

ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**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”.**

Previa a la obtención de Grado Académico o Título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

ELABORADO POR:

ALEXANDER JAVIER TOAZA MORA

SANGOLQUÍ, OCTUBRE DEL 2012

HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS

ELABORADO POR

Alexander Javier Toaza Mora

DIRECTORA DE LA CARRERA

Ing. Grace Tatiana Páez Barrera

Sangolquí, 17 de octubre de 2012

CERTIFICACIÓN

Dra. Elena Mafla

Ing. Tatiana Páez

Certifican:

Que el trabajo titulado, 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”, realizado por ALEXANDER JAVIER TOAZA MORA, ha sido guiado y revisado periódicamente y cumple normas estatutarias establecidas por la ESPE, en el Reglamento de Estudiantes de la Escuela Politécnica del Ejército.

Debido a que el presente trabajo es parte de las investigaciones realizadas por la Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad (AGROCALIDAD) y la Carrera de Ingeniería en Biotecnología, se deja en libertad del autor y de la Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad (AGROCALIDAD) y la Carrera de Ingeniería en Biotecnología para su publicación.

El mencionado trabajo consta de un documento empastado y un disco compacto el cual contiene los archivos en formato portátil de Acrobat (pdf). Autorizan a ALEXANDER JAVIER TOAZA MORA que lo entregue a ING. GRACE TATIANA PÁEZ BARRERA, en su calidad de Directora de la Carrera.

Sangolquí, 17 de octubre de 2012

Dra. Elena Mafla

DIRECTORA

Ing. Tatiana Páez

CODIRECTORA

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

Yo, Alexander Javier Toaza Mora

Declaro que:

El proyecto de grado denominado 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”, ha sido desarrollado con base a una investigación exhaustiva, respetando derechos intelectuales de terceros, conforme las citas que constan al pie de las páginas correspondientes, cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía. Consecuentemente este trabajo es de mi autoría.

En virtud de esta declaración, me responsabilizo del contenido, veracidad y alcance científico del proyecto de grado en mención.

Sangolquí, 17 de octubre de 2012

Alexander Javier Toaza Mora

AUTORIZACIÓN

Yo, Alexander Javier Toaza Mora

Autorizo a la Escuela Politécnica del Ejército la publicación, en la biblioteca virtual de la Institución del trabajo 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”, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Sangolquí, 17 de octubre de 2012

Alexander Javier Toaza Mora

DEDICATORIA

A ti DIOS MÍO, por no abandonarme, por demostrarme que soy uno de tus hijos preferidos. Gracias por ayudarme a levantarme en mis fracasos, por aprender de ellos y principalmente por permitirme llegar a este momento tan especial en mi vida y por siempre darme la fuerza, la sabiduría y la salud para lograr cada una de mis metas. Con mucho cariño principalmente a mis padres Rosy y Misael por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por su amor. A mis hermanos Fernando y Jorgito, que han sido ejemplo para que cada día me esfuerce y aproveche cada una de las oportunidades, en especial a mi hermano Fernando que ya no se encuentra físicamente conmigo, pero en todo momento sé que me acompaña, por eso a ti Nando, hermano querido, te dedico mi esfuerzo. A mi enamorada Sully, gracias por enseñarme a creer en uno mismo y que uno nunca debe darse por vencido, por ser mi alma gemela y por enseñarme a vivir al máximo, porque junto a ti, todo es alegría a mi alrededor. A mi sobrino Fernandito, tus risas me hacen sentir muy afortunado de tenerte conmigo.

Muchas gracias por llenar mi vida y formar parte de ella.

Alexander Toaza Mora

AGRADECIMIENTOS

Gracias DIOS, por estar conmigo en cada paso que doy.

Le agradezco a mi mami Rosy Mora y mi papi Misael Toaza ya que gracias a ellos soy quien soy hoy en día, fueron los que me dieron ese cariño y calor humano necesario, son los que han velado por mi salud, mis estudios, alimentación entre otros, son a ellos a quien les debo todo por formarme como una persona humilde y sencilla. También agradezco a mis hermanos los cuales han estado a mi lado, han compartido todos esos secretos y aventuras que solo se pueden vivir entre hermanos.

A mi gordita hermosa Sully. Te agradezco mucho por estar conmigo durante todo este tiempo como mi amor, mi compañera y sobre todo como una gran amiga, hemos compartido momentos maravillosos e inolvidables, en situaciones difíciles siempre has estado conmigo, motivándome, dándome fuerza para seguir adelante y para que no decaiga. Me has enseñado a luchar y a nunca darme por vencido, te estoy muy agradecido por ser parte de mi vida. Y fuiste tú, que con tu amor llenaste mi vida de felicidad. Gracias por amarme como solo tú lo puedes hacer.

A la Dra. Olga Pazmiño, por haberme dado la oportunidad de hacer el proyecto y al Quím. Gustavo Martínez por su amistad, sus consejos y por sus conocimientos que fortalecieron la investigación.

A la Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad (AGROCALIDAD) por su apoyo financiero y por su colaboración en la recolección de muestras para el desarrollo de esta investigación y al Instituto Agropecuario Superior Andino por haberme facilitado sus instalaciones y al personal de las dos entidades.

A mis directoras de tesis, Dra. Elena Mafla y la Ing. Tatiana Páez, que con sus conocimientos, su experiencia, su paciencia y su motivación han logrado en mí

que pueda terminar mis estudios con éxito. Al Quím. Jaime Gia, por guiarme con sus enseñanzas estadísticas para poder culminar mi tesis y al Ing. Abraham Oleas por su presencia incondicional, sus apreciados y relevantes aportes, críticas, comentarios y sugerencias durante el desarrollo de esta investigación.

Al Ingeniero Franklin Terán por haberme ayudado con las primeras muestras de la investigación.

A mis grandes amigos, en especial a Esteban Sánchez, Juan Pablo Tarambis y Edison Vega, por su amistad, sus consejos y todo su apoyo. Vivimos momentos inolvidables en la universidad. GRACIAS.

Alexander Toaza Mora

ÍNDICE DE CONTENIDOS

HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS.....	II
CERTIFICACIÓN	III
DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD	IV
AUTORIZACIÓN.....	V
DEDICATORIA	VI
AGRADECIMIENTOS.....	VII
ÍNDICE DE CONTENIDOS	IX
LISTADO DE TABLAS	XII
LISTADO DE ILUSTRACIONES Y GRÁFICOS	XIII
NOMENCLATURA.....	XV
RESUMEN	XVII
ABSTRACT	XVIII
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	1
1.1 Formulación del problema.....	1
1.2 Justificación del problema	2
1.3 Objetivos de la investigación	3
1.3.1 Objetivo Principal	3
1.3.2 Objetivos Específicos	3
1.4 Marco Teórico.....	4
1.4.1 El cacao.....	4
1.4.2 Clasificación taxonómica del cacao.....	6

1.4.3 Grupos genéticos del cacao	6
1.4.4 Postcosecha del cacao.....	11
1.4.5 Enfermedades fungosas en el cacao	16
1.5 Hongos productores de Ocratoxina “A”	22
1.5.1 Estructura química de las Ocratoxinas	23
1.5.2 Biosíntesis de Ocratoxina “A”	24
1.5.3 Factores implicados en la producción de Ocratoxina “A” y su presencia en productos alimenticios	26
1.5.4 Efecto de la contaminación por Ocratoxina “A”	29
1.5.5 Regulaciones internacionales.....	30
1.6 Detección de Ocratoxina “A”	32
1.7 Morfología de los hongos.....	33
1.8 Cultivo	33
1.9 Identificación.	34
1.10 Sistema de hipótesis.....	36
 CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS	 37
2.1 Participantes.....	37
2.2 Localización Geográfica	37
2.3 Periodo de Tiempo de investigación	38
2.4 Procedimientos y Equipos.	38
2.4.1 Protocolo de Muestreo.	38
2.4.2 Protocolo de Curva de Calibración	44
2.4.3 Protocolo de Extracción, Purificación y Cuantificación	45
2.4.4. Método de descontaminación del material	47
2.4.5 Estándar de Ocratoxina “A”	47
2.4.6 Manifold.....	48
2.4.7 Columnas de Fase Sólida (RP-SPE).....	48
2.4.8 HPLC (Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia).	49
2.4.9 Análisis por UHPLC-MS/MS.....	50
2.4.9 Caracterización de Hongos presentes en almendras de cacao	54

CAPÍTULO 3: RESULTADOS	56
CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN.....	68
CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES	75
CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES.....	77
CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA.....	79

LISTADO DE TABLAS

TABLA 1.1: Evaluación y clasificación de algunas micotoxinas en función de su toxicidad	30
TABLA 1.2: Contenido máximo de OTA tolerado en alimentos para los estados miembros de la Unión Europea	31
TABLA 2.1: Número de muestras elementales de cacao.....	42
TABLA 2.2: Preparación de soluciones estándares de trabajo	45
TABLA 2.3: Condiciones utilizadas para la cuantificación en el HPLC.....	46
TABLA 2.4: Condiciones utilizadas para la cuantificación en el Espectrómetro de Masas	53
TABLA 2.5: Parámetros específicos MS/MS para Ocratoxina “A”	53
TABLA 3.1: Concentración de Ocratoxina “A” en $\mu\text{g.kg}^{-1}$ en muestras provenientes de las provincias de Esmeraldas, Los Ríos, Manabí, Guayas, Santo Domingo de los Tsáchilas y El Oro	56
TABLA 3.2: Frecuencias de niveles de concentración de OTA.....	61
TABLA 3.3: Prueba de t para una media, en base a los niveles de concentración de OTA.....	62
TABLA 3.4: Resultados del análisis micológico de las muestras de almendras de cacao, provenientes de las provincias de Esmeraldas, Los Ríos, El Oro, Guayas y de la muestra que no presentó Ocratoxina “A” (Blanco).....	63
TABLA 3.5: Prueba de Kruskal Wallis, para el análisis comparativo de hongos presentes en las muestras de cacao	67

LISTADO DE ILUSTRACIONES Y GRÁFICOS

ILUSTRACIÓN 1.1: Mazorca de cacao criollo	7
ILUSTRACIÓN 1.2: Mazorca de cacao forastero	8
ILUSTRACIÓN 1.3: Mazorca de cacao trinitario.....	9
ILUSTRACIÓN 1.4: Mazorca de cacao genotipo nacional	10
ILUSTRACIÓN 1.5: Estructura química de las diferentes ocratoxinas	24
ILUSTRACIÓN 1.6: Estructura química de la Ocratoxina “A” (OTA)	24
ILUSTRACIÓN 1.7: Representación esquemática de la ruta de biosíntesis de OTA.....	26
ILUSTRACIÓN 1.8: Contribución media de diferentes alimentos a la ingesta diaria de OTA	29
ILUSTRACIÓN 2.1: Manifold.....	48
ILUSTRACIÓN 2.2: Extracción en Fase – Reversa (RP-SPE) de micotoxinas	49
ILUSTRACIÓN 2.3: HPLC y detector de fluorescencia	50
ILUSTRACIÓN 2.4: Xevo™ TQ-S de Waters UPLC-MS/MS.....	54
GRÁFICO 3.1: Gráfico de puntos para las concentraciones de Ocratoxina “A” en µg.kg-1 por provincias	59
GRÁFICO 3.2: Carta de control para las concentraciones de OTA comparadas con el límite permisible del Código Alimentario	60
GRÁFICO 3.3: Carta de control para las concentraciones de OTA según los límites característicos de la población.....	60

GRÁFICO 3.4: Frecuencias relativas para las concentraciones de Ocratoxina “A” en las muestras de almendras de cacao	61
GRÁFICO 3.5: Distribución de hongos presentes en almendras de cacao, de muestras procedentes de las provincias	64
GRÁFICO 3.6: Distribución porcentual de hongos aislados de almendras de cacao presentes en muestras obtenidas de cada provincia	65
GRÁFICO 3.7: Gráfico de sectores en base a la incidencia de hongos, identificados en almendras de cacao, muestreadas en diversas provincias	66

NOMENCLATURA

OTA: Ocratoxina "A"

HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (High Performance Liquid Chromatography).

OMS: Organización Mundial de la Salud.

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (Food and Agricultural Organization).

INEN: Instituto Ecuatoriano de Normalización.

SPE: Extracción en Fase Sólida (Solid Phase Extraction).

INIAP: Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias.

EFSA: Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria.

OTB: Ocratoxina "B".

OTC: Ocratoxina "C".

OT α : Ocratoxina α .

OT β : Ocratoxina β .

Acetil-CoA: Acetil Coenzima A.

a_w: Disponibilidad de Agua.

IARC: Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer.

UTT: Tumores del Tracto Urinario.

FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (Food and Drug Administration of United States).

TLC: Cromatografía en Capa Fina (Thin Layer Chromatography).

ELISA: Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay).

pH: Potencial de Hidrógeno.

IASA: Instituto Agropecuario Superior Andino.

AGROCALIDAD: Agencia Ecuatoriana del Aseguramiento de la Calidad del Agro.

NTE: Norma Técnica Ecuatoriana.

AQL: Nivel de calidad aceptable (Acceptable Quality Level).

TFA: Ácido Trifluoroacético.

RP-SPE: Fase Reversa - Extracción en Fase Sólida.

LC: Cromatografía Líquida (Liquid Chromatography).

UHPLC-MS/MS: Cromatografía Líquida Ultra de Alta Eficiencia – Masas / Masas.

UHPLC-QqQ-MS/MS: Cromatografía Líquida Ultra de Alta Eficiencia- Triple cuádruplo – Masas / Masas.

PDA: Potato Dextrosa Agar.

HACCP: Hazard Analysis Critical Control Point.

APPCC: Análisis de Peligros y de Puntos Críticos de Control.

BPA: Buenas Prácticas Agrícolas.

BPF: Buenas Prácticas de Fabricación.

BPAL: Buenas Prácticas de Almacenamiento.

BPM: Buenas Prácticas de Manufactura.

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 $10 \mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$. 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.

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 $10 \mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$. 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.

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN.

1.1 Formulación del problema:

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 transmitidas 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.

1.2 Justificación del problema:

Estudios sobre micotoxinas tienen gran trascendencia 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).

El cultivo, producción, comercialización, industrialización y exportación del cacao específicamente cacao fino y de aroma constituye un sector relevante de la economía de nuestro país, que en el mercado mundial ocupa el sexto puesto (Mayorga & Figueroa, 2001, citados por Rosero, 2002). Siendo un país exportador que debe regirse de acuerdo a los niveles permisibles para OTA lo que obliga al país el establecimiento de un plan permanente de control de la presencia de esta micotoxina, a fin de proteger la salud de los consumidores y evitar o atenuar las graves pérdidas económicas por la contaminación de las almendras o granos de cacao.

Esta investigación pretende monitorear la presencia natural de OTA en cacao, permitiendo cuantificar y evaluar los niveles de contaminación en las principales zonas productoras del Ecuador, debido a que la actividad cacaotera es una de las principales actividades económicas del país y es de suma importancia

mejorar la calidad, y por ende la competencia con el mercado internacional, ofreciendo un producto que asegure el bienestar y la salud humana.

1.3 Objetivos de la investigación:

1.3.1 Objetivo Principal:

Evaluar 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 caracterizar al hongo productor de Ocratoxina “A”.

1.3.2 Objetivos Específicos:

- Obtener 42 muestras de cacao de diferentes comerciantes nacionales, de las siguientes provincias: Esmeraldas, Los Ríos, Manabí, Guayas, Santo Domingo de los Tsáchilas y El Oro.
- Aplicar el protocolo de extracción, purificación y determinación de Ocratoxina “A”, en las muestras de cacao obtenidas de comerciantes nacionales.
- Determinar los niveles de Ocratoxina “A” presentes en las muestras, mediante el empleo del protocolo y su comparación con los límites máximos permitidos en legislaciones internacionales.
- Analizar los resultados obtenidos e identificar las muestras con niveles de contaminación por Ocratoxina “A” y sus características macroscópicas y microscópicas más distintivas de los hongos productores.
- Formular recomendaciones para evitar o disminuir la contaminación de las almendras de cacao con la Ocratoxina “A”.
- Socializar los resultados de la investigación a los comerciantes de cacao, con el personal de los laboratorios de Agrocalidad.

1.4 Marco Teórico:

1.4.1 El cacao.

Theobroma cacao pertenece a la familia de las esterculiáceas. El árbol del cacao puede medir hasta una altura de 10 m, es una fruta de origen tropical. Los botones florales aparecen en axilas foliares viejas, en el tronco y en las ramas. El árbol puede florecer durante todo el año, siempre que en el curso del año no existan períodos de sequía prolongados o variaciones de temperatura muy marcadas. Las frutas de baya se desarrollan, de las flores, entre 5 a 6 meses. Las flores aparecen generalmente al principio de la época de lluvia y son polinizadas por insectos. La forma de la fruta del cacao es similar a la del pepino (*Cucumis sativus*), tiene aproximadamente 25 cm de largo, de 8 a 10 cm de diámetro y pesa entre 300 y 400 g. La cáscara carnosa, de 20 mm de grosor, cubre la pulpa gelatinosa y agridulce que contiene un alto contenido de azúcar. La fruta contiene entre 25 y 50 semillas en forma de almendra, tienen sabor amargo y están dispuestas en 5 u 8 filas oblongas (Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca del Ecuador, 2006, citados por Egas, 2010).

El número de variedades de cacao que se comercializa es muy grande, aunque todas forman parte de una de las variedades forastero o criollo. La variedad forastero presenta un fruto con cáscara dura y los granos son de sabor amargo y de color morado. La raza criollo tiene frutos de cáscara suave con semillas redondas, blancas o violetas y, de un agradable sabor dulce (Rosero, 2002).

El mercado mundial de cacao fino distingue dos amplias categorías de cacao en grano: el cacao en grano “fino o de aroma” y el cacao en grano “corriente u ordinario”. Como una generalización hay que mencionar que el cacao fino o de aroma proviene de las variedades de tipo criollo y trinitario, mientras que el cacao ordinario proviene de las variedades de tipo forastero (Rosero, 2002). Existen sin embargo, conocidas excepciones a esta generalización. Los árboles de la

variedad Nacional en Ecuador, considerada como de tipo forastero, producen cacao fino o de aroma. Por otro lado, el cacao de Camerún, producido por árboles de tipo trinitario y cuyo polvo tiene un color rojizo y distinto, está catalogado como cacao ordinario (Rosero, 2002).

El cacao es el producto de exportación más antiguo del Ecuador, durante la época colonial y luego durante la República, la economía de lo que hoy constituye el Ecuador ha estado fuertemente ligada a la producción del cacao (Rosero, 2002).

La producción del cacao representa uno de los principales rubros del Sector Agropecuario ecuatoriano, al menos hasta cuando se inició el auge bananero (1969) y el petrolero (1972), generando recursos y empleo, contribuyendo al desarrollo y progreso de la economía ecuatoriana, sobre todo en los inicios del siglo XX y hasta el año 1920 cuando las plantaciones de cacao fueron devastadas por la escoba de bruja, que mermó la producción de la denominada “Pepa de oro” (Rosero, 2002).

La ventaja comparativa del Ecuador se halla en la calidad de su producto, pues es el primer proveedor de cacao fino y de aroma en el mundo, abarcando más del 50% de la producción mundial de esta variedad de cacao (Rosero, 2002).

1.4.2 Clasificación taxonómica del cacao.

Universal Taxonomic Services (2008) sitúa a la planta de cacao dentro de la siguiente clasificación taxonómica:

Dominio: Eukaryota
Reino: Plantae
Phylum: Magnoliophyta
Clase: Magnoliopsida
Orden: Malvales
Familia: Sterculiaceae
Género: *Theobroma*
Especie: *Theobroma cacao*

1.4.3 Grupos genéticos del cacao.

El cacao presenta tres grandes grupos genéticos: los criollos, los forasteros y los trinitarios.

Enríquez (2004), señala que el cacao criollo se dispersó desde México y América Central hacia el resto del mundo. Este es un cacao de sabor muy agradable y de alta calidad, que se procesa en las fábricas de chocolate para obtener un producto exclusivo. El cacao criollo presenta una gran susceptibilidad a las enfermedades, es el cacao más delicado y de poca productividad, por lo que ha ido desapareciendo con el tiempo (Egas, 2010).

Según Enríquez (2004), “criollo” no debe confundirse con un término de localidad, puesto que es un grupo genético con características propias, en las que no ha intervenido la ubicación geográfica.

Este grupo genético presenta un árbol pequeño y más susceptible a plagas y enfermedades, follaje menos denso, mazorcas grandes con 5 surcos definidos

más profundos, verrugosos, con o sin depresión en el cuello y puntas agudas, de color verde y rojo cuando la mazorca es inmadura, que se torna a amarillo y rojo oscuro, cuando la mazorca es madura, tal como se muestra en la Ilustración 1.1 (Rodríguez, 2006, citado por Egas, 2010).

Presenta semillas blancas a ligeramente rosadas en el momento de la cosecha, y alcanza un color canela cuando han atravesado el proceso de fermentación y secado (Rodríguez, 2006, citado por Egas, 2010). El cacao criollo produce, generalmente, almendras de tamaño mediano con cotiledones claros que presenta un delicado aroma de chocolate acompañado por un sabor de nuez suave (ANECACAO, 2009, citado por Egas, 2010).



Ilustración 1.1: Mazorca de cacao criollo (Gregory, 2009, citado por Egas, 2010).

Según Enríquez (2004), el cacao forastero es un complejo genético muy grande y no bien definido. Dentro de este grupo están las plantas de cacao provenientes del río Amazonas y las estribaciones de la cordillera oriental de los Andes en Venezuela, Colombia, Ecuador, Perú y Bolivia. Las plantas pertenecientes a este grupo genético son más corrientes y de menor calidad que las de los grupos genéticos criollo y trinitario, existen sin embargo, conocidas excepciones a esta generalización. Los árboles de la variedad Nacional en Ecuador, considerada como de tipo forastero, producen cacao fino o de aroma, siendo el cacao genotipo nacional de Ecuador (ANECACAO, 2009; International Cocoa Organization, 2009 a; Rosero, 2002, citados por Egas, 2010).

El cacao forastero es un árbol muy vigoroso, con follaje grande e intenso, más tolerante a las enfermedades. Como se puede observar en la ilustración 1.2, las mazorcas son amelonadas, con 10 surcos superficiales o profundos; presentan cáscaras lisas a ligeramente verrugosas y extremos redondeados en el fruto; su color es verde cuando son inmaduras, y cambian su tonalidad a amarillo cuando están maduras. Los cotiledones son morados, de forma triangular, aplanadas y muy astringentes (Rodríguez, 2006, citado por Egas, 2010). El grupo genético denominado forastero produce almendras de tamaño mediano a pequeño con cotiledones marrones oscuros y tiene un aroma a chocolate fuerte y un sabor amargo (ANECACAO, 2009, citado por Egas, 2010).



Ilustración 1.2: Mazorca de cacao forastero (Gregory, 2009, citado por Egas, 2010).

El cacao trinitario se obtuvo a partir de la mezcla del criollo con el forastero, por lo cual, existen diferentes grados de cruzamiento y de calidad; aunque, por lo general, este cacao es considerado bueno y entra en los parámetros de cacao fino y de aroma (ANECACAO, 2009; International Cocoa Organization, 2009 a, citado por Egas, 2010). Dentro de este grupo genético se ubica la variedad de cacao CCN-51, que es producto de la investigación realizada en el Ecuador; posee características de alta producción y tolerancia a las enfermedades, pero no tiene el aroma que posee el cacao genotipo nacional. (Ministerio de Agricultura y Ganadería del Ecuador, 2001, citado por Egas, 2010).

En el grupo genético trinitario, el árbol tiene gran vigor híbrido, con altas producciones resistentes a varios agentes adversos. Las mazorcas han adquirido gran variabilidad unos de otros, desde parecidos a los criollos hasta a los

forasteros, con una amplia gama de colores superficiales. Una mazorca de cacao trinitario se observa en la ilustración 1.3. El cacao trinitario produce almendras de tamaño mediano a grande, con cotiledones marrones rojizos y desarrolla un aroma a chocolate pronunciado, con un sabor adicional, descrito como frutal (ANECACAO, 2009, citado por Egas, 2010).



Ilustración 1.3: Mazorca de cacao trinitario (Gregory, 2009, citado por Egas, 2010).

Se ha descubierto un genotipo propio del Ecuador, que es considerado un cacao fino y de aroma debido a sus características. Este cacao es denominado “nacional”, da un chocolate suave, de buen sabor y un aroma a chocolate delicado, acompañado por un pronunciado sabor floral (ANECACAO, 2009; Enríquez, 2004, citado por Egas, 2010).

Se conoce al cacao ecuatoriano como “cacao de arriba”, debido a que el cacao de mejor calidad que se empezó a exportar desde el puerto de Guayaquil se cultivaba en la zona donde nace el río Guayas (río arriba); la denominación “arriba” se convirtió en sinónimo de buen sabor y aroma (Ministerio de Agricultura y Ganadería del Ecuador, 2001, citado por Egas, 2010).

El cacao genotipo nacional, que se produce únicamente en el Ecuador, ha sido clasificado como del tipo forastero, porque posee algunas características fenotípicas de este, pero la diferencia con respecto a este grupo genético radica en que el cacao genotipo nacional posee un sabor y aroma característicos, que son muy apreciados por las industrias de todo el mundo (Ministerio de Agricultura y Ganadería del Ecuador, 2001, citado por Egas, 2010).

ANECACAO (2009), indica que el cacao genotipo nacional es de un tipo forastero, pero autóctono del bosque húmedo ecuatoriano. Sin embargo, algunos estudios han demostrado que las plantas pertenecientes a este genotipo tienen mayores similitudes genéticas y morfológicas con el cacao criollo (Enríquez, 2004, citado por Egas, 2010). Estudios posteriores en el ámbito genético deberán comprobar las semejanzas del genotipo nacional con los grupos genéticos establecidos. Se observa la forma de la mazorca del cacao genotipo nacional en la ilustración 1.4.

Según ANECACAO (2009), el cacao genotipo nacional produce almendras de gran tamaño con cotiledones ligeramente marrones, que desarrollan el sabor de denominación “Arriba” cuando atraviesan un buen proceso de fermentación y secado.



Ilustración 1.4: Mazorca de cacao genotipo nacional (INIAP, 2006, citado por Egas, 2010).

El cacao genotipo nacional se ha mezclado, a través del tiempo, con variedades introducidas al país desde la década de los años 1920, de cacaos forasteros y trinitarios, con la finalidad de aumentar la resistencia a plagas y enfermedades (Enríquez, 2004; ANECACAO, 2009, citados por Egas, 2010). Con esto, el sabor “Arriba”, típico del cacao genotipo nacional, se ha diluido en el

tiempo; a esto se suma la mezcla de los granos de este genotipo de cacao con granos de variedades como la CCN-51 en las actividades de cosecha, fermentación, secado y comercialización. Estos factores han determinado la imposición de castigos a los exportadores ecuatorianos de este producto, y la calificación al país como exportador de cacao fino de aroma ha bajado (International Cocoa Organization, 2008, citado por Egas, 2010).

1.4.4 Postcosecha del cacao.

Cosecha o recolección.

La cosecha se inicia cuando el fruto o mazorca está maduro. La madurez de la mazorca se aprecia por su cambio de pigmentación: de verde pasa al amarillo o del rojo y otros similares al amarillo anaranjado fuerte o pálido. No obstante, en frutos de coloración roja – violácea muy acentuada el cambio de color puede no ser muy evidente y se corre el riesgo de no cosechar a tiempo las mazorcas que han alcanzado madurez plena. Debido a esta dificultad las mazorcas pueden madurar y germinar. Cuando existen dudas respecto del estado del fruto maduro basta golpearlo con los dedos de la mano y si se produce un sonido hueco es señal de que el fruto está maduro (Paredes *et al.*, 2002; INIAP, 2009).

No debe recolectarse frutos verdes o verde amarillentos, porque tiene influencia desfavorable sobre la fermentación. Proporcionan un porcentaje elevado de almendras violetas y pizarrosas (Paredes *et al.*, 2002; INIAP, 2009).

Si se espera mucho tiempo para recolectar una mazorca madura existen serios riesgos de podredumbre y germinación de las almendras. Además, la cosecha de frutos verdes, pintones y sobremaduros disminuye el rendimiento de los granos en peso y en calidad. La cosecha se debe realizar frecuentemente, en temporada de mayor producción la cosecha debe ser semanal; mientras que en

épocas lluviosas debe darse cada quincena; en tanto que en períodos secos cada treinta días (Paredes *et al.*, 2002; INIAP, 2009).

Los materiales que se utilizan para la cosecha son: la tijera de podar, el podón o "pico de loro" y escaleras tipo "A". Todas las herramientas de corte deben estar bien afiladas y desinfectadas. Las mazorcas a cosechar deben ser seccionadas por la parte media del pedúnculo que une el fruto al árbol para evitar la destrucción del cojín floral. Si se utiliza para la cosecha el "pico de loro", es preciso cortar el pedúnculo jalando la herramienta de arriba hacia abajo, nunca en sentido contrario debido a que desgarraría el cojín floral (Paredes *et al.*, 2002; INIAP, 2009).

Quiebra.

Se denomina quiebra al procedimiento que consiste en partir la mazorca y extraer las almendras las cuales una vez separadas de la placenta, serán sometidas a la fermentación. El tiempo entre el desgrane y la puesta en fermentación no debe exceder las 24 horas (Paredes *et al.*, 2002; INIAP, 2009).

Como práctica generalizada cuando se efectúa la cosecha, se determinan varios puntos dentro de la plantación donde se amontonan las mazorcas. Una vez amontonadas, se debe efectuar la quiebra y de allí transportar las almendras en costales a los fermentadores (Paredes *et al.*, 2002; INIAP, 2009).

Para realizar la quiebra se pueden emplear machetes cortos acondicionados especialmente para esta labor. Para ello, se efectúa un corte longitudinal a las mazorcas con sumo cuidado a fin de no cortar las almendras que permanecen adheridas a la placenta. La separación de los granos se realiza a mano. Se aprovecha este momento para desechar granos enfermos por moniliasis o escoba de bruja (Paredes *et al.*, 2002; INIAP, 2009).

Una alternativa para realizar la quiebra es el uso de un mazo pequeño de madera con el cual se rompen las mazorcas dejando en libertad a las almendras. La ventaja del mismo radica en que no se cortan los granos lo que mejora la productividad y calidad del grano de cacao obtenido (Paredes *et al.*, 2002; INIAP, 2009).

Para los casos en los cuales no exista la cantidad de cacao suficiente para fermentar o no haya mano de obra disponible para hacer la quiebra, se sugiere amontonar las mazorcas hasta 5 días. Una vez transcurrido ese tiempo, los jugos que afloran de las mazorcas se concentran y facilitan la extracción de las almendras y también del proceso de fermentación (Paredes *et al.*, 2002; INIAP, 2009).

Fermentación.

Llamado también beneficio, cura o preparación. Es un proceso bioquímico interno y externo de la semilla en la que ocurren cambios notables en su estructura (Paredes *et al.*, 2002; INIAP, 2009).

La fermentación consiste en lo siguiente (Paredes *et al.*, 2002; INIAP, 2009):

- Descomposición y remoción del mucílago azucarado que cubre el grano fresco, para facilitar el secado y la conservación o almacenamiento.
- Elevar la temperatura que mata al embrión, para facilitar el desarrollo del sabor a chocolate.
- Destrucción de las células pigmentadas o cambios en la pigmentación interna.

- La transformación del sabor astringente de los cotiledones.
- El desarrollo de sabor y aroma del chocolate.
- Durante la fermentación los azúcares que contienen las almendras son transformados a alcoholes por las levaduras. Estos a su vez son convertidos en ácido acético por las bacterias acéticas.

Una cantidad considerable de calor se desprende durante la fermentación mientras la pulpa se desintegra. Este aumento en la temperatura es el causante de la muerte del embrión y es precisamente en este momento cuando se inician los cambios bioquímicos internos de la semilla: el cambio de color violeta a marrón claro, disminución del sabor amargo y el desarrollo de los sabores precursores del chocolate (Paredes *et al.*, 2002; INIAP, 2009).

Existen diversos procedimientos para la fermentación del cacao. Entre los más usados, tenemos la fermentación en costales, en rumas o montones y en cajones de madera (Paredes *et al.*, 2002; INIAP, 2009).

Secado.

Al final de la fermentación el contenido de humedad de los granos de cacao está alrededor del 55%. Para ser almacenados con seguridad debe reducirse a límites del 7 u 8% (Paredes *et al.*, 2002; INIAP, 2009).

El proceso de secado no constituye una simple reducción de humedad sino que los cambios químicos continúan mientras el contenido de humedad desciende con lentitud hasta que se detienen por la falta de humedad o la inactivación de las enzimas por otros medios. Por este motivo el proceso no debe ser muy rápido durante los dos primeros días, la alta temperatura puede inactivar las enzimas (Paredes *et al.*, 2002; INIAP, 2009).

La rapidez del secado varía según el método que se emplee. En caso que el secado sea solar; es decir, al aire libre dura de 5 a 7 días. Esto dependerá de las condiciones atmosféricas para deshidratar óptimamente las almendras. Se conocerá que ha completado el secado del cacao cuando a la presión de los dedos índice y pulgar, se rompan los granos fácilmente (Paredes *et al.*, 2002; INIAP, 2009).

En Ecuador es casi generalizada la práctica de secar el cacao en el suelo, ya sea en pisos de concreto o sobre mantas de plástico. La desventaja de esta práctica radica en que primero se evapora la humedad del suelo y luego la de los granos de cacao. Otro inconveniente es la contaminación de las almendras con tierra y heces de los animales domésticos (Paredes *et al.*, 2002; INIAP, 2009).

Para desterrar este mal hábito se diseñó parihuelas para secado, que pueden construirse de madera, bambú, de dos metros de largo por 80 centímetros de ancho, que reposan sobre travesaños levantados del suelo. Sus medidas permiten el fácil manipuleo y protección de los granos en caso de lluvias (Paredes *et al.*, 2002; INIAP, 2009).

También podrá secarse el cacao en secadores calentados artificialmente, en cuyo caso deberá prepararse para que el grano no adquiera el olor a humo (Paredes *et al.*, 2002; INIAP, 2009).

Limpieza y selección del grano.

Terminado el secado es adecuado limpiar el producto de impurezas a fin de obtener un producto de mejor valor comercial. Finalmente la producción debe ser empacada y almacenada (Paredes *et al.*, 2002; INIAP, 2009).

La selección del grano también nos permite eliminar todo tipo de impurezas como: placentas, pajillas, granos hongeados, granos picados y granos dobles; defectos que no están permitidos en el comercio del grano (Paredes *et al.*, 2002; INIAP, 2009).

Almacenamiento.

El almacenamiento del cacao juega un papel preponderante. Si no es ejecutado en perfectas condiciones todo el esfuerzo realizado en obtener un producto de calidad puede echarse a perder (Paredes *et al.*, 2002; INIAP, 2009).

Terminado el secado los granos se meten en costales de yute y si todavía están calientes producto del secado al aire libre, se deja enfriar antes de ensacarlos. El ambiente donde se va almacenar debe estar exento de olores extraños, como los provenientes de pesticidas, combustible, alimentos con olores penetrantes, etc. Se debe evitar del todo la contaminación por humo (Paredes *et al.*, 2002; INIAP, 2009).

El cacao es altamente higroscópico, es decir absorbe la humedad con suma rapidez. Si se almacenan almendras con menos de 8% de humedad, pueden mantenerse en buen estado por unos cinco meses, en medios menores de 75% de humedad relativa. Cuando la almendra seca es almacenada en ambientes con 95% de humedad relativa en 10 días puede superar el 15 % de humedad (Paredes *et al.*, 2002; INIAP, 2009).

1.4.5 Enfermedades fungosas en el cacao.

“El cacao como cualquier vegetal, es susceptible a la acción de microorganismos que alteran su desarrollo y en nuestro país es una de las principales causas para la baja productividad. Por lo general, en el Ecuador las enfermedades del cacao tienen un mayor efecto que los insectos plaga, estimándose que ocasionan hasta el 80% de pérdidas” (Maridueña, 2011).

Las principales enfermedades registradas en el cultivo de cacao son las siguientes:

Mazorca Negra (*Phytophthora palmivora*). Es la enfermedad más importante del cacao en todas las áreas cacaoteras del mundo, en menos proporción en América. Aunque el hongo puede atacar plantas jóvenes y diferentes partes del árbol de cacao, como cojinetes florales, chupones, brotes, hojas, ramas, tronco y las raíces, el principal daño lo sufren las mazorcas (INIAP, 2011, citado por Maridueña, 2011).

Mal de Machete (*Ceratocystis fimbriata*). Es una de las pocas enfermedades que puede producir la muerte del árbol de cacao, se infecta con ayuda del barrenador del tronco, insecto del género *Xyleborus*, el cual ataca a las plantas enfermas en sus primeras etapas y hace túneles, por los que sale abundante aserrín conteniendo miles de esporas del hongo que son fácilmente dispersadas por el viento, insectos y todo tipo de animales (Dirección General de Investigación y Extensión Agrícola, 1991; INIAP, 2011, citados por Maridueña, 2011).

El hongo siempre infecta al cacao a través de lesiones en los troncos, ramas principales y al sistema vascular de la planta (INIAP, 1984, citado por Maridueña, 2011).

Escoba de bruja (*Moniliophthora perniciosa ex-Crinipellis perniciosa*). Se piensa que la escoba de bruja es la enfermedad mas seria en los países en que ella existe, aunque el grado de severidad varía de acuerdo con las condiciones del clima. Bajo condiciones extremas la infección de las mazorcas y de los cojines florales puede resultar en una pérdida hasta del 50% de la cosecha (Hardy, 1961, citado por Maridueña, 2011).

Las basidiosporas que se producen en los basidiocarpos del hongo se dispersan sobre tejidos susceptibles, la penetración ocurre a través de los estomas en un período de 2 horas afectando a todos los órganos en crecimiento como brotes vegetativos, cojinetes florales (Griffith, 2003, citado por Maridueña, 2011).

Moniliasis (*Moniliophthora roreri*). A esta enfermedad también se la conoce como helada, pudrición acuosa, mancha ceniza o enfermedad de Quevedo. La enfermedad ataca solamente los frutos del cacao y se considera uno de los factores limitantes de mayor importancia en la producción cacaotera, puede provocar pérdidas que oscilan entre un 16 y 80% (Cruz, 2007, citado por Maridueña, 2011).

La severidad del ataque de la moniliasis varía según la zona y época del año, de acuerdo con las condiciones del clima. Aparentemente las temperaturas altas son más favorables para la diseminación de la monilia (Cruz, 2007, citado por Maridueña, 2011).

Antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*). Agrede ramillas, hojas y frutos del cacao. Causa defoliación dejando las ramas desnudas y se presenta también en viveros (Cruz, 2007, citado por Maridueña, 2011).

Esta enfermedad se la relaciona con deficiencia de sombra y de nutrimentos, por lo cual se combate con una adecuada regulación de la sombra, de la fertilización y con la poda de las partes enfermas (Cruz, 2007, citado por Maridueña, 2011).

Este hongo produce conidias hialinas, unicelulares, ovoides a oblongas, ligeramente curvada de 10-15 micras de longitud y 5-7 micras de ancho. Las masas de conidios aparecen de color rosa o salmón. Los acérvulos subepidérmicos que se producen en los tejidos infectados son, normalmente con

setas, simples, cortos, conidióforos erectos (Cruz, 2007, citado por Maridueña, 2011).

Esta enfermedad se determina por la aparición de unas lesiones oscuras en las hojas, hundidas, bien delimitadas por una o más aureolas concéntricas, secándose posteriormente las zonas atacadas como una quemadura. En general, ataca principalmente a las mazorcas jóvenes, sobre las cuales aparecen primero manchas pardas con depresiones, cuyo centro pronto se cubre de pequeñas estructuras rosadas constituidas por las fructificaciones del hongo (Cruz, 2007, citado por Maridueña, 2011).

En los brotes, por el contrario, la enfermedad es más grave, pues llega a provocar una defoliación completa, causando lo que se conoce como “puntas desnudas (Cruz, 2007, citado por Maridueña, 2011).

Podrición de la Raíz (*Rhizoctonia* sp). Esta enfermedad puede mostrarse en cualquier etapa del crecimiento de las plantas; en las más viejas, tienen formas casposas de color rojizo marrón, las lesiones en el tallo y las raíces bajo tierra son hundidas y los filamentos de color marrón en forma de hilo (micelio) del hongo causal pueden ser vistos con una lupa en la superficie de la lesión. Es común en la mayoría de los suelos y ataca cientos de especies vegetales diferentes, persiste indefinidamente en el suelo como saprófito y sobrevive a temperaturas extremas y humedad del suelo en forma de pequeños esclerocios marrones, redondeados. Los síntomas típicos de esta enfermedad son: manchas circulares entre 2-10mm de diámetro, y la defoliación que se relaciona con las pérdidas de producción (Cruz, 2007; Barnett, 1972; Oleas *et al.*, 2006, citados por Maridueña, 2011), la cual es afectada marcadamente cuando supera el umbral del 25-35%.

Otras enfermedades reportadas en plantaciones de cacao son causadas por los siguientes géneros de hongos:

Fusarium sp.- Esta enfermedad es considerada una de las más importantes, debido a la severidad de sus ataques y la dificultad de su control eficiente, por ser hongos que mantienen una diversidad genética y patogénica existente en las poblaciones de los patógenos (Cruz, 2007, citado por Maridueña, 2011).

Gliocladium sp.- Es un hongo filamentoso mitospórico que se distribuye ampliamente en el suelo y la vegetación en descomposición. Corresponde a un estado anafórmico de *Nectria* sp, es uno de los patógenos reportados por causar necrosis en raíces y tallos de plantaciones cacaoteras. Es comúnmente considerado como un contaminante: se produce en rápido crecimiento y propagación (Cruz, 2007, citado por Maridueña, 2011).

Verticillium sp.- Es un género de hongos en la división Ascomycota, sus daños son superficiales que se presenta en las hojas parecidos a los de *Fusarium*. Dentro del género, están grupos diversos que abarcan saprófitos y los parásitos de plantas (Cruz, 2007, citado por Maridueña, 2011).

Entre las especies de *Verticillium* que causan enfermedades como marchitez en especies económicamente importantes son *Verticillium dahliae* y *Verticillium albo-atrum* (Cruz, 2007, citado por Maridueña, 2011).

Penicillium sp.- Este género se caracteriza por formar conidios en una estructura ramificada semejante a un pincel que termina en células conidiógenas llamadas fiálides (Cruz, 2007; Barnett, 1972, citados por Maridueña, 2011).

El *Penicillium* es causa de podredumbre de semillas, marchitamiento de plántulas, caída de almácigos. Hongos y bacterias están asociados a este tipo de problemas, por un lado están los patógenos que llevan las semillas (*Fusarium* spp., *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp., *Nigrospora* spp.) y por otro los que están

presentes en el suelo en el cual se realiza la siembra (*Pythium spp.*, *Rhizoctonia spp.*) (Cruz, 2007; Barnett, 1972, citados por Maridueña, 2011).

Glomerella roseum.- Es un ascomiceto, que constituye el estado imperfecto de *Colletotrichum* el cual forma acérvulos en forma de disco o en forma de cojín, por lo general con la oscuridad. Poseen espinas o pelos en el borde de los conidióforos, de forma simple, alargado; posee conidios hialinos, ovoides, unicelulares. Exceptuando las raíces, afecta a todos los órganos del árbol. En las hojas se producen manchas de forma irregular, de color blanco - ceniciento en el centro y bordes castaños, comenzando generalmente desde el borde, extendiéndose hacia el interior (Cruz, 2007; Barnett, 1972 citados por Maridueña, 2011).

Las partes afectadas suelen desprenderse de la hoja sobre estas manchas aparecen pequeños puntos negros - acervulos dispuestos en círculos concéntricos (Cruz, 2007; Barnett, 1972, citados por Maridueña, 2011).

La infección continúa con las ramas interiores, provocando su muerte y la caída de las hojas, flores y frutos, abarcando toda la copa y siendo imposible su recuperación (Cruz, 2007; Barnett, 1972, citados por Maridueña, 2011).

En los frutos las manchas son de color rojizo o pardo pasando, a una coloración oscura, irregularmente circular. La parte afectada se halla hundida con relación a la superficie de la fruta, y la pulpa adquiere una podredumbre seca característica (Cruz, 2007; Barnett, 1972, citados por Maridueña, 2011).

Pestalotiopsis sp.- Este hongo causa una enfermedad fungosa considerada generalmente de menor importancia. Ataca el follaje que ha sido dañado o debilitado por un clima desfavorable o condiciones de crecimiento. Usualmente, la enfermedad comienza en la punta de la hoja y progresa hacia su base. El color del

follaje va de verde a amarillento, luego se pone marrón oscuro que puede verse casi negro (Cruz, 2007; Barnett, 1972, citados por Maridueña, 2011).

Curvularia lunata.- Las hojas afectadas del cacao presentan una clorosis, luego una desecación desde el ápice o borde de las hojas hacia el centro de la hoja. Seguido a esto las hojas presentan un aspecto rasgado, acartuchado, retorcido, acompañado de un color canela (Cruz, 2007; Barnett, 1972, citados por Maridueña, 2011).

1.5 Hongos productores de Ocratoxina “A”.

La Ocratoxina “A” (OTA) fue aislada por primera vez en el año 1965 en Sudáfrica a partir de un cultivo de *Aspergillus ochraceus* (Van der Merwe *et al.*, 1965, citados por González, 2010). Desde entonces, la producción de esa micotoxina se ha asociado a distintas especies pertenecientes también a la sección *Circumdati* (IARC, 1993; Varga *et al.*, 1996; Frisvad *et al.*, 2004, citados por González, 2010). La proporción de cepas de *A. ochraceus* productoras de OTA se estima en general elevada, aunque los porcentajes varían según los autores: desde el 100% a porcentajes menores del 10% (Accensi *et al.*, 2004, citados por González, 2010).

La sección *Nigri* ha adquirido una gran importancia como productora de OTA desde la primera descripción de la producción de esta micotoxina por *A. niger* (Abarca *et al.*, 1994, citados por González, 2010), por *A. carbonarius* (Horie, 1995, citado por González, 2010), y por *A. tubingensis* (Medina *et al.*, 2005, citados por González, 2010).

Esporádicamente, también se ha descrito la producción de OTA por especies de *Aspergillus* no pertenecientes a las secciones *Circumdati* o *Nigri*, como *A. albertensis* (Varga *et al.*, 1996, citados por González, 2010) *A. fumigatus* o *A. terreus* (Riba *et al.*, 2008, citados por González, 2010).

Dentro del género *Penicillium*, la producción de OTA se descubrió inicialmente en *Penicillium viridicatum* (Van der Merwe *et al.*, 1965, citados por González, 2010) y posteriormente en otras especies, si bien en algunos casos se trataba de cepas erróneamente identificadas. La revisión de la identificación de cepas ocratoxigenas de *P. viridicatum* permitió detectar que, en realidad, se trataba de cepas de *P. verrucosum* (Pitt, 1987, citado por González, 2010). Actualmente, *P. verrucosum* se ha dividido en dos especies ocratoxígenas: *P. verrucosum* y *P. nordicum* (Bragulat *et al.*, 2008, citados por González, 2010).

1.5.1 Estructura química de las Ocratoxinas.

Las ocratoxinas son pentaquetidos cíclicos que contienen una porción de isocumarín, normalmente ligado a una L-fenilalanina a través de un grupo carboxilo, mediante un enlace amida (EFSA, 2006, citado por González, 2010). Hay 5 tipos de ocratoxinas, sin embargo la más tóxica es la ocratoxina “A” (OTA). En la estructura de esta toxina, la porción de isocumarín está clorado y ligado a una L-fenilalanina (EFSA, 2006, citado por González, 2010). La ocratoxina “B” (OTB) es el derivado no clorado de la OTA, y es significativamente menos tóxica tanto *in vivo* como *in vitro* (Mally *et al.*, 2005, citados por González, 2010). La ocratoxina “C” (OTC) es el éster de la OTA, y su posible potencial tóxico, aunque se considera prácticamente nulo, se ha descrito específicamente sobre algunas líneas celulares de monocitos en el ser humano (O'Brien & Dietrich, 2005, citados por González, 2010).

La ocratoxina α (OT α) y la ocratoxina β (OT β) son productos de la hidrolisis de la OTA y OTB respectivamente, no poseen la molécula de fenilalanina y no se consideran tóxicas (O'Brien & Dietrich, 2005, citados por González, 2010). En la ilustración 1.5, se muestra la estructura química de las diferentes ocratoxinas.

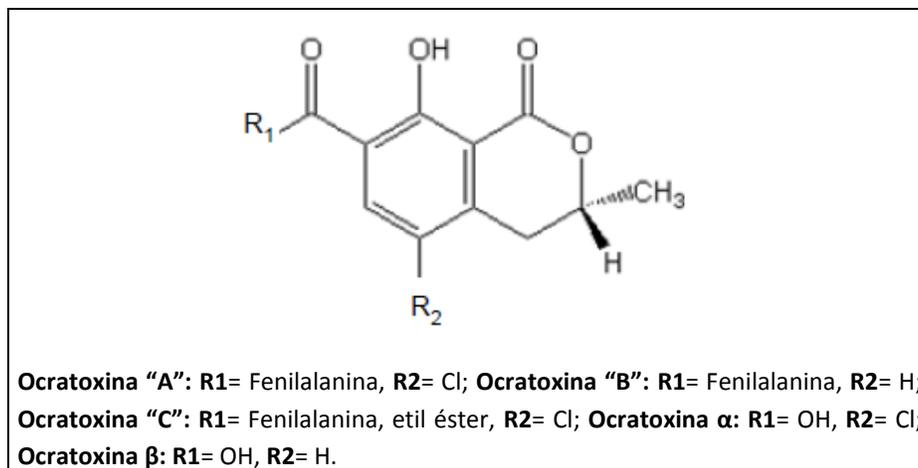


Ilustración 1.5: Estructura química de las diferentes ocratoxinas. Tomado de: Centre for Food Safety, (2006).

El peso molecular de la OTA es 403 g/mol y su estabilidad térmica es hasta 180°C. La toxina pura es un polvo cristalino blanco con punto de fusión a 169°C. Es inestable a la luz, sin embargo la solución etanólica es estable por más de un año si se mantiene en la obscuridad y al frío (Benford *et al.*, 2001, citados por González, 2010).

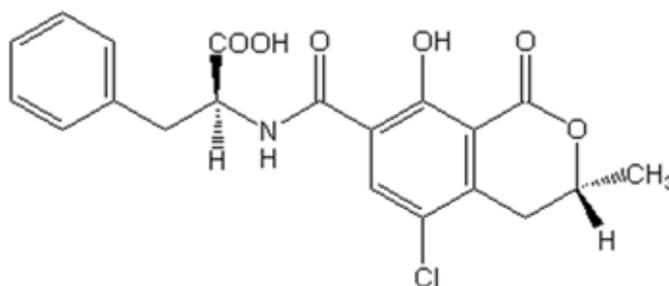


Ilustración 1.6: Estructura química de la Ocratoxina "A" (OTA). Tomado de: Centre for Food Safety, (2006).

1.5.2 Biosíntesis de Ocratoxina "A".

La ruta biosintética de OTA propuesta por Huff y Hamilton en 1979, fundamentada en algunos artículos publicados previamente, postula tres distintas etapas en la biosíntesis de OTA. La primera corresponde a la síntesis de un

residuo poliquétido de Ocratoxina “A” a partir de acetil coenzima A (acetil-CoA) y malonato. En un primer paso, una enzima poliquétido sintasa inicia la síntesis del residuo poliquétido a través de la vía del acetato-malonato, dando lugar a melleína como intermediario (Steyn *et al.*, 1970, citados por González, 2010). A continuación, la melleína es metilada y oxidada, dando lugar a Ocratoxina β , y una molécula de cloro es incorporada directamente para dar lugar a Ocratoxina α (Wei *et al.*, 1971, citados por González, 2010). En la segunda etapa se sintetiza el otro precursor, la fenilalanina, a partir de Ácido Shikímico, que se une a su vez a la Ocratoxina α (Ferreira & Pitout, 1969, citados por González, 2010). Por último, en la tercera etapa, una enzima sintetasa genera Ocratoxina “C”, y una esterasa conduce finalmente a la formación de OTA (Ilustración 1.7).

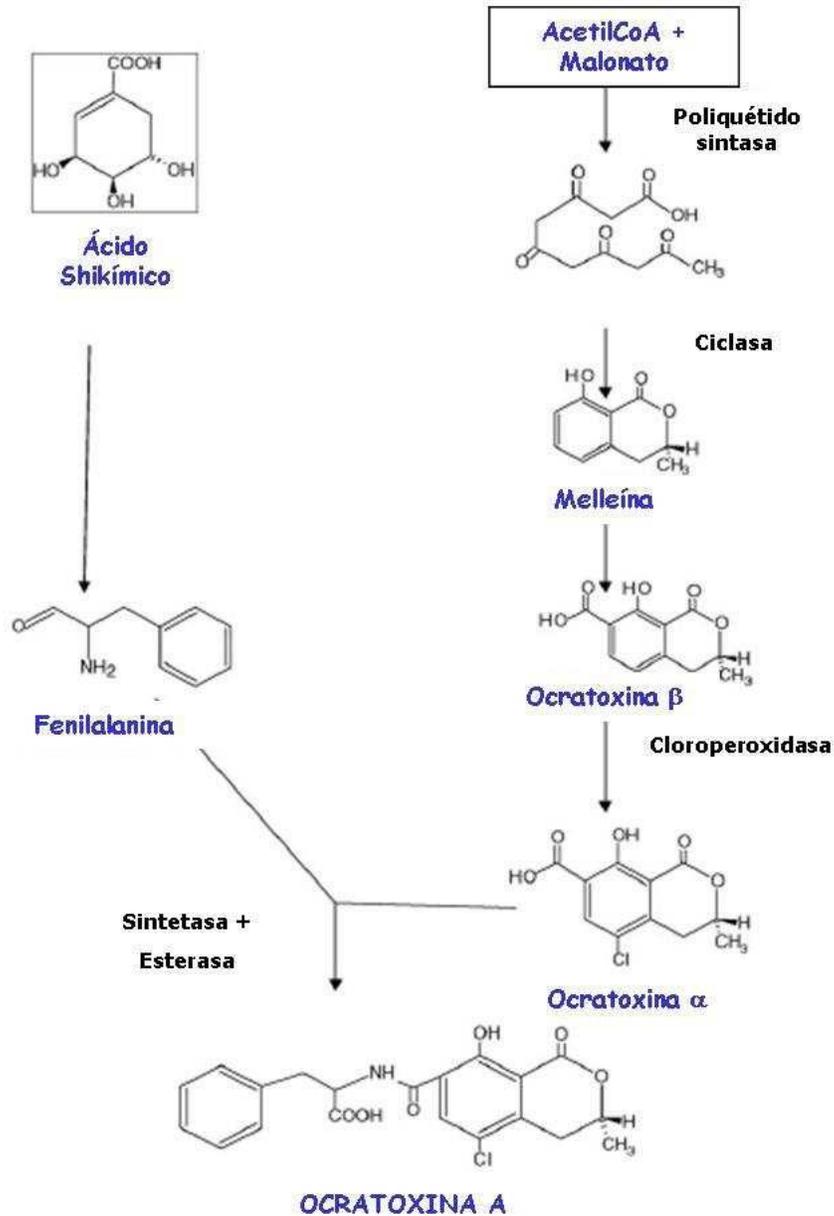


Ilustración 1.7: Representación esquemática de la ruta de biosíntesis de OTA propuesta por Huff y Hamilton (1979).

1.5.3 Factores implicados en la producción de Ochratoxina “A” y su presencia en productos alimenticios.

La distribución de las especies productoras de OTA citadas y, la propia producción de la toxina, están influidas por factores climáticos, por el hospedador y por las condiciones ambientales. En general, la disponibilidad de agua (a_w) y la

temperatura se consideran los principales agentes que inciden no solo en la proliferación de hongos ocratoxígenos, sino también en la producción de OTA (Schmidt-Heydt *et al.*, 2008, citados por González, 2010). Así mismo, parecen tener una influencia significativa el pH del medio (Esteban *et al.*, 2005, citados por González, 2010), el sustrato de crecimiento o la composición del medio (Atoui *et al.*, 2007, citados por González, 2010), la presencia de metales traza y las fuentes de carbono existentes (Muhlencoert *et al.*, 2004, citados por González, 2010).

La producción óptima de OTA por *A. ochraceus* se ha descrito entre 20 y 30°C, mientras que *P. verrucosum* produce OTA a temperaturas inferiores, entre 10 y 20°C (Magan, 2006, citado por González, 2010). Por ello, generalmente se había considerado que *P. verrucosum* era el responsable de la producción de OTA en zonas frías, mientras que la contaminación por OTA en zonas más cálidas se atribuía únicamente a *A. ochraceus* (Pitt & Hocking, 1997, citados por González, 2010). Sin embargo, desde la detección de la capacidad ocratoxígena de las especies incluidas en la sección *Nigri*, se ha descrito que estas tienen un rol importante en la contaminación por OTA de climas cálidos, ya que *A. carbonarius* presenta su máximo crecimiento a temperaturas de 25-30°C (Romero *et al.*, 2007, citados por González, 2010), con una producción de OTA óptima a temperaturas de 15-20°C (Leong *et al.*, 2006; Valero *et al.*, 2006, citados por González, 2010), mientras que las especies del agregado *A. niger* presentan tanto el crecimiento como la producción de OTA óptimos a 20-25°C (Esteban *et al.*, 2004, citados por González, 2010).

De acuerdo con la amplia distribución de los hongos productores de OTA, esta es una toxina que muestra una distribución mundial, y asociada a múltiples sustratos. Puede encontrarse como contaminante natural en los cereales y subproductos de cereales, incluyendo maíz, cebada, trigo, sorgo, centeno, avena y arroz (Beretta *et al.*, 2002; Baliukoniene *et al.*, 2003; Halstensen *et al.*, 2004; Ayalew *et al.*, 2006; Hajjaji *et al.*, 2006; Sugita-Konishi *et al.*, 2006; Lattanzio *et al.*, 2007; Tanaka *et al.*, 2007; Roscoe *et al.*, 2008, citados por González, 2010),

leguminosas (Van Egmond & Speijers, 1994; Pitter, 1998; Domijan *et al.*, 2005, citados por González, 2010), en productos cárnicos de cerdo y aves (Canela *et al.*, 1994; Gareis & Scheuer, 2000; Curtui *et al.*, 2001; Jiménez *et al.*, 2001; Petzinger & Weidenbach, 2002; Jorgensen, 2005, citados por González, 2010); y, en menor cantidad, en leche de vaca y derivados (Skaug, 1999; Boudra *et al.*, 2007; Fink-Gremmels, 2008, citados por González, 2010). La presencia de OTA en estos animales se detecta tras el consumo de piensos que contienen la micotoxina (Holmberg *et al.*, 1991; Gareis & Wolff, 2000; Fink-Gremmels, 2008, citados por González, 2010).

En los últimos años ha adquirido una gran importancia la presencia de OTA en otro tipo de sustratos, como los frutos secos, las especias, el vino, el café, cacao, la cerveza y otros alimentos (Varga *et al.*, 2001; Petzinger & Weidenbach, 2002; Papachristou & Markaki, 2004; Jorgensen, 2005; Sangare-Tigori *et al.*, 2006; Sugita-Konishi *et al.*, 2006; Napolitano *et al.*, 2007; Visconti *et al.*, 2008, citados por González, 2010).

Debido a su gran importancia en la dieta humana, los principales contribuyentes al consumo de OTA son los cereales y sus productos derivados, llegando a constituir hasta un 70% de la OTA consumida en la dieta (Leblanc *et al.*, 2005, citados por González, 2010). En menor medida se encuentran el café, chocolate, la cerveza, el vino, los productos cárnicos, las legumbres y las especias (Wolff *et al.*, 2000; Varga *et al.*, 2001; Leblanc *et al.*, 2005, citados por González, 2010). En la Ilustración 1.8 se muestra la contribución media de diferentes alimentos a la ingesta diaria de OTA, calculado a partir de estudios realizados en tres países de la Unión Europea: Francia, Italia y Suecia (EFSA, 2006, citado por González, 2010). Dicha contribución se estimó tomando en cuenta tanto las concentraciones medias de OTA en cada categoría alimentaria, como el nivel de consumo medio de cada tipo de alimento.

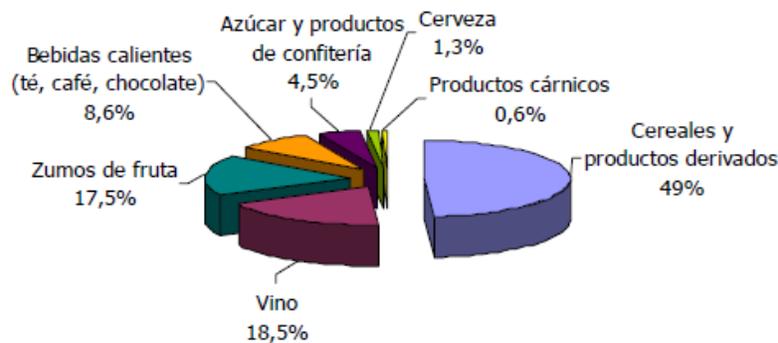


Ilustración 1.8: Contribución media de diferentes alimentos a la ingesta diaria de OTA. Tomado de: EFSA 2006, citado por González, (2010).

1.5.4 Efecto de la contaminación por Ocratoxina “A”.

Las propiedades nefrotóxicas y carcinogénicas de las micotoxinas han sido el principal punto de atención en la evaluación de la inocuidad y el análisis de riesgo por las autoridades reglamentarias. En 1970, la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC) inició un programa de evaluación del riesgo carcinogénico de distintos compuestos en humanos. Las primeras micotoxinas evaluadas fueron la aflatoxina y la esterigmatocistina. En el caso particular de la OTA, se le han descrito propiedades carcinogénicas, nefrotóxicas, teratogénicas e inmunotóxicas y posiblemente neurotóxicas, pues desde hace tiempo se viene reconociendo como una de las principales micotoxinas contaminantes de los alimentos almacenados, y se la ha asociado a otras patologías como Tumores del Tracto Urinario (UTT) y la Nefropatía Crónica Intersticial (en el Norte de África) (Bayman & Baker, 2006, citados por González, 2010). La OTA está clasificada por la IARC (Agencia Internacional de Investigación de Cáncer) como posible carcinógeno humano clase 2B (tabla 1.1), por producir tumores renales en animales de experimentación (Plestina, 1996, citado por González, 2010).

Tabla 1.1: Evaluación y clasificación de algunas micotoxinas en función de su toxicidad.

<i>Micotoxina</i>	<i>Evidencia de carcinogenicidad*</i>		<i>Clasificación IARC**</i>
	<i>humana</i>	<i>animal</i>	
Aflatoxinas	S	S	1
Ocratoxina "A"	I	S	2B
Fumonisin	I	S	2B
Esterigmatocistina	-	S	2B
Zearalenona	-	L	-
Toxina T-2	-	L	-
Patulina	-	I	3

Tomado de: IARC 1993, citado por González, (2010).

*Tipo de evidencia: (S) suficiente, (L) limitada, (I) insuficiente.

**Criterios de clasificación:

Grupo 1: agente carcinogénico en humanos;

Grupo 2A: agente probablemente carcinogénico en humanos;

Grupo 2B: agente posiblemente carcinogénico en humanos;

Grupo 3: agente no clasificable.

1.5.5 Regulaciones internacionales.

En el caso de regulaciones para OTA, la actividad coordinada en Europa se inició en 1995, año en el que se elaboró el primer estudio conjunto para establecer el nivel de ingesta de OTA por la población de los Estados Miembros de la Unión Europea (Comisión Europea, 1997, citado por CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. 2008), y que dio lugar a la elaboración de la primera legislación comunitaria para esta toxina en alimentos (Comisión Europea, 1998, citado por CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. 2008). Desde ese momento, tanto los estudios de toxicidad como los de incidencia de OTA en Europa se han incrementado (Wolf *et al.*, 2000; Jorgensen, 2005; Leblanc *et al.*, 2005, citados por González, 2010), y los límites máximos permitidos de OTA en distintos alimentos han ido disminuyendo.

El último reglamento propuesto por la Unión Europea para contenidos máximos de OTA permitidos en productos alimentarios ha sido publicado en 2008 (Comisión Europea, 2008, citado por CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, 2008).

Tabla 1.2: Contenido máximo de OTA tolerado en alimentos para los estados miembros de la Unión Europea.

	Producto Alimenticio	Límite de OTA ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)
Cereales:	1) Cereales no elaborados	5
	2) Productos derivados de cereales no elaborados, incluidos los productos transformados a base de cereales y los cereales destinados al consumo humano directo.	3
	Uvas pasas (pasas de Corinto, sultanas y otras variedades de pasas)	10
Café:	1) Café tostado en grano y café tostado molido, excluido el café soluble	5
	2) Café soluble (café instantáneo)	10
Vino:	1) Vino (incluidos los vinos espumosos y excluidos los vinos de licor) y los vinos con un grado alcohólico mínimo	2
	2) Vino aromatizado, bebidas aromatizadas a base de vino y cócteles aromatizados de productos vitivinícolas	2
	1) Zumo de uva, zumo de uva concentrado reconstituido, néctar de uva, mosto de uva y mosto de uva concentrado reconstituido, destinados al consumo humano directo	2
	2) Alimentos elaborados a base de cereales y alimentos infantiles para lactantes y niños de corta edad	0,5
	3) Alimentos dietéticos destinados a usos médicos especiales y dirigidos específicamente a los lactantes	0,5
	4) Café verde, frutos secos distintos de las uvas pasas, cerveza, cacao y productos del cacao, vinos de licor; productos cárnicos, especias y regaliz	-

Tomado de: Comisión Europea 2008, citado por CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, (2008).

Tiempo atrás se ha debatido sobre la posibilidad de poner límites legales europeos, a la presencia de Ocratoxina A (OTA) en cacao, pero por ahora no hay un límite establecido para ésta micotoxina en dicha matriz (Agell *et al*, 2008, citados por González, 2010).

Sin embargo, se ha tomado de referencia como niveles permisibles dispuestos en dos países: Brasil y el Bioprofiel Testing Laboratories de Estados Unidos. Brasil propone establecer un nivel máximo para la OTA en las semillas de cacao y los productos de cacao de $10 \mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$ y $5 \mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$, respectivamente (ANVISA CP100/2009, citado por CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. 2008), mientras que el laboratorio *Bioprofiel Testing Laboratories* en Estados Unidos propone establecer un nivel de OTA en semillas de cacao de $15 \mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$ y en chocolate $4.3 \mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$ (Amézqueta *et al.*, 2009, citados por González, 2010). Se tomó como referencia este prestigioso laboratorio porque aún la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA) no ha establecido límites de referencia ni criterios de intervención para la Ocratoxina “A” en ningún producto.

Mientras que el Ministerio de Salud del Canadá está en el proceso de proponer límites máximos para la OTA en una variedad de alimentos, a consecuencia de una evaluación sanitaria realizada (Turcotte & Scott, 2010). Actualmente se están examinando los límites máximos para la OTA en el cacao.

1.6 Detección de Ocratoxina “A”.

Existen diferentes métodos analíticos para determinar Ocratoxinas entre ellos están: TLC, HPLC o ELISA, seguido de una limpieza del extracto en solución utilizando columnas de Fase – Reversa y con detección por fluorescencia en HPLC (Hurst & Martin, 1998). La extracción usualmente involucra procesos tradicionales con acetona, cloroformo, metanol o una mezcla de estos. Actualmente, la identificación con un espectrómetro de masas permite una gran especificidad y confianza además de una posible automatización, pero es muy costoso y requiere gran experiencia en el manejo (European Mycotoxins Awareness Network, 2010). Siendo en el país un método no común de análisis.

1.7 Morfología de los hongos.

Las hifas pueden ser:

Hifas septadas, debido a que poseen unos tabiques o septos de separación que las dividen en células uninucleadas (Argüelles, Freire, & Morán, 2010).

Hifas no septadas, en este caso las hifas crecen formando una masa de ramificación y su conjunto se llama Micelio (Argüelles, Freire & Morán, 2010). Los micelios pueden ser a su vez:

- Micelio vegetativo, en relación con la nutrición o
- Micelio aéreo, lugar donde se dan las estructuras para la reproducción (Argüelles, Freire & Morán, 2010).

1.8 Cultivo.

Los hongos crecen bien en medios artificiales y tienen requerimientos nutritivos simples, una fuente de carbono orgánico, generalmente azúcar, y de nitrógeno suelen ser los elementos suficientes para obtener un buen crecimiento. Junto a ellos, un soporte sólido, el agar, permite a los hongos filamentosos el desarrollo del micelio aéreo, donde se localizan las estructuras reproductoras y el desarrollo de colonias en el caso de las levaduras. El medio de cultivo más utilizado para los hongos es el medio Sabouraud que reúne estas características y un pH de 5-6, que dificulta el crecimiento bacteriano (Argüelles, Freire & Morán, 2010).

Los hongos para su crecimiento no necesariamente requieren ser cultivados en el medio de Sabouraud, pero la mayoría de las descripciones de crecimiento y características morfológicas de las colonias fúngicas se han hecho sobre el medio Sabouraud (Argüelles, Freire & Morán, 2010).

La adición al medio de antibióticos como el cloranfenicol o la gentamicina, que inhiben el crecimiento de bacterias contaminantes, o antifúngicos especiales (como la actidiona o cicloheximida) que inhiben el crecimiento de muchos hongos no patógenos, transforman al medio de Sabouraud en un medio más selectivo (Argüelles, Freire & Morán, 2010).

Los medios de cultivo después de sembrados, se incuban a una temperatura óptima que suele ser de 25-30 °C (Argüelles, Freire & Morán, 2010).

1.9 Identificación.

Un hongo se identifica en primer lugar por la morfología macroscópica de la colonia, color, textura y velocidad de crecimiento. Para observar la estructura microscópica puede tomarse un pequeño fragmento de cultivo y montarlo entre cubre y portaobjeto, en fresco o contrastado con un colorante para su posterior observación, lo que permitirá confirmar la sospecha de hongo levaduriforme o filamentoso basada en la morfología colonial (Argüelles, Freire & Morán, 2010).

Los hongos filamentosos se identifican a nivel de género especie por la morfología del micelio, pero sobre todo por las características microscópicas de sus esporas asexuales y los elementos que las originan. Para conseguir la producción de esporas a veces se requieren medios de cultivo especiales que facilitan la esporulación. Las estructuras reproductivas asexuadas (conidioforos) son muy frágiles y para poder observarlas al microscopio sin distorsionarlas o destruirlas se emplean técnicas especiales (microcultivo) (Argüelles, Freire & Morán, 2010).

Las resiembras de colonias de hongos levaduriformes se realizan como las de las bacterias, pero para resembrar hongos filamentosos debe cortarse con el asa micológica un fragmento de micelio de la colonia y transferirlo a otro tubo; por

lo que es difícil obtener cultivos puros (Prats, 2007). Los hongos no esporulados (micelio estéril) son difícilmente identificables. Los hongos levaduriformes se identifican mediante pruebas metabólicas, de modo semejante a las bacterias (Argüelles, Freire & Morán, 2010).

Morfología macroscópica.

Los hongos levaduriformes dan lugar a colonias semejantes a las bacterias, cremosas, opacas, con un diámetro de 3 a 7 mm, y en general de crecimiento relativamente rápido (24-72 horas) (Prats, 2007).

Los hongos filamentosos dan lugar a colonias de mayor tamaño (10-30 mm) que crecen radicalmente de modo progresivo, de aspectos inconfundibles, vellosos, algodonosos o pulverulentos, de vistosos y variados colores, que deben ser observadas en el anverso y reversos, donde pueden verse si el pigmento difunde al medio. Su crecimiento suele ser más lento que el de las levaduras (3-20 días), pero pueden llegar a invadir toda la superficie del medio de cultivo. El color, forma y tamaño de las colonias puede variar según el medio de cultivo utilizado (Prats, 2007).

Los hongos dimórficos dan lugar a colonias filamentosas cuando se incuban en medios usuales entre 25 y 30 °C, y a colonias levaduriformes si se incuban en agar sangre a 37 °C (Prats, 2007).

Morfología microscópica.

Para confirmar la diferenciación entre colonias de hongos levaduriformes o filamentosos, lo que habitualmente es innecesario por su aspecto tan característico, basta efectuar un examen en fresco realizando una observación microscópica (Prats, 2007).

El examen microscópico de los cultivos se efectúa de modo diferente según se trate de colonias pertenecientes a hongos levaduriformes o filamentosos (Prats, 2007).

En hongos levaduriformes se observan efectuando una suspensión de la colonia en una gota de solución salina depositada sobre un portaobjetos y observándola en fresco, contrastándola con azul de lactofenol o fijándola y tiñéndola por la tinción de Gram. Para la observación de las colonias de hongos filamentosos, se toma un pequeño fragmento de las colonias, cortando con el asa micológica, o se recoge parte del micelio aéreo tocando la superficie de la colonia con la cara adhesiva de un fragmento de cinta adhesiva transparente que se transfiere a un portaobjetos en el que se ha depositado una gota de azul de lactofenol para su coloración. La técnica de la cinta adhesiva permite una mejor observación de la morfología y la disposición óptima de las estructuras de reproducción asexual, resultando el método de elección si se pretende la identificación de los hongos filamentosos (Prats, 2007).

1.10 Sistema de hipótesis.

Existe contaminación por Ocratoxina "A" en almendras de cacao, que superan los límites de las normativas internacionales del Códex alimentario, estableciendo Brasil un nivel máximo para la OTA en las semillas de cacao de $10 \mu\text{g} \cdot \text{Kg}^{-1}$.

CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS.

2.1 Participantes.

El presente estudio fue realizado por Alexander Javier Toaza Mora, egresado de la carrera de Ingeniería en Biotecnología de la Escuela Politécnica del Ejército. Con la colaboración del Químico Gustavo Martínez, analista del área Inocuidad Alimentaria y el apoyo de la Dra. Olga Pazmiño, directora del área de plaguicidas de la Agencia Ecuatoriana del Aseguramiento de la Calidad del Agro (AGROCALIDAD) se desarrolló el proyecto: 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”.

2.2 Localización Geográfica.

El proyecto se desarrollará en dos etapas:

Trabajo de campo (Muestreo: 42 muestras): Se realizó en diferentes provincias del país, donde se comercializa cacao: Esmeraldas, Los Ríos, Manabí, Guayas, El Oro y Santo Domingo de los Tsáchilas.

Trabajo de laboratorio (Ensayos): Se efectuaron en los laboratorios de AGROCALIDAD, en el área de Inocuidad alimentaria, ubicado en el Valle de Tumbaco, parroquia Tumbaco (Vía Interoceánica Km 14 ½ - La Granja) al nororiente del cantón Quito, provincia de Pichincha y en el laboratorio de Fitopatología bajo la tutoría científica del Ing. Abraham Oleas, de la Carrera de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias – IASA, ubicado en la hacienda “El Prado”, parroquia San Fernando, cantón Rumiñahui, provincia de Pichincha.

2.3 Periodo de Tiempo de investigación.

Fecha de inicio: 5 de Septiembre del 2011.

Fecha de Finalización: 26 de Junio del 2012.

2.4 Procedimientos y Equipos.

2.4.1 Protocolo de Muestreo.

Adaptado de: Procedimiento PEM /LAB-M/01: procedimiento específico de muestreo para muestras de alimento para control de micotoxinas (Solá, 2010).

Las muestras deberán estar envasadas en bolsas de papel o tela de algodón y así evitar la condensación de agua. Las condiciones ambientales deben ser de humedad relativa máxima 60 % y temperatura máxima de 25°C, para evitar el crecimiento de hongos.

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.

NORMA TÉCNICA ECUATORIANA NTE INEN 177:95.

Cacao en grano – Muestreo.

1. Objeto.

1.1 Esta norma establece el procedimiento para la toma de muestra del cacao en grano.

2. Alcance.

2.1 Lote. Es la cantidad específica de cacao en grano con características similares, que se somete a inspección como un conjunto unitario.

2.2 Muestra. Es un grupo de granos extraído de un lote, que sirve para obtener la información necesaria que permite apreciar una o más características de ese lote, lo cual servirá de base para tomar una decisión sobre dicho lote.

2.3 Muestra elemental. Es la cantidad de granos tomada de una sola vez y de un solo punto del lote determinado.

2.4 Muestra global o total. Es el conjunto de muestras elementales.

2.5 Muestra reducida (porción). Es la cantidad de cacao en grano que se obtiene al reducir de tamaño la muestra global.

2.6 Muestra de laboratorio. Es la cantidad de cacao en grano obtenida de la muestra reducida, que está en condiciones de ser enviada al laboratorio, para en ella efectuar los ensayos correspondientes.

2.7 Muestra de ensayo. Es la parte de la muestra de laboratorio destinada a un análisis o ensayo.

2.8 Nivel de calidad aceptable (AQL). Es el máximo porcentaje defectuoso, o el mayor número de defectos en 100 unidades, que debe tener el producto para que el plan de muestreo de por resultado la aceptación de la mayoría de los lotes sometidos a inspección.

2.9 Nivel de inspección. Es el número que identifica la relación entre el tamaño del lote y el tamaño de la muestra.

2.10 Envase (saco). Es el recipiente que contiene cacao en grano y que está destinado a protegerlo del deterioro, contaminación y a facilitar su manipulación.

2.11 Saca muestras. Instrumento que se utiliza para extraer el producto de un embalaje.

2.12 Producto granel. El que no está envasado.

3. Disposiciones generales.

3.1 Se deberá tomar todo tipo de precauciones para evitar la contaminación del cacao en grano durante el muestreo.

3.2 Las muestras serán identificadas consecutivamente según hayan sido tomadas.

3.3 Las muestras se protegerán contra los cambios en su composición, pérdidas y contaminación por impurezas, etc.

4. Muestreo.

4.1 Toma de muestras.

4.1.1 Si el cacao en grano que se va a muestrear se presenta en envases de distintos tamaños se deberá agrupar en lotes de acuerdo con la capacidad de los envases, es decir, en cada lote deberá haber envases de una misma capacidad.

4.1.2 El número de muestras elementales extraídas completamente al azar, estarán en función de lo indicado en la tabla 2.1, y serán tomadas en gramos.

4.1.3 Las muestras elementales que en conjunto forman la muestra global, podrán ser de aproximadamente de 100 a 1.000 gramos, las mismas que

serán divididas de acuerdo a lo indicado en el numeral 4.4.1., hasta obtener una muestra reducida de 1.500 gramos.

4.1.4 Las muestras en los lotes para producto envasado o empacado se obtendrán realizando un muestreo al azar, para lo cual se enumerarán las unidades del lote, se utilizarán los números aleatorios, y el número de muestras según lo establecido en la tabla 2.1. En los envases la muestra se obtendrá introduciendo el calador en un solo punto, este deberá penetrar por lo menos hasta la mitad diagonal el saco, y por lo menos en tres puntos seleccionados al azar.

Cuando por condiciones del sitio de almacenamiento no sea posible movilizar el producto, se podrá muestrear las caras visibles del lote. Cuando las partes interesadas consideren conveniente se hará un corte longitudinal el mismo que deberá llegar hasta el fondo del lote, con lo cual se tendrá dos caras adicionales para muestrear. Siempre se utilizará un sistema de muestreo aleatorio, para lo cual el número de muestras elementales establecidos en la tabla 2.1, serán divididas para el número de caras visibles del lote.

4.1.5 Para muestreo de productos a granel y para obtener una muestra verdaderamente representativa, este deberá efectuarse en el lugar y momento adecuado, que será de preferencia en el momento de la carga, descarga o empaque del producto; cuando no se puedan aplicar los criterios anteriormente indicados, las muestras elementales serán tomadas en forma aleatoria o completamente al azar y a diferentes profundidades, y con uno de los caladores. El lote de productos a granel se reducirá matemáticamente a sacos de (n) kilogramos y se aplicará la tabla 2.1.

4.1.6 Cuando el producto esté en movimiento, durante las operaciones de carga y descarga, la toma de unidades de muestreo se hará a base del tiempo que va a durar el producto en movimiento, y se dividirá dicho tiempo para el número de muestras elementales que se deben tomar de acuerdo a lo establecido en la tabla 2.1. El resultado indica la frecuencia de la extracción. El lote de productos a granel se reducirá matemáticamente a sacos de (n) kilogramos y se aplicará la tabla 2.1.

Tabla 2.1: Número de muestras elementales de cacao.

<i>Tamaño del lote (número de sacos)</i>	<i>Número mínimo de muestras elementales</i>
2 – 8	2
9 – 15	3
16 – 25	5
26 – 50	8
51 – 90	13
91 – 150	20
151 – 280	32
281 – 500	50
501 - 1.200	80
1.201 - 3.200	125
3.201 - 10.000	200
10.001 - 35.000	315
35.001 - 150.000	500
150.001 - 500.000	800
Mayor a 500.001	1250

Tomado de: NTE INEN 177:95 (S/F).

*el tamaño de la muestra puede cambiar, dependiendo del nivel de inspección acordado entre el comprador y vendedor. Muestreo por atributos.

4.2. Sacamuestras.

Dependiendo de la forma de presentación se podrá utilizar: Calador sacamuestras de compartimiento de doble tubo. Compuesto de dos tubos metálicos concéntricos, ambos con aberturas que coincidan entre sí. El diámetro del tubo interior es ligeramente menor al del tubo exterior, lo cual hace posible la rotación mediante el uso de la manivela. La forma y dimensiones del calador sacamuestras de compartimiento.

4.3. Divisores.

Divisor tipo Boerner. Aparato constituido por un alimentador (a) una serie de tubos distribuidores (b) y un recipiente (c). Sirve para distribuir el producto, dividiendo las muestras en dos porciones representativas, y también para homogenizar la muestra haciéndola pasar varias veces por el aparato cuarteador.

4.4. Reducción por cuarteo.

4.4.1. Tanto para el cuarteo que se efectúe en forma manual o mecánicamente, la cantidad del producto de la recolección de las muestras elementales se mezclará muy bien para tomar la muestra global, para luego dividirla en 4 partes iguales; se eliminarán dos porciones diagonalmente opuestas, las otras dos se mezclarán de nuevo y se repetirá sucesivamente la operación hasta obtener el tamaño requerido de muestra reducida (1.500 gramos) según lo establecido en el numeral 4.1.3.

4.5. Condiciones posteriores al muestreo.

4.5.1. La muestra reducida (1.500 gramos) se dividirá en tres muestras iguales, destinadas: una al vendedor, otra al comprador para destinarla al laboratorio de análisis y la tercera a la entidad que debe actuar en casos de discrepancia.

4.5.2. La muestra reducida y dividida según se indica en el numeral anterior (4.5.1.) Se distribuirá en recipientes adecuados (envases plásticos, etc.), limpios y secos, que se cerrarán herméticamente, se les pondrá los sellos o firmas de las partes interesadas.

4.5.3. Se deberá suscribir un acta de muestreo que incluya la siguiente información:

- a) Número de la norma INEN de referencia: NTE INEN 177.
- b) Dirección donde se realizó el muestreo.
- c) Lugar y fecha donde se realizó el muestreo (establecimiento, bodega, etc.).

- d) Nombre de la compañía comercializadora del cacao en grano y nombre del comprador.
- e) Nombre comercial del cacao en grano (clasificación-tipo, nombre científico).
- f) Número de lote.
- g) Capacidad de los envases del lote, o cantidad a granel.
- h) Número de envases y/o empaques muestreados.
- i) Tamaño de la muestra en gramos del cacao en grano muestreado.
- j) Observaciones sobre condiciones en que se encuentra el cacao en grano.
- k) Nombre y firma de la persona que realizó el muestreo.
- l) Nombre y dirección de las partes interesadas.

4.5.4. La muestra (500 gramos) destinada al análisis deberá enviarse al laboratorio tan pronto como se haya tomado, si no es posible hacer esto, se deberá guardar de tal modo que no se altere la calidad del cacao en grano, el tiempo que dure guardado no deberá ser mayor de 15 días. Las dos muestras restantes se almacenarán por el término de 30 días para efectos de discrepancia entre los interesados, y en condiciones que no afecte la calidad del cacao en grano.

2.4.2 Protocolo de Curva de Calibración.

Para la preparación de la curva de calibración se partió de una solución stock de $102 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 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 (Ver Anexo A).

Tabla 2.2: Preparación de soluciones Estándares de trabajo.

Solución Estándar	Alícuota a tomar de la solución stock en μL	Concentración de Ocratoxina "A" ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)
1	20	0.204
2	80	0.816
3	150	1.53
4	300	3.06
5	500	5.1

Tomado de: Turcotte & Scott, (2010).

2.4.3 Protocolo de Extracción, Purificación y Cuantificación.

El protocolo fue de tomado de Hurst & Martin (1998), con ligeras modificaciones.

A) 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.

B) 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 eluidas.

C) Método de Cuantificación.

- a. Se inyectó 50 uL de cada muestra en el equipo HPLC bajo las condiciones que se anotan en la tabla 2.3, 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.

Tabla 2.3: Condiciones utilizadas para la cuantificación en el HPLC.

CONDICIONES UTILIZADAS DEL HPLC	
Columna Analítica	Dionex Acclaim 120; C ₁₈ , 5µm; 120Å, 4.6×150 mm
Pre Columna	Security Guard, Phenomenex
Fase móvil, *tipo de elución: isocrática	Acetonitrilo - agua- ácido trifluoroacético (TFA) (40:59.7:0.3, v/v/v)
Velocidad de flujo	1.5 mL/min
Detector de Fluorescencia:	Excitación: 330 nm
	Emisión: 460 nm
Horno:	40 °C
Volumen de Inyección	50 µL

Tomado de: Hurst & Martin, (1998).

- b. Cálculos: Se identificó el pico en el cromatograma por comparación del tiempo de retención con el correspondiente estándar de referencia y se extrapoló la cantidad de Ocratoxina “A” de la curva de calibración que correspondía al área del pico de la muestra. En los anexos B y C se incluyen los cromatogramas.

Finalmente, para determinar la concentración de Ocratoxina “A” en la muestra se aplicó la siguiente fórmula (Martínez, 2012):

$$Co(ng/kg) = \frac{10xCi(ng/ml)x1000}{M(g)}$$

Donde:

Co: Concentración de Ocratoxina “A” en la muestra ($ng \cdot Kg^{-1}$).

Ci: Concentración de Ocratoxina “A” en la curva ($ng \cdot mL^{-1}$).

M: Porción de muestra tomada para el análisis (g).

2.4.4. Método de descontaminación del material.

El material de vidrio utilizado en la extracción y purificación de Ocratoxina “A”, fue sumergido durante 24 h en etanol, al siguiente día se enjuagó el material y se añadió una solución clorada al 0.5% por 30 minutos y se realizó un lavado con jabón y enjuague con agua destilada. Finalmente, se secó todo el material en una estufa a 50°C.

El material desechable se descartó en fundas rojas etiquetado como material peligroso y los desechos líquidos se descartaron en envases apropiados para solventes.

2.4.5 Estándar de Ocratoxina “A”.

El estándar de Ocratoxina “A” fue de la marca Sigma-Aldrich (Fluka analytical), se dispuso de 2mL, con una concentración de $10.2 \mu g \cdot mL^{-1}$ en acetonitrilo y se mantuvo almacenada en congelación.

El producto en referencia puede causar cáncer y provoca alteraciones genéticas hereditarias. Muy tóxico en caso de inhalación, contacto con la piel o ingestión. Evítese la exposición - recábense instrucciones especiales antes de su uso. En caso de accidente o malestar, acúdase inmediatamente al médico (Sigma-Aldrich, 2011).

2.4.6 Manifold.

Bomba peristáltica multicabezal de Agilent Technologies denominado: Agilent SampliQ12 and 20-Position SPE Manifold. Permite una típica extracción en fase sólida SPE (acondicionar, cargar, lavar y eluir el analito de interés) hasta en 20 cartuchos en paralelo (Ilustración 2.1). Está constituido por vidrio, polietileno, polipropileno y componentes Delrin, contiene un manómetro que permite revisar el nivel de presión dentro de la cámara junto con válvulas que permiten controlar individualmente el flujo de cada posición (Agilent Technologies, 2010).



Ilustración 2.1: Manifold. (Toaza, 2012).

2.4.7 Columnas de Fase - Reversa SPE (RP-SPE).

La Fase – Reversa SPE, es la técnica más importante utilizada en el pretratamiento de muestras para el HPLC, donde se utilizan componentes de columnas C_{18} o C_8 . En su forma más simple SPE emplea una pequeña columna o cartucho de plástico desechable, a menudo el cilindro de una jeringa médica empacada con 0.1 a 0.5 gramos de sorbente. El sorbente es comúnmente un material de Fase – Reversa (C_{18} - silica) y por eso se la denomina Fase – Reversa SPE o sus siglas (RP-SPE) (Snyder *et al.*, 1997; Dean, 1998).

Las técnicas de Fase – Reversa SPE son las más populares, ya que pequeñas cantidades de solvente orgánico son requeridas para la elución, manteniendo una alta concentración de analito (Snyder *et al.*, 1997; Dean, 1998).

La extracción Fase – Reversa SPE (RP-SPE), se encarga de separar los analitos de la muestra original, consiguiendo gracias a ello una mejor selectividad, al eliminar los posibles interferentes que se puedan encontrar en la muestra (Snyder *et al.*, 1997; Dean, 1998; Fritz, 1999).

La (RP-SPE) se basa en la partición selectiva o distribución de uno o más compuestos entre dos fases. La primera es un sólido adsorbente; la segunda fase suele ser un líquido, pero también puede ser una emulsión, un gas o un fluido supercrítico. El objetivo principal de la (RP-SPE) es separar selectivamente los analitos de interés de una muestra y la eliminación de la matriz interferente. Estos analitos pueden ser adsorbidos por el sólido, o bien permanecer en la otra fase siendo en este caso los compuestos interferentes los que quedarían retenidos en la fase sólida. Y posteriormente los analitos pueden ser recuperados empleando un disolvente adecuado para su elución (Ilustración 2.2) (Snyder *et al.*, 1997; Dean, 1998; Fritz, 1999).

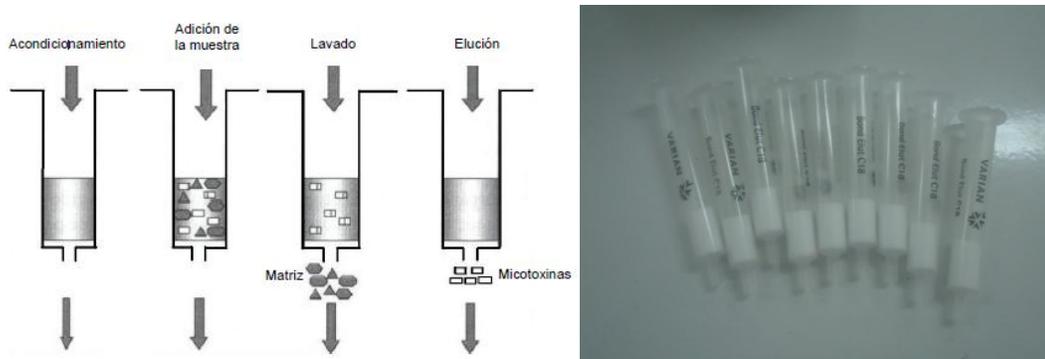


Ilustración 2.2: Extracción en Fase – Reversa (RP-SPE) de micotoxinas.

Tomado de: Soriano, (2007); Toaza, (2012).

2.4.8 HPLC (Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia).

El equipo *Ultimate 3000 x2 Dual Analytical LC System* de Dionex posee un sistema que combina la flexibilidad de selección de disolvente ternarios con la productividad y el rendimiento de doble sistema de LC (Liquid Cromatography), a

presiones de hasta 620 bares (Ilustración 2.3). Está completamente integrado con el software para control instrumental y procesamiento de datos Chromeleon, posee detectores de arreglo de diodos (Diode Array) y de fluorescencia. El detector de fluorescencia FLD-3400RS está optimizado para sensibilidad alta, por tanto es posible detectar pequeños picos. Opera entre 200 a 900 nm (DIONEX, 2011).

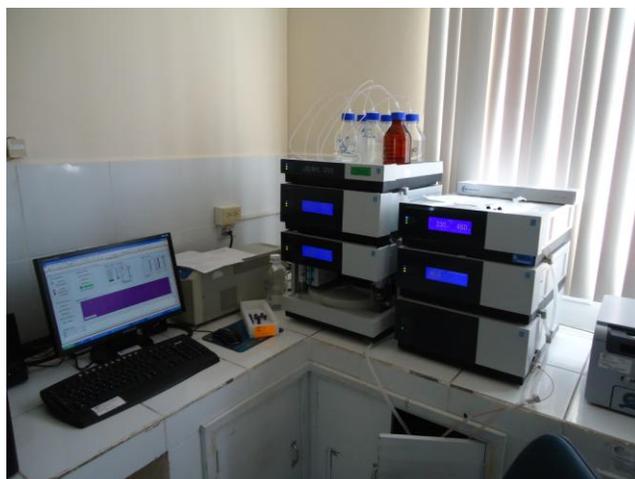


Ilustración 2.3: HPLC y detector de fluorescencia. (Toaza, 2012).

2.4.9 Análisis por UHPLC-MS/MS.

Para la confirmación de la Ocratoxina “A” se utilizó un espectrómetro de masas (Ver Anexo D - F).

El Xevo™ TQ-S de Waters está diseñado para las aplicaciones cuantitativas de UPLC®/MS/MS más exigentes (WATERS, 2011). Incluye una tecnología de fuente de ionización nueva y revolucionaria, con eje desplazado, conocida como StepWave™, que aumenta aún más la alta sensibilidad que ofrece el Xevo TQ. Esta mejora del rendimiento le permite medir compuestos de forma exacta, potente y reproducible a concentraciones mucho más bajas (WATERS, 2011).

El Xevo TQ-S también incluye la tecnología de cámara de colisión ScanWave™ que mejora las capacidades de adquisición de datos espectrales de LC/MS/MS (WATERS, 2011).

Hoy en día el uso de técnicas cromatográficas acopladas a sistemas de detección de MS en el análisis de contaminantes a niveles traza está ampliamente implantado, permitiendo detectar componentes individuales en mezclas complejas, proporcionando información cualitativa y cuantitativa de gran calidad. La MS es una herramienta poderosa en la cuantificación - confirmación de contaminantes dada su alta sensibilidad y selectividad. La MS permite la generación de iones en fase gaseosa, además de su separación y detección, proporcionando información de la masa molecular del compuesto analizado, así como información estructural del mismo, comprendiendo básicamente tres etapas (Garrido, 2009, citado por Gómez, 2011):

- Ionización de la muestra.
- Separación y análisis de los iones y fragmentos cargados según su relación masa/carga (m/z).
- Detección de los iones y producción de la correspondiente señal eléctrica.

“El mayor avance en el análisis de micotoxinas en los últimos años ha sido el acoplamiento de LC con MS, utilizando ionización a presión atmosférica, ya sea por electronebulización (ESI) o ionización química a presión atmosférica (APCI). La ionización ESI muestra una mayor sensibilidad, por lo que es la técnica más utilizada. El desarrollo de la MS en varias etapas (MS^n) y LC acoplada a MS en tándem (LC-MS/MS) ha permitido el desarrollo de métodos multi-análisis de micotoxinas pertenecientes a familias diferentes y en distintas matrices, lo que posibilita una detección cuantitativa eficiente sin necesidad de derivatización” (Gómez, 2011).

“Los estudios mediante LC-MS/MS permiten un aumento de la sensibilidad utilizando el modo de trabajo de monitorización de reacciones seleccionadas (SRM, single reaction monitoring), para la determinación e identificación de estos compuestos” (Gómez, 2011).

En el análisis para la determinación de Ocratoxina “A” se empleó el espectrómetro de masas de triple cuadrupolo, QqQ. El modo de trabajo SRM es el que más se usa con fines cuantitativos y para el análisis de trazas con QqQ. Además, este modo ha sido el seleccionado en este trabajo para llevar a cabo la detección de ocratoxina “A” (Sypecka, 2004; Jestoi, 2009, citados por Gómez, 2011).

En SRM, el primer filtro de masas (Q1) se configura para dejar pasar los iones precursores seleccionados aproximadamente el tiempo de retención previsto para cada componente. Cuando el compuesto eluye del sistema cromatográfico, los iones precursores seleccionados pasan a través del filtro de masas mientras que los iones de los otros compuestos no lo harán (Sulyok, 2010, citado por Gómez, 2011).

A continuación, estos iones precursores pasan a una celda de colisión (q), en la cual se introduce un gas que choca con ellos. Si a los iones se les proporciona una energía suficiente durante la colisión se producen fragmentos característicos de cada uno de ellos, los cuales pasan al tercer filtro de masas (Q3). En este filtro de masas se va a establecer un campo constante para seleccionar sólo un fragmento específico del ion precursor (Sulyok, 2007, citado por Gómez, 2011). De esta forma el compuesto sólo se detectará si el ion seleccionado en Q1 produce un determinado fragmento que es analizado en Q3 (Sulyok, 2007, citado por Gómez, 2011).

En los últimos años se han llevado a cabo una gran cantidad de métodos para analizar micotoxinas, mostrándose un especial interés en desarrollar un

método multi-micotoxina que permita realizar análisis de rutina de un elevado número de estos compuestos, pertenecientes a diferentes familias (Jestoi, 2009; Ren, 2007, citados por Gómez, 2011).

En el trabajo realizado se ha aplicado UHPLC-QqQ-MS/MS, empleando una fuente de ionización de electronebulización en modo positivo (ESI+). En este sentido el acoplamiento de UHPLC a la técnica MS/MS, mejora considerablemente la detección, puesto que la reducción de la anchura de pico provoca un aumento en la eficacia de la ionización, lo que conlleva una mejora en la sensibilidad del método analítico (Sulyok, 2010, citado por Gómez, 2011). Las condiciones y parámetros utilizados se detallan a continuación en las tablas 2.4 y 2.5 respectivamente.

Tabla 2.4: Condiciones utilizadas para la cuantificación en el Espectrómetro de masas.

CONDICIONES UTILIZADAS DEL ESPECTRÓMETRO DE MASAS.	
Columna Analítica	Acquity UPLC BEH C ₁₈ , 1.7µm; 2.1×50 mm de Waters
Fase móvil, * tipo de elución: gradiente	Botella 1: Agua – Acetato de Amonio 10mM – 0.1% Ácido acético. Botella 2: Metanol - Acetato de Amonio 10mM – 0.1% Ácido acético.
Velocidad de flujo	0.5 mL/min
Volumen de Inyección	5 µL

Tomado de: Martínez, (2012).

Tabla 2.5: Parámetros específicos MS/MS para Ocratoxina “A”.

Compuesto	ESI	VTR (min)	Voltaje de cono (V)	Transición de cuantificación (m/z)a	Transición de confirmación (m/z)a
Ocratoxina “A”	+	3.04-3.9	25	404.2>239.2 (20)	404.2>358.2 (15)

Tomado de: Gómez, (2011).



Ilustración 2.4: Xevo™ TQ-S de Waters UPLC-MS/MS. (Toaza, 2012).

2.4.9 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 $\mu\text{g} \cdot \text{Kg}^{-1}$ 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 microscopio Binocular Olympus, para realizar la identificación taxonómica a nivel de género, se utilizo la clave taxonómica formulada por Barnett & Hunter (2003).

CAPÍTULO 3: RESULTADOS.

Los resultados de esta 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.

Resultados de la evaluación de los niveles de Ocratoxina “A” por HPLC.

Tabla 3.1: Concentración de Ocratoxina “A” en $\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$ en muestras provenientes de las provincias de Esmeraldas, Los Ríos, Manabí, Guayas, Santo Domingo de los Tsáchilas y El Oro (Toaza, 2012).

Provincia	[OTA] ($\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$)	Repetición
St. Domingo	0	1
St. Domingo	0	2
Manabí	0	1

Manabí	0	1
Manabí	0	1
Manabí	0	1
Manabí	0	2
Esmeraldas	0	1
Esmeraldas	5.53	1
Esmeraldas	0	1
Esmeraldas	4.25	1
Esmeraldas	0	2
Esmeraldas	2.35	2
Esmeraldas	0	2
Esmeraldas	2.55	2
Esmeraldas	0	2
Esmeraldas	0	2
Esmeraldas	0	2
El Oro	4.99	1
El Oro	0	1
El Oro	1.87	1
El Oro	0	1
El Oro	5.23	2
El Oro	0	2
El Oro	2.63	2
El Oro	0	2
Los Ríos	0	1
Los Ríos	3.40	1
Los Ríos	0	1

Los Ríos	0	1
Los Ríos	0	2
Los Ríos	3.52	2
Los Ríos	0	2
Guayas	0	1
Guayas	0	1
Guayas	2.42	1
Guayas	0	2
Guayas	0	2
Guayas	1.66	2
Guayas	0	2

En el gráfico 3.1 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.

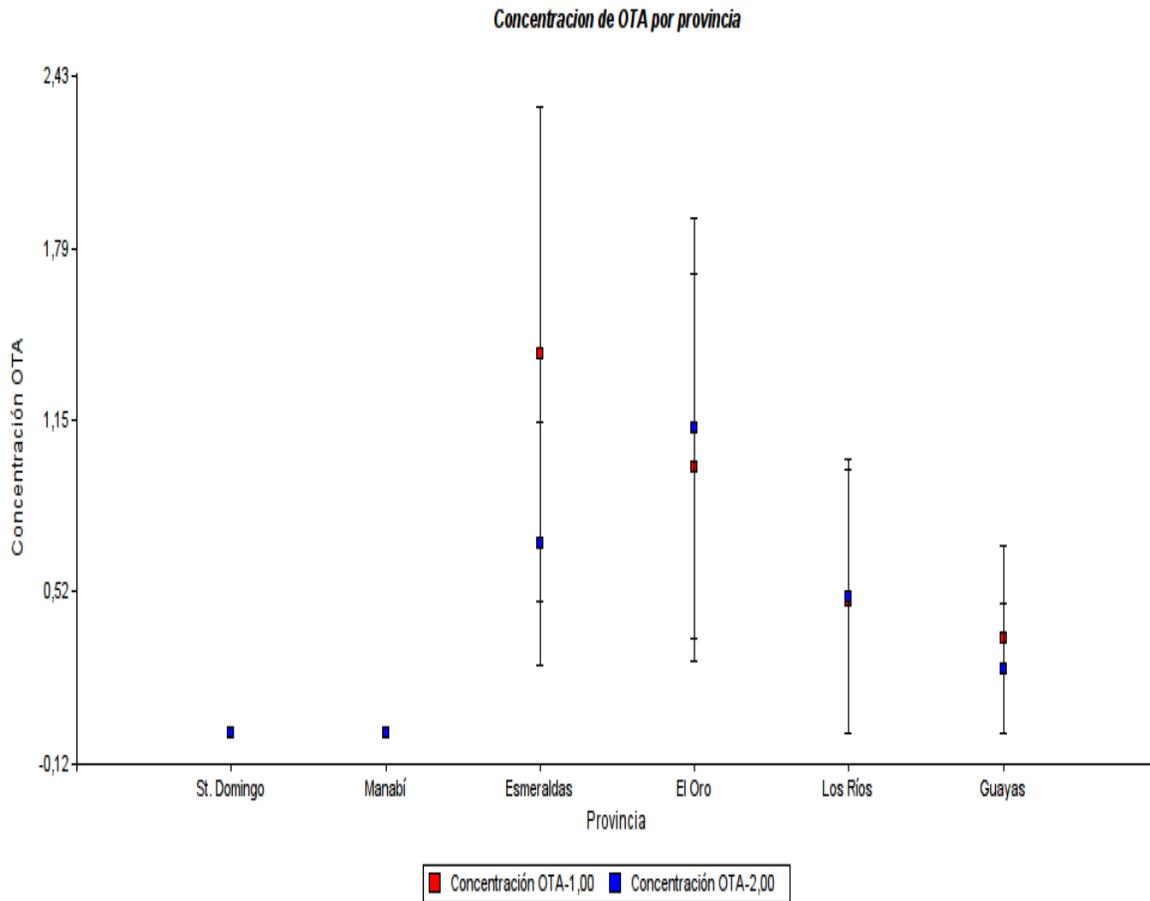


Gráfico 3.1: Gráfico de puntos para las concentraciones de Ocratoxina “A” en $\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$ por provincias (Toaza, 2012).

En el gráfico 3.2 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 3.3 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.

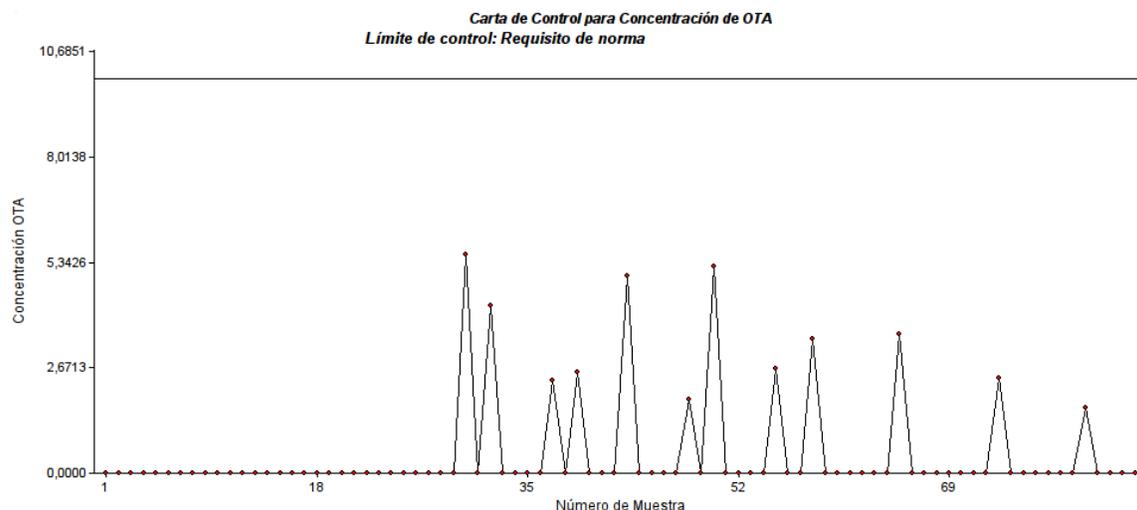


Gráfico 3.2: Carta de control para las concentraciones de OTA comparadas con el límite permisible del Código Alimentario (Toaza, 2012).

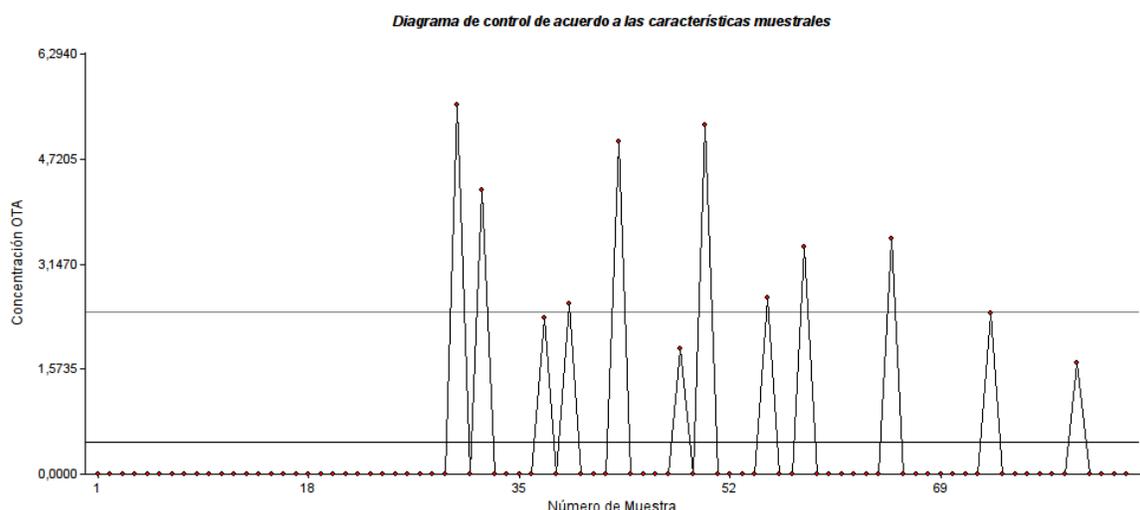


Gráfico 3.3: Carta de control para las concentraciones de OTA según los límites característicos de la población (Toaza, 2012).

Del análisis de la tabla 3.2 y del gráfico 3.4, 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 3.2: 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

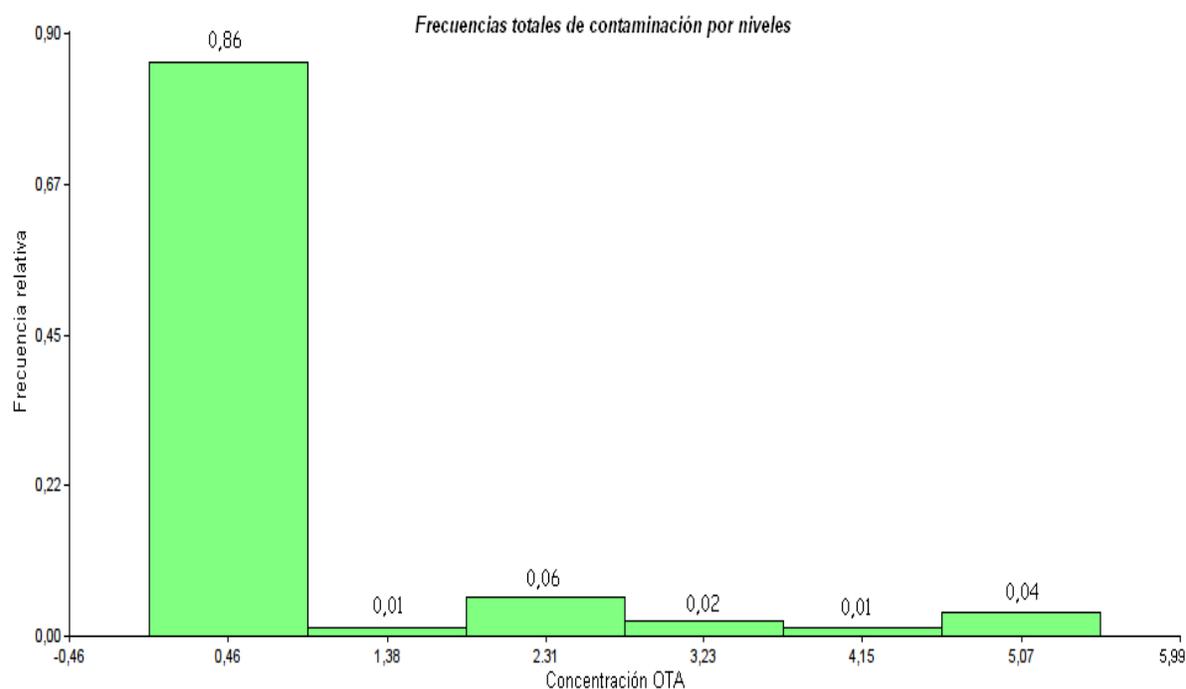


Gráfico 3.4: Frecuencias relativas para las concentraciones de Ocratoxina “A” en las muestras de almendras de cacao (Toaza, 2012).

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 $10 \mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$.
- 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 $10 \mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$.

En tabla 3.3 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 3.3: 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).

Tabla 3.4: Resultados del análisis micológico de las muestras de almendras de cacao, provenientes de las provincias de Esmeraldas, Los Ríos, El Oro, Guayas y de la muestra que no presentó Ocratoxina “A” (Blanco) (Toaza, 2012).

Muestras	Repet.	<i>Aspergillus</i>	<i>Cladosporium</i>	<i>Mucor</i>	<i>Moniliophthora</i>	<i>Epicoccum</i>	<i>Alternaria</i>
1= Blanco	1	1	9	0	0	0	0
1= Blanco	2	3	7	0	0	0	0
1= Blanco	3	0	0	0	0	0	0
1= Blanco	4	0	0	0	0	0	0
1= Blanco	5	0	1	0	0	0	0
2 = Esmeraldas	1	0	0	10	0	0	0
2 = Esmeraldas	2	0	0	10	0	0	0
2 = Esmeraldas	3	0	0	10	0	0	0
2 = Esmeraldas	4	0	0	10	0	0	0
2 = Esmeraldas	5	0	0	10	0	0	0
3= Esmeraldas	1	0	0	10	0	0	0
3= Esmeraldas	2	0	0	10	0	0	0
3= Esmeraldas	3	0	0	10	0	0	0
3= Esmeraldas	4	0	0	10	0	0	0
3= Esmeraldas	5	0	0	10	0	0	0
4= Los Ríos	1	0	0	10	0	0	0
4= Los Ríos	2	0	0	10	0	0	0
4= Los Ríos	3	0	0	10	2	0	0
4= Los Ríos	4	0	0	10	0	0	0
4= Los Ríos	5	0	0	10	0	0	0
5= El Oro	1	0	0	10	0	0	0
5= El Oro	2	0	0	10	0	0	0
5= El Oro	3	0	0	0	0	0	0
5= El Oro	4	0	0	10	0	0	0
5= El Oro	5	0	0	10	0	0	0
6= El Oro	1	0	5	0	0	5	0
6= El Oro	2	0	0	0	0	0	0
6= El Oro	3	0	0	0	0	0	0
6= El Oro	4	0	4	0	0	0	0
6= El Oro	5	0	0	0	0	0	0
7= Guayas	1	0	0	10	0	0	1
7= Guayas	2	0	0	0	0	0	0
7= Guayas	3	0	0	0	0	0	0
7= Guayas	4	0	0	10	0	0	0
7= Guayas	5	0	0	10	0	0	0

En las figuras 3.5, 3.6 y 3.7 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* (Ver Anexo G). En las provincias de Esmeraldas, El Oro, Los Ríos y Guayas fue donde se encontró mayor presencia de *Mucor*.

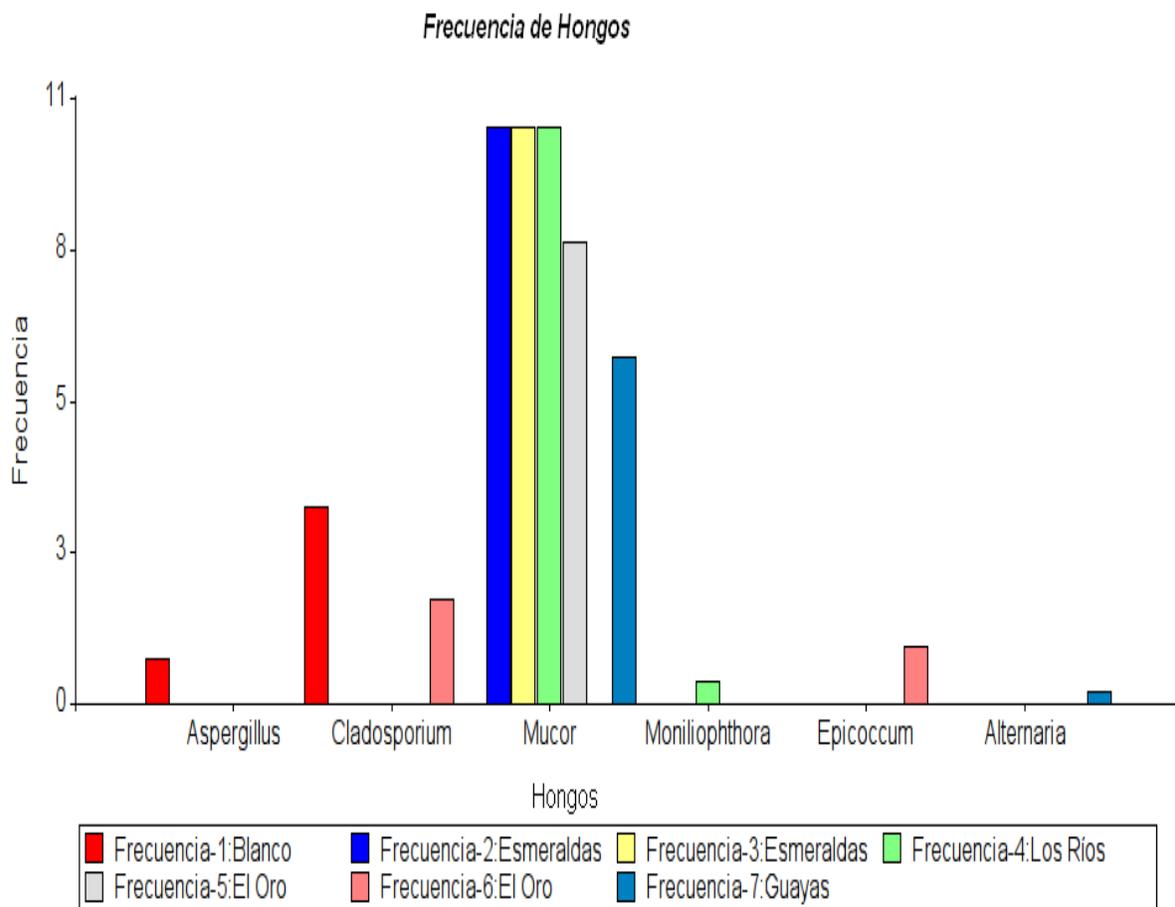


Gráfico 3.5: Distribución de hongos presentes en almendras de cacao, de muestras procedentes de las provincias (Toaza, 2012).

Porcentaje de Hongos por Provincias

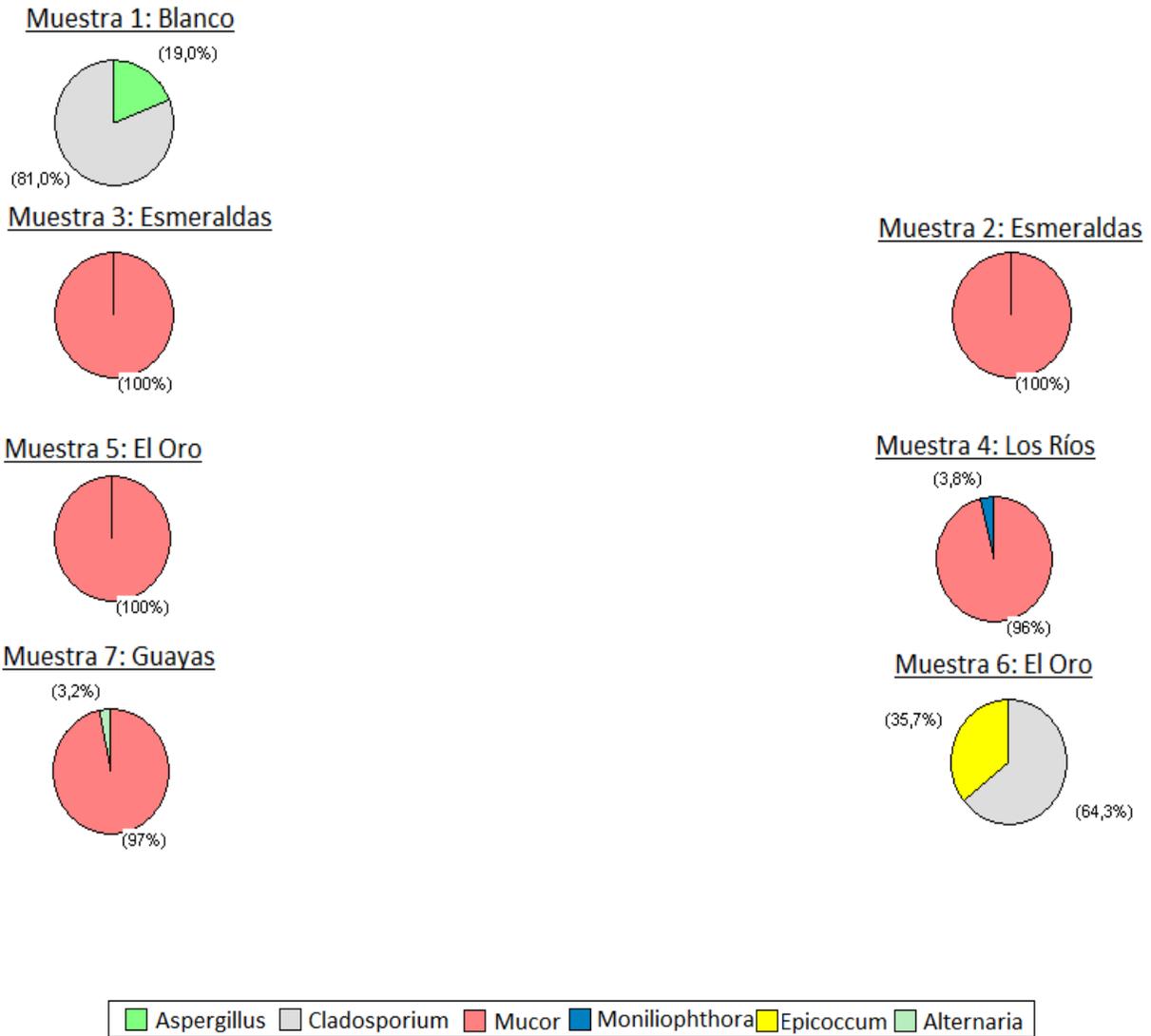


Gráfico 3.6: Distribución porcentual de hongos aislados de almendras de cacao presentes en muestras obtenidas de cada provincia (Toaza, 2012).

Porcentaje Global de Hongos en Muestras de Cacao

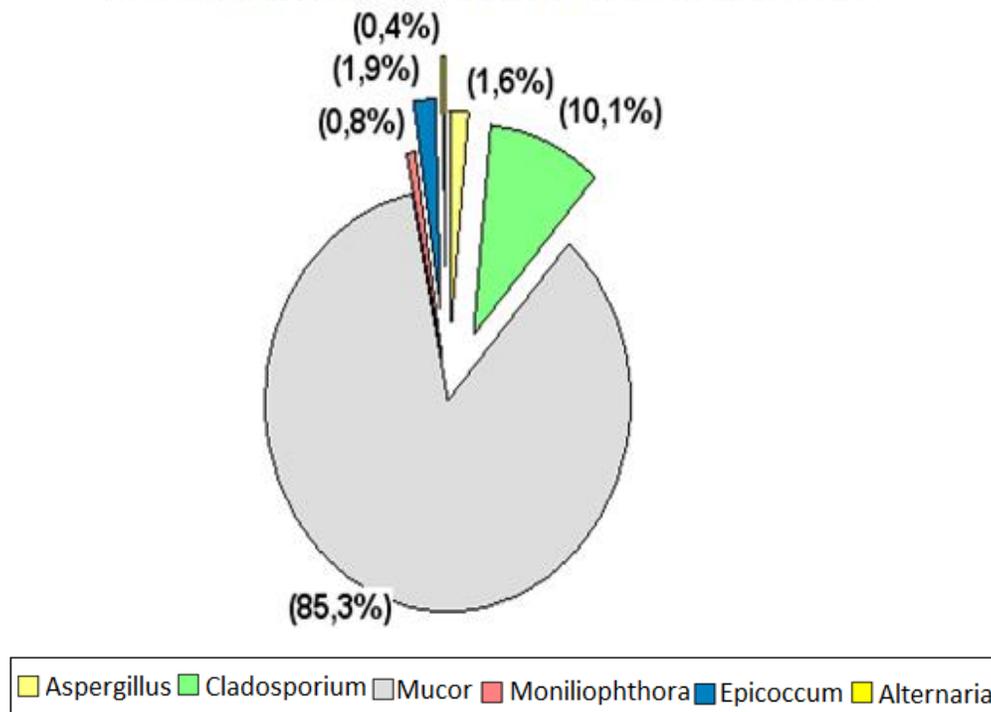


Gráfico 3.7: Gráfico de Sectores en base a la incidencia de hongos, identificados en almendras de cacao, muestreadas en diversas provincias (Toaza, 2012).

Con los datos obtenidos en los gráficos anteriores, se comprueba en la tabla 3.5 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 obtuvo 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:

- Hipótesis nula:** Los hongos presentes en la investigación se encuentran en igual proporción.
- Hipótesis alterna:** Por lo menos uno de los hongos no se encuentra en igual proporción.

Tabla 3.5: 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	<i>Alternaria</i>	35	0.03	0.17	0.00	32.98	<0.0001
conteo	<i>Aspergillus</i>	35	0.11	0.53	0.00		
conteo	<i>Cladosporium</i>	35	0.74	2.12	0.00		
conteo	<i>Epicoccum</i>	35	0.14	0.85	0.00		
conteo	<i>Moniliophthora</i>	35	0.06	0.34	0.00		
conteo	<i>Mucor</i>	35	6.29	4.90	10.00		

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

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)

CAPÍTULO 4: 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: $[1.66 \mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}; 5.53 \mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}]$, 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 $10 \mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$, 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 3.3, se obtuvo 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 pérdidas 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 sustrato 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 –Hérvás *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 obtuvo *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 –Hérvás (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 inmunotóxicos, 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 obtuvo de las muestras eran de Ocratoxina "A", ya que es un método más exacto y directo para determinar masas atómicas y moleculares (Gómez, 2011).

CAPÍTULO 5: 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 obtuvo 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 $10 \mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$.
- 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.

CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES.

- Desarrollar estudios para conocer cuáles son las especies fúngicas que se encuentran de forma habitual en almendras de cacao y detectar mediante biología molecular que secuencias son las específicas para sintetizar Ocratoxina “A”.
- En una segunda etapa se recomienda realizar la validación de Ocratoxina “A” con la metodología planteada de extracción, por espectrometría de masas.
- Realizar e instaurar mecanismos efectivos con el sistema de análisis de peligros y de puntos críticos de control (APPCC) para Ocratoxina “A” en cacao y otros alimentos, aplicando métodos de gestión de la inocuidad de los alimentos con: Buenas prácticas agrícolas (BPA), Buenas prácticas de almacenamiento (BPAL) y Buenas Prácticas de Manufactura (BPM), con el fin de evitar patologías severas tanto en hombres como en animales.
- Seguir todas las instrucciones de los protocolos analíticos y las buenas prácticas de laboratorio para evitar resultados erróneos por falta de cuidado en la manipulación de los elementos de ensayo y los equipos de medición.

- Debido a la falta de información adecuada y que la normativa para ciertas matrices es limitada, se recomienda que en base a estos estudios se genere normativas en micotoxinas, así como de otras sustancias en los diferentes grupos de alimentos y con ello establecer mejores controles en materia de seguridad alimentaria.

CAPÍTULO 7: 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.jsp?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 x2 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 *Azotobacter* 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 contaminated 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 cheeses with *Aspergillus versicolor* and sterigmatocystin. Proceedings of a fourth 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 Economía*1, 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®ion=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.