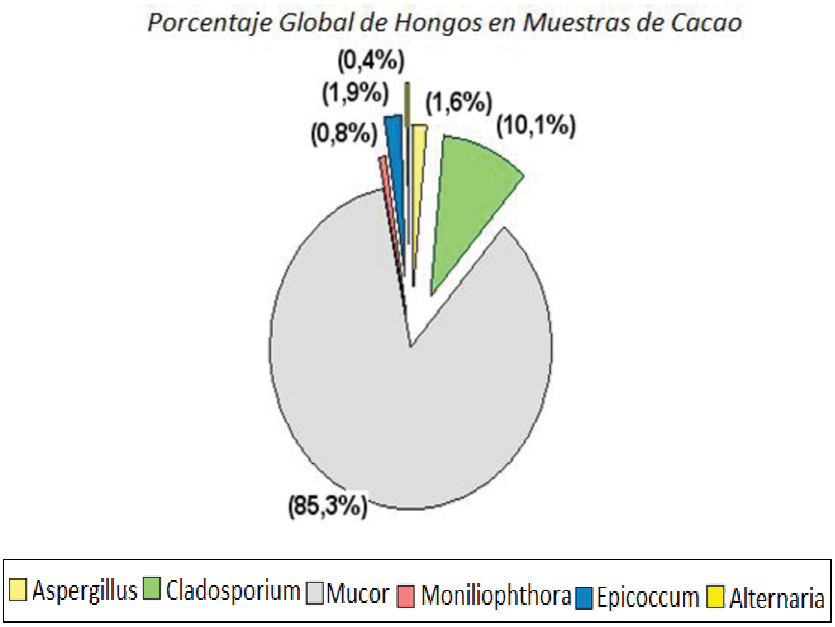

Gráfico 7: Gráfico de Sectores en base a la incidencia de hongos, identificados en almendras de cacao, muestreadas en diversas provincias (Toaza, 2012).

Con los datos obtenidos en los gráficos anteriores, se comprueba en la tabla 3 que *Mucor* fue el hongo más frecuente, por lo tanto tiene un comportamiento distinto a los demás hongos que estuvieron en una proporción menor. En la prueba de Kruskal Wallis se obtuvó un valor de $p<0.0001$ por lo que se aceptó la hipótesis alterna, la que indica que al menos alguno de los hongos tuvo un comportamiento diferente con los demás hongos que fueron identificados.

Se tomó en cuenta las siguientes hipótesis:

a) **Hipótesis nula:** Los hongos presentes en la investigación se encuentran en igual proporción.

b) **Hipótesis alterna:** Por lo menos uno de los hongos no se encuentra en igual proporción.

Tabla 3: Prueba de Kruskal Wallis, para el análisis comparativo de hongos presentes en las muestras de cacao (Toaza, 2012).

Variable	Hongo	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
conteo	*Alternaria*	35	0.03	0.17	0.00	32.98	<0.0001
conteo	*Aspergillus*	35	0.11	0.53	0.00		
conteo	*Cladosporium*	35	0.74	2.12	0.00		
conteo	*Epicoccum*	35	0.14	0.85	0.00		
conteo	*Moniliophthora*	35	0.06	0.34	0.00		
conteo	*Mucor*	35	6.29	4.90	10.00		

Trat.	Ranks	
Alternaria	92.09	A
Moniliophthora	92.14	A
Epicoccum	92.24	A
Aspergillus	94.76	A
Cladosporium	103.13	A
Mucor	158.64	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p<=0,05)

DISCUSIÓN

El cacao es el producto ecuatoriano de exportación tradicional con mayor historia en la economía del país, e involucra a cerca de 100.000 familias. Su importancia en la economía radica en que el cacao, en el 2010, fue el quinto producto más exportado por el Ecuador, dentro de las exportaciones no petroleras, después del banano, pescados y crustáceos, preparaciones de carne y flores (PRO ECUADOR, 2011).

Los países importadores demandan controles permanentes y estrictos que cada vez son más exigentes en cuanto a la seguridad y la inocuidad de los alimentos, como el cacao, que se puede ver afectado por contaminantes como la Ocratoxina "A", que es considerada cancerígena (INIAP, 2012).

Al no disponer de datos relacionados con la incidencia de este contaminante natural, producida por hongos presentes en almendras de cacao, se propuso esta investigación que se ejecutó con apoyo de la Agencia Ecuatoriana del Aseguramiento de la Calidad del Agro (AGROCALIDAD), la Carrera de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias y la Carrera de Ingeniería en Biotecnología.

Esta investigación permitió determinar la existencia de Ocratoxina "A" y establecer si los niveles de Ocratoxina "A" presentes en las

almendras de cacao, se sujetaban o no a los límites permisibles. Las muestras analizadas fueron de las provincias de Esmeraldas, Los Ríos, Manabí, Guayas, El Oro y Santo Domingo de los Tsáchilas.

De acuerdo a los resultados obtenidos, en un 14% del total de muestras de almendras de cacao analizadas se presentaron bajas concentraciones de Ocratoxina "A", cuyos valores oscilaron entre: [1.66 $\mu g*Kg^{-1}$; 5.53 $\mu g*Kg^{-1}$], de estos datos se deduce que algunas muestras exhibieron contaminación con Ocratoxina "A"; pero, en niveles inferiores a los límites señalados en las normativas internacionales que son de 10 $\mu g*Kg^{-1}$, comprobándose esta aseveración con la prueba de t al aceptar la hipótesis alterna formulada (ANVISA CP100/2009, citado por CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. 2008). En un 86% de las muestras analizadas no se encontró contaminación por OTA.

Sin embargo, se encontró presencia de esta micotoxina, la exposición de los consumidores a esta sustancia es inferior a la considerada segura, pero es necesario continuar investigando y desarrollar también un programa de control, que sirva de instrumento para recopilar datos más específicos sobre metabolitos secundarios que proponen Herrera–Estrella & Carsolio (1998).

En el gráfico de control 3, se obtuvó como resultado diferencias de comportamiento en la población, por lo que se debería tener una inspección adecuada de OTA, para que no exista un incremento de esta micotoxina, esto se lograría implementando buenas prácticas de precosecha y poscosecha con programas de análisis de peligros y de puntos críticos de control, que son eficaces en la prevención de micotoxinas conforme establece ELIKA (2007).

El cacao es una planta con su producto comercial susceptible al ataque de microorganismos antes y después de la cosecha y durante su almacenamiento; tal es el caso de los hongos contaminantes, los cuales pueden provocar grandes pérdidas en la producción (CATIE, 2007; Herrera–Estrella & Carsolio, 1998). Al respecto, se conoce que *Moniliophthora* ocasiona serios problemas fitosanitarios que produce perdidas en la producción; este hongo fue detectado en las almendras (Oleas, 2012). Por otra parte, este tipo de microorganismos son capaces de producir sustancias, como resultado de su metabolismo secundario, como las micotoxinas, que se distribuyen con facilidad en el substrato y pueden llegar a ser perjudiciales, aún cuando se encuentran en concentraciones muy bajas, poniendo en entredicho su inocuidad, ya que un 25 % de las cosechas de alimentos a nivel mundial están contaminadas con algún tipo de micotoxinas, lo cual representa un fuerte riesgo para la salud de la población de países importadores de alimentos que no controlan estos contaminantes (FAO, 2001).

Al ser el cacao un fruto de consumo local e internacional, se debe brindar al mercado un producto de calidad, que cumpla con todos los parámetros para su consumo (INIAP, 2012); cabalmente, este fue el propósito de la investigación, al generar información sobre los niveles de OTA, presente en almendras de cacao destinados para ambos frentes de consumo.

En Ecuador se carece de conocimientos previos que permitan la

detección oportuna de sustancias tóxicas producidas por hongos contaminantes que atacan a cereales, granos, frutas y hortalizas, lo cual representa un posible riesgo para la salud del consumidor (Lagunes & Trigos, 2006). A pesar de haber aumentado el número de investigaciones relacionadas con la producción de metabolitos secundarios a partir de hongos contaminantes, actualmente la falta de información adecuada y que la normativa para ciertas matrices es limitada, en contraste con países que si controlan de manera integral la calidad, fitosanidad y seguridad alimentaria de los productos (Espinoza & Ramírez, 2007), por lo que es necesario, que nuestro país cuente con más equipos de trabajo capaces de estudiar estas sustancias y de marcar límites permisibles, tanto de micotoxinas como de otras sustancias en los diferentes grupos de alimentos y, con ello, establecer la normatividad correspondiente, de manera que se lleven a la práctica mejores controles en materia de seguridad alimentaria, tal como se hace en países de Europa y Estados Unidos (Espinoza & Ramírez, 2007).

En las muestras de cacao que fueron analizadas en la investigación, se encontró presencia de hongos tales como: *Aspergillus, Cladosporium, Mucor, Moniliophthora, Epicoccum y Alternaria*, que se consideran hongos prevalentes en condiciones de almacenamiento; sin embargo *Moniliophthora* es reconocido como fitopatógeno clásico, mismo que puede ser transportado, desde el campo, en las almendras de cacao (Oleas, 2012).

De los hongos citados, se encuentran distribuidos de la siguiente manera: 85,3% de *Mucor*, 10,1% de *Cladosporium*, 1,9% de *Epicoccum*, 1,6% de *Aspergillus*, 0,8% de *Moniliophthora* y 0,4% de *Alternaria*. La variabilidad de un desarrollo fúngico significativo, se debe a las condiciones tropicales y subtropicales que favorecen su proliferación, la cual puede presentarse en los productos agrícolas cuando estos aún están en el campo, después de la cosecha o durante el almacenamiento (Frisvad & Samson, 1992). La mayoría de los hongos micotoxigénicos son contaminantes habituales en productos agrícolas, ya que son capaces de crecer en cultivos, hojas, tallos, cereales, semillas, etc. (Betina 1984; Jarvis & Williams, 1987).

La micoflora encontrada en las muestras analizadas, contienen dos grupos de géneros ecológicamente definidos como hongos de campo (antes de la cosecha) y de almacenamiento (Christensen & Kaufmann, 1969). El primer grupo esta constituido fundamentalmente por: *Moniliophthora* y el segundo por *Aspergillus, Alternaria, Cladosporium*, *Epicoccum* y *Mucor*. Bajo las condiciones apropiadas, los hongos proliferan, crecen colonias y los niveles de micotoxinas aumentan. Debido a que las condiciones para el crecimiento fúngico son diferentes en el campo y en el almacenaje, pueden existir diferentes poblaciones de hongos, lo cual resulta en un cóctel de micotoxinas (Northolt & Van Egmond, 1982).

Los géneros *Alternaria*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Aspergillus* y *Mucor* son conocidos por segregar sustancias como consecuencia de su metabolismo secundario y son capaces de sintetizar micotoxinas perjudiciales para la salud del hombre y de los animales (Pietri *et al*, 2001).

En el caso de *Moniliophthora* es un hongo que no produce micotoxinas pero según Northolt &Van Egmond, (1982) señala que la presencia de hongos en productos agrícolas no indica necesariamente una contaminación con micotoxinas pero si es un factor de riesgo importante para que ésta se produzca. Así mismo, la ausencia de crecimiento fúngico aparente no garantiza la ausencia de estas toxinas. Adicionalmente se puede afirmar, que existe la probabilidad de contaminación de las almendras con este hongo a nivel de campo, puesto que ocasiona la moniliasis del cacao, pudiéndose asumir que los agricultores pueden utilizar almendras de frutos que acusan un nivel bajo o medio de infección (Oleas, 2012).

El género *Mucor* fue el más predominante en las muestras analizadas. En investigaciones de Ocratoxina "A", también se ha encontrado presencia de este hongo y de igual manera del género *Cladosporium*, como posibles productores de OTA (Suárez-Quiroz *et al*., 2004), sin embargo, se ha hecho poca investigación en lo que se refiere a la aparición de hongos micotoxigénicos y a la identificación de especies para la evaluación de micotoxinas (Sánchez –Hérvas *et al*., 2008).

La mayoría de hongos que fueron identificados en el estudio sintetizan micotoxinas, con excepción de *Moniliophthora*, pero no descartando de estudios posteriores que revelen lo contrario. Por la falta de estudios moleculares en géneros y especies de hongos, no se ha podido determinar si todos estos hongos caracterizados tienen la capacidad de producir OTA (Mounjouenpou *et al*, 2008).

En estudios realizados indican que los géneros fúngicos que producen la Ocratoxina "A" son *Aspergillus* y *Penicillium*, sin embargo, en el análisis micológico se obtuvó *Aspergillus* en la muestra blanco, que no presentó ninguna concentración en el análisis efectuado por HPLC; al respecto, Mounjouenpou, *et al* (2008), afirman que existen especies del género *Aspergillus* y *Penicillium* que no sintetizan Ocratoxina "A". En análisis recientes aún se está investigando otras especies de estos dos géneros que puedan producir OTA (Mounjouenpou *et al*, 2008).

Otras investigaciones señalan que la incidencia de las especies del género *Aspergillus* sección *Circumdati*, son considerados ocratoxigénicos de muy baja actividad por lo tanto según Sánchez –Hérvas (2008) *A. ochraceus* es probablemente una fuente relativamente poco importante de la OTA en los productos de cacao y según González (2010) señala que aunque la proporción de cepas de *A. ochraceus* productoras de OTA se estima en general elevada, los porcentajes varían según los autores: desde el 100% a porcentajes menores del 10%.

Las especies de *Penicillium* principales responsables de la producción de Ocratoxina "A" son *P. verrucosum*, *P. nordicum*, *P. citrinum* y *P. chrysogenum* (Lasram *et al*., 2007; Mounjouenpou *et al*., 2008). Y del género *Aspergillus* con un alto porcentaje en producción de OTA son el *A. niger* y *A. carbonarius* (Lasram *et al*., 2007; Mounjouenpou *et al*., 2008); no obstante en esta investigación, no fue identificado *Penicillium*, que es un hongo muy común en almacenamiento.

Los efectos de la OTA son principalmente teratógenos e immunotóxicos, y su toxicidad se centra especialmente en el riñón (el órgano más vulnerable a esta micotoxina), tal y como confirman las investigaciones realizadas hasta el momento en animales, que han vinculado su poder carcinogénico en la aparición de tumores renales. A pesar de todo, los expertos admiten que no existen datos que avalen una relación directa en humanos. La evaluación que ha realizado la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC), basada en datos de estudios de animales, concluye que esta toxina debe considerarse en la clasificación de riesgo 2B y definirse como posible carcinógeno en humanos (Suárez-Quiroz *et al*, 2004).

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación (FAO, 2011) en su análisis de peligros y puntos críticos de control (HACCP: Hazard Analysis Critical Control Point) para Ocratoxina "A", establece un método de gestión de la inocuidad de los alimentos integrado y completo, que se utiliza para realizar buenas prácticas agrícolas (BPA), en el período anterior a la recolección y de las buenas prácticas de fabricación (BPF), durante la elaboración (secado, almacenamiento) y distribución de los diferentes productos, con el objetivo de disminuir el riesgo en la salud humana y animal, por causa de hongos ocratoxigénicos (FAO, 2011).

En el análisis cromatográfico lo novedoso de la investigación es que se trabajo con cartuchos en Fase – Reversa (SPE) con eficientes resultados, obteniéndose una robustez del método, con un porcentaje de recuperación del 92.2%. Y el valor del coeficiente de correlación fue de un R^2 igual a 0,997; que permite señalar una buena linealidad entre la concentración de analito y su área asociada de respuesta. Se debe dejar en claro que entre más cercano a la unidad sea el valor de (R^2), mayor será la coherencia y reciprocidad entre los datos de la curva de calibrado (Aguilera *et al*., 2010).

En un comienzo se probó con ácido acético y ácido tricloroacético, pero los resultados de los picos no fueron los adecuados y para obtener un mejor tiempo de retención y forma de pico, se tuvo que determinar una composición adecuada de fase móvil (Jurado & Alcázar, 2010), por eso se utilizó ácido trifluoroacético logrando picos con forma Gaussiana en los cromatogramas. El mayor beneficio de los pH´s bajos usados en la cromatografía, es la eliminación del efecto de modo mixto que genera un incremento en el tiempo de retención y un ensanchamiento de picos (Esquivel *et al*., 2004). El TFA impide la ionización de grupos silanol en las columnas de HPLC, lo que minimiza la interacción de los sitios activos de silanol con restos de amina en los analitos y mejora la resolución del pico cromatográfico (ESA Biosciences, 2011). Pero al mismo tiempo se debe controlar el pH de 2.0 a 7.5, debido a la inestabilidad de las fases estacionarias fuera de este intervalo de pH. Se debe cumplir con este parámetro para que el deterioro de la columna no sea muy rápido (ESA Biosciences, 2011).

Finalmente otro aspecto importante, es que se pudo utilizar como confirmación un espectrómetro de masas, para determinar si los picos que se obtuvó de las muestras eran de Ocratoxina "A", ya que es un método más exacto y directo para determinar

masas atómicas y moleculares (Gómez, 2011).

CONCLUSIONES

- De un total de 42 muestras analizadas, en las provincias de Santo Domingo y Manabí no se encontró contaminación por Ocratoxina "A", mientras que en las provincias de Esmeraldas, El Oro, Los Ríos y Guayas se obtuvó contaminación por OTA.

- En un 86% de las muestras analizadas no se encontró contaminación por OTA, mientras que en el 14% restante, presentaron bajas concentraciones de Ocratoxina "A", con valores inferiores a los límites establecidos en las normativas internacionales que corresponden a 10 $\mu g*Kg^{-1}$.

- Se estableció el protocolo de extracción, purificación y determinación de Ocratoxina "A", mediante el uso de columnas de Fase – Reversa (SPE) y Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC), validado por los laboratorios de AGROCALIDAD.

- En las muestras que fueron positivas en el análisis por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC), se determinó la presencia de hongos, tales como: *Aspergillus, Cladosporium, Mucor, Moniliophthora, Epicoccum y Alternaria*.

- Bajo las condiciones apropiadas de temperatura, humedad relativa, etc., los hongos proliferan y se obtiene una mejor respuesta en el desarrollo de enfermedades, resultados que fueron evidenciados con la presencia de *Moniliophthora*, que es un hongo que puede ocasionar infección a nivel de campo y que puede ocasionar pérdidas de la producción.

BIBLIOGRAFÍA

Agilent Technologies. (2010). *Agilent SampliQ12 and 20-Position SPE Manifold Instructions.* Recuperado el 15 de Septiembre de 2011, de http://www.home.agilent.com/agilent/home.jspx?cc=EC&lc=eng. Estados Unidos.

Agrios, G.N. (2005). Fitopatología. Editorial Limusa. México. 838p.

Aguilera, C., Herrera, C., Ponce, J. (2010). Implementation, validation, and application of a new HPLC method to determine oxytetracycline in salmonid muscle tissue. *Journal of Aquatic Research, 38(2): 227-233*.

Argüelles, A., Freire, P., & Morán, M. (2010). Wikispace. Recuperado el 03 de Enero de 2012, de MICOLOGIA GENERAL: http://microral.wikispaces.com/5.+Micolog%C3%ADa+general

ANECACAO. 2009. Origen del cacao en el Ecuador. Recuperado el 8 de Septiembre de 2012, de http://www.anecacao.com/spanish/HistoriaCacao.aspx. Ecuador.

Betina, V. (1984). Mycotoxins: Production, isolation, separation and purification. Developments in Food Science. Editorial Elsevier. Netherlands. 45p.

Barnett, H.L., Hunter, B.B. (1998). Illustrated Genera of Imperfect *Fungi*. Editorial APS Press. U.S.A. 72, 94, 106, 132, 150, 240 p.

Bunaciu, D.M. (2010). Developing an HPLC-ESI-MS/MS method for

simultaneous determination of mycotoxins in maize flour and other matrices. Tesis University of Tartu, Institute of Chemistry.

CATIE. (2007). Competitividad y Ambiente en los Territorios Cacaoteros de Centroamérica. Recuperado el 15 de Octubre de 2011, de http://www.catie.ac.cr/BancoMedios/Documentos%20PDF/pcc_version_11_07.pdf. Costa Rica.

Centre for Food Safety. Ochratoxin A in Food. (2006). Recuperado el 3 de Octubre de 2011, de http://www.cfs.gov.hk/english/programme/programme_rafs/programme_rafs_fc_01_02_och.html. Estados Unidos.

Christensen, C. M., Kaufmann, H. H. (1969) Grain storage: The role of fungi in quality loss. Editorial University of Minnesota Press, Minneapolis. 40p.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. 2008. Discussion paper on ochratoxin A in cocoa. Rome, Italy: WHO/ FAO. p.2.

Dean, J.R. (1998). Extraction Methods for Environmental Analysis. Editorial Wiley. Chichester. 97p.

DIONEX. (2011). *Ultimate 3000 ×2 Dual Analytical LC System.* Recuperado el 11 de Octubre de 2011, de http://www.dionex.com/en-us/products/liquid-chromatography/lc-systems/standard/x2-dual-analytical/lp-72464.html. Estados Unidos.

Egas, j. (2010). Efecto de la inoculación con A*zotobacter* sp. en el crecimiento de plantas injertadas de cacao (*Theobroma cacao*), genotipo nacional, en la provincia de Esmeraldas. Tesis de Pregrado. Escuela Politécnica Nacional. Facultad de Ingeniería Agroindustrial.

ELIKA. (2007). Micotoxinas en alimentos y piensos. Recuperado el 5 de Septiembre de 2011, de http://www.elika.net/datos/articulos/Archivo890/berezi%2017%20FINAL.pdf. España.

Enríquez, G. (2004). "CACAO ORGÁNICO - Guía para productores ecuatorianos". INIAP, Manual Nro. 54. Ecuador, 76 p.

ESA Biosciences. (2011). Guidelines for the use of TFA in HPLC methods using charged aerosol detection. Recuperado el 30 de Octubre de 2011, de http://www.coronaultra.com/Applications/Tech/70-8458-Guidelines-for-use-of-TFA-in-HPLC-methods-using-CAD. Estados Unidos.

Espinoza, C., Ramírez, K. (2007). Hongos y seguridad alimentaria. Editorial Zulueta. Veracruz. 102p.

Esquivel, E., Guadarrama, L. (2004). Métodos fisicoquímicos en Biotecnología. Recuperado el 20 de Septiembre de 2011, de http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/cromatografia_de_fase_reversa.pdf. México.

European Mycotoxins Awareness Network. (2010). *Ochratoxins*. Recuperado el 10 de Octubre de 2011, de http://www.mycotoxins.org/

FAO. (2001). Manual de capacitación. La importancia de comer frutas y hortalizas. Estudio FAO Alimentación y Nutrición N° 46. Roma.

FAO. (1996). Manuales para el control de calidad de los alimentos. La garantía de la calidad en el laboratorio

químico de control de los alimentos. Food & Agriculture Org. Estados Unidos.

FAO. (2011). Organización de las naciones unidas para la Agricultura y Alimentación FAO. Recuperado el 16 de Enero de 2012, de http://www.fao.org/index_es.htm. Estados Unidos.

FAO. (2004). Reglamentos a nivel mundial para las micotoxinas en los alimentos y en las raciones en el año 2003. Recuperado el 5 de Septiembre de 2011, de ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/007/y5499s/y5499s00.pdf. Estados Unidos.

French, E.R., Herbert, T.T. (1982). Métodos de Investigación Fitopatológica. Primera Edición; Primera Reimpresión. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura – IICA. San José, Costa Rica. 290p.

Frisvad, J.C., Samson, S.A. (1992). Filamentous fungi In foods and feed: ecology, spoilage and mycotoxin production. Handbook of applied mycology. Editorial Marcel Dekker. New York. 68p.

Fritz, J. S. (1999). Analytical solid-phase extraction. Editorial John Wiley & Sons. Reino Unido. 35p.

Gómez, M. (2011). Determinación de micotoxinas en huevo utilizando un método de extracción basado en el procedimiento Quechers y análisis mediante Cromatografía de Líquidos de Ultra Presión acoplada a Espectrometría de masas en tándem. Tesis de Maestría. Universidad de Almería. Departamento de Hidrogeología y Química Analítica.

González, A (2010). Diagnóstico y control de especies de *Aspergillus* productoras de Ocratoxina A. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de ciencias biológicas. Departamento de Genética.

Herrera–Estrella, A., Carsolio, C. (1998). *Medio ambiente, control biológico y hongos parásitos. Avance y Perspectiva* 17: 195–204.

Huff, W.E., Hamilton, P.B. (1979). Mycotoxins - their biosynthesis in fungi: Ochratoxins - metabolites of combined pathways. *Journal of Food Protection*, 42: 815-820.

Hurst, W.J., Martin, R.A. (1998). High – performance liquid chromatographic determination of ochratoxin A in artificially contamined cocoa beans using automated sample clean – up. *Journal of Chromatography, 810, 89-94.*

INIAP 2009. Manual de cultivo de cacao para la Amazonía ecuatoriana. Recuperado el 05 de Septiembre de 2011, de http://www.iica.int.ni/Estudios_PDF/cultivoCacaoEcuador.pdf. Ecuador.

INIAP. (2012). Programa Nacional del Cacao. Recuperado el 5 de Septiembre de 2011, de http://www.iniap.gob.ec/sitio/index.php?option=com_content&view=article&id=19:cacao&catid=6:programas&Itemid=12. Ecuador.

Jarvis, B., Williams, A. (1987). Methods for detecting fungi in foods and beverages. Editorial Beuchat. New York. 636p.

Jurado, J., & Alcázar, A. (2010). Química Analítica Avanzada. Recuperado el 15 de Septiembre de 2011, de

http://personal.us.es/jmjurado/docs/HPLC20092010.pdf

Lagunes, A. L., Trigos, A. (2006). *Hongos en los alimentos. Ciencia y el Hombre* 2: 41–42.

Lasram, S., Belli, N., Chebil, S., Nahla, Z., Ahmed, M., Sanchis, V., Ghorbel, A. (2007). Occurrence of ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in grapes from Tunisian vineyard. *Journal of Food Microbiology, 114, 376–379*.

Maridueña, M. (2011). Estudio de la micobiota patogénica de "cacao criollo" (*Theobroma cacao*) en cinco provincias de la costa ecuatoriana y evaluación de la efectividad *in vitro* de los bioles locales para su control. Tesis de Maestría. Escuela Superior Politécnica del Litoral. Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la Producción.

Martínez, G. (15 de Febrero de 2012). Determinación de la concentración de Ocratoxina "A" en la muestra. (A. J. Toaza, Entrevistador).

Mounjouenpou, P., Gueule, D., Fontana-Tachon, A., Guyot, B., Tondje, R., Joseph-Pierre G. (2008).Filamentous fungi producing ochratoxin a during cocoa processing in Cameroon. *Journal of Food Microbiology, 121, 234–241*.

NORMA TÉCNICA ECUATORIANA NTE INEN 177:95. Cacao en grano – Muestreo. Recuperado el 5 de Septiembre de 2011, de http://www.flordebaba.com/NORMA_T%C3%89CNICA_ECUATORIANA_NTE_INEN_176_y_177.pdf. Ecuador.

Northolt, M.D., Van Egmond, H.P. (1982).Contamination of ripening chees with *Aspergillus versicolor* and sterigmatocystin. Procedings of a fourh meeting on mycotoxins in animal disease. Editorial Alnwick, Northumberland. 92p.

OMS. (2002). Estrategia Global de la OMS para la inocuidad de los alimentos. Alimentos más sanos para una salud mejor. Inocuidad de los alimentos.

Oleas, A. (14 de Agosto de 2012). Entrevista personal. (A. J. Toaza, Entrevistador).

Paredes, M., Montero, O., Del Aguila, C. (2004). Manual del cultivo del cacao. Recuperado el 7 de Septiembre de 2011, de http://webmail.radiomaranon.org.pe/redmaranon/archivos/cacao_manual_cultivo.pdf.

Pietri, A., Bertuzzi, T., Pallaroni, L., Piva, G. (2001). Occurrence of ochratoxin A in Italian wines. *Food Additives and Contaminants 18, 647-654*.

Prats, G. (2007). Microbiología clínica. Editorial Médica Panamericana. Madrid -España. 360p.

PRO ECUADOR. (2011). Análisis sectorial de cacao y elaborados. Recuperado el 15 Enero de 2012, de http://www.proecuador.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2011/11/PROEC-AS2011-CACAO.pdf

Rosero, J.L. (2002, Junio). La ventaja comparativa del cacao ecuatoriano. *Apuntes de Economía1, 1-39.*

Sánchez-Hervás, M., Gil, J.V., Bisbal, F., Ramón, D., Martínez-Culebras, P.V. (2008). Mycobiota and mycotoxin producing fungi from cocoa beans. *Journal of Food Microbiology, 125, 336–340*.

Sigma-Aldrich. (2011). *Sigma-Aldrich*. Recuperado el 15 de Octubre de 2011, de http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/fluka/34037?lang=en&region=EC. Estados Unidos.

Snyder, L.R., Kirkland, J.J., Glajch, J.L. (1997). Practical HPLC Method Development. Editorial John Wiley & Sons. New York. 120p.

Solá, I. (2010). Procedimiento PEE /LAB-M/01: Procedimiento específico de ensayo para determinación de micotoxinas. Quito.

Soriano del Castillo, J. M. (2007). *Micotoxinas en Alimentos.* España: Díaz de Santos.

Suárez-Quiroz, M., González-Rios, O., Barel, M., Guyot, B., Schorr-Galindo, S., Joseph - Pierre, G. (2004). Study of ochratoxin A-producing strains in coffee processing. *Journal of Food Science and Technology*, *39, 501–507*.

Toaza, A. (2012). Ejecutor de esta investigación. AGROCALIDAD.

Turcotte, A.M., Scott P.M. (2010). Ochratoxin A in cocoa and chocolate sampled in Canada. *Food Additives and Contaminants, 28(6), 762-766.*

Universal Taxonomic Services. 2008. "Taxon: *Theobroma cacao* Linnaeus - cocoa". Recuperado el 20 de Enero de 2012, de http://taxonomicon.taxonomy.nl/TaxonTree.aspx?id=6284. Estados Unidos.

WATERS. (2011). UHPLC-MS/MS. Recuperado el 15 de Marzo de 2011, de http://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=10160596&locale=es_ES. España.