



EDUCACIÓN

SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



Instituto Tecnológico de Veracruz

Subdirección Académica

División de Estudios de Posgrado e Investigación

"2020, Año de Leona Vicario, Benemérita Madre de la Patria"

OFICIO: ITV/DEPI/No.095/2020

A QUIEN CORRESPONDA PRESENTE

Por medio de la presente el que suscribe Dr. Benigno Ortiz Muñiz, Jefe de la División de Estudios de Posgrado e Investigación del Instituto Tecnológico de Veracruz me permito hacer **CONSTAR** que, de acuerdo a los archivos de esta División de Estudios, el (la) **Dr. Oscar González Ríos** fungió como **Co-Director(a)** de la Tesis de Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica titulada: **"Impacto de las vías de procesamiento postcosecha del grano de cacao (*Theobroma cacao* L.) sobre la contaminación por hongos toxigénicos"** desarrollada por el (la) **C. Samuel Hernández Medina**, número de control **M16020004**.

Se extiende la presente a la Ciudad de Veracruz, Veracruz a los cinco días del mes de marzo del año dos mil veinte.

ATENTAMENTE

*Excelencia en Educación Tecnológica®
Antorcha y Luz de Fuego Permanente®*



SEP
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO


BENIGNO ORTIZ MUÑIZ

JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE VERACRUZ
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN

C.c. Archivo



Calz. Miguel Ángel de Quevedo 2779, Col. Formando Hogar

C.P. 91897, Veracruz, Ver. Tel. (229) 934 1500

www.veracruz.tecnm.mx





SEP

SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA

TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE VERACRUZ

CERTIFICACIÓN DE ACTA DE EXAMEN DE GRADO DE MAESTRÍA



El suscrito Director del Instituto Tecnológico de Veracruz, certifica que en el Libro para Actas de Examen de Grado de Maestría N° 1 autorizado el día 18 del mes de Agosto del 2014 por la Dirección de Servicios Escolares y Estudiantiles de la Dirección General del Tecnológico Nacional de México, se encuentra asentada en la foja número 091 el Acta que a la letra dice: En la H. Veracruz, Veracruz a los 25 días del mes de Junio de 2018, siendo las 12:00 horas, se reunieron en el Aula Magna del Instituto Tecnológico de Veracruz, clave 30DIT0002U, el jurado integrado por:

Presidente(a): Doctora en Ciencias de los Alimentos Mirna Leonor Suárez Quiroz 5691003

Secretario(a): Doctor en Ciencias de los Alimentos Oscar González Ríos 5691004

Vocal: Doctora en Ciencias en Alimentos Patricia Guillermina Mendoza García 7768863

Y de acuerdo con las disposiciones reglamentarias en vigor, se procedió a efectuar el examen de Grado de Maestría a el (la) C. **SAMUEL HERNANDEZ MEDINA**, número de control **M16020004** aspirante al Grado de **MAESTRO EN CIENCIAS EN INGENIERÍA BIOQUÍMICA**.

Tomando en cuenta el contenido de la **TESIS** cuyo título es: **"Impacto de las vías de procesamiento postcosecha del grano de cacao (Theobroma cacao L.) sobre la contaminación por hongos toxigénicos"** que fue dirigida por **Dra. Mirna Leonor Suárez Quiroz; Dr. Oscar González Ríos**, una vez concluido el examen oral, dictaminó que fuera **APROBADO (A)**.

El (la) Presidente (a) del jurado le hizo saber a el (la) sustentante el resultado obtenido, el Código de Ética Profesional y le tomó la Protesta de Ley. Dándose por terminado el Acto a las **14:00** horas, y una vez escrita, leída y aprobada, fue firmada para constancia por las personas que en el acto intervinieron, para los efectos legales a que haya lugar se asienta la presente.

Rubrican.

Se extiende esta certificación a los **veintiséis** días del mes de **junio** de **dos mil dieciocho**.

COTEJÓ

Ing. Vicente Antonio Mier Ponce
Jefe del Departamento de Servicios Escolares



SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE VERACRUZ
DIRECCIÓN

ING. DAVID REYNIER VALDÉS
DIRECTOR



Secretaría de Educación Pública



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
Instituto Tecnológico de Veracruz

Impacto de las vías de procesamiento
Postcosecha del grano de cacao (*Theobroma cacao L.*)
sobre la contaminación por hongos toxigénicos

Tesis

Que para obtener el grado de:

Máster en Ciencias en Ingeniería Bioquímica

Presenta:

IBQ. Samuel Hernández Medina

Asesores:

Dra. Mirna Leonor Suárez Quiroz

Dr. Óscar González Ríos

Revisores:

Dra. Patricia Guillermina Mendoza García

Dra. Rosa María Oliart Ros

RESUMEN

IBQ. Hernández Medina, Samuel. Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica. Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos. Instituto Tecnológico de Veracruz. Junio de 2018. **Impacto de las modalidades de procesamiento postcosecha del grano de cacao (*Theobroma cacao L.*) sobre la contaminación por hongos toxigénicos.** Asesores: Dra. Mirna Leonor Suárez Quiroz, Dr. Oscar González Ríos.

En la actualidad, para contar con una cadena productiva de cacao para obtener en primer lugar, granos inocuos y en segundo lugar, granos con precursores de aromas y sabores exigidos por los consumidores, se requiere de vigilar y controlar cada una de las etapas del beneficiado del cacao, antes de su industrialización. En México, el proceso de **beneficiado del cacao** se realiza en la mayoría de los casos, sin control sanitario, por lo que la contaminación por hongos toxigénicos es muy probable y puede ocurrir en varias etapas de proceso. Las **micotoxinas** que se han reportado en el cacao son la **Ocratoxina A** (OTA, IARC: grupo 2 B, con propiedades nefrotóxicas, inmunotóxicas, teratogénicas y carcinogénicas) y la **Aflatoxina B1** (AFB1, IARC: grupo 1; que es hepatocarcinógena y neurotóxica).

El objetivo general del este trabajo fue estudiar la diversidad de hongos toxigénicos en las diferentes vías de procesamiento de cacao y correlacionar su impacto sobre la calidad sanitaria del mismo. Se muestrearon 8 beneficios de cacao del Estado de Tabasco, las etapas estudiadas con sus diferentes variantes de proceso fueron: fermentación (cajones estáticos, cajones removibles y tambor rotatorio); secado (al sol, en samoas y en zarandas protegidas) y almacenamiento (en sacos de yute y de propileno). Se obtuvieron 42 muestras a las cuales se les determinó el % de infección por hongos toxigénicos y el contenido de OTA y AFLA. Los hongos toxigénicos fueron aislados e identificados por claves taxonómicas, además se probó su capacidad para producir micotoxinas. A partir de las muestras contaminadas con micotoxinas se estudió la diversidad de hongos toxigénicos, mediante **PCR – DGGE** para identificar las etapas del proceso que favorecen la pérdida de inocuidad del grano.

El análisis microbiológico y los perfiles **DGGE** permitió poner de manifiesto la presencia de cepas toxigénicas en las etapas de secado y almacenamiento. ***Aspergillus carbonarius*** fue la principal cepa ocratoxigénica aislada del grano de cacao secado por samoas y almacenado en sacos de yute. ***Aspergillus parasiticus*** y ***Aspergillus flavus***,

fueron aisladas durante el secado por zarandas protegidas y el almacenamiento en saco de yute.

Este trabajo mostró que durante la fermentación del grano de cacao no existe incidencia de hongos toxigénicos. Sin embargo, el secado por **zarandas protegidas** y por **samoas** favorecen el desarrollo de cepas toxigénicas y la producción de OTA y AFLA. Además, se encontró que los granos almacenados en **sacos de yute** son los que presentaron la contaminación por hongos toxigénicos con respecto a aquellos almacenados en sacos de polipropileno. Este estudio permitió identificar las etapas de proceso en las cuales se favorece el desarrollo de hongos toxigénicos y contaminación del grano de cacao con **Aflatoxinas** y **OTA**, lo que permitirá establecer medidas de control para evitar su formación.

ABSTRACT

Hernández Medina Samuel. Master of Science in Biochemical Engineering. Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos. Instituto Tecnológico de Veracruz. June 2018. **Impact of the modalities of postharvest processing of the cocoa beans (*Theobroma cacao* L.) on the contamination by toxigenic fungi.** Advisors: Dra. Mirna Leonor Suárez Quiroz, Dr. Oscar González Ríos.

Currently, to have a productive chain of cocoa to obtain first, harmless grains and secondly, grains with precursors of flavors and tastes demanded by consumers, it is necessary to monitor and control each of the stages of the beneficiary of the cocoa bean, before its industrialization. In Mexico, the process of benefiting from cocoa is carried out in most cases, without sanitary control, so contamination by toxigenic fungi is very likely and can occur in several stages of the process. The mycotoxins that have been reported in cocoa are Ochratoxin A (OTA, IARC: group 2 B, with nephrotoxic, immunotoxic, teratogenic and carcinogenic properties) and Aflatoxin B1 (AFB1, IARC: group 1, which is hepatocarcinogenic and neurotoxic).

The general objective of this work was to study the diversity of toxigenic fungi in the different cocoa processing routes and to correlate their impact on the sanitary quality of the same. 8 benefits of cocoa from the State of Tabasco were sampled, the stages studied with their different variants of the process were: fermentation (static drawers, removable drawers and rotating drum); drying (direct to the sun, in samoas and protected shale) and storage (in jute and propylene bags). A total of 42 samples were obtained, which were determined the percentage of infection by toxigenic fungi and the content of OTA and Aflatoxins (AFLA). Toxigenic fungi were isolated and identified by taxonomic clues, and their ability to produce mycotoxins was proved. From the samples contaminated with mycotoxins, the diversity of toxigenic fungi was studied, using PCR - DGGE to identify the stages of the process that favor the loss of the grain's safety.

The microbiological analysis and the DGGE profiles allowed to reveal the presence of toxigenic strains in the drying and storage stages. *Aspergillus carbonarius* was the main isolated ochratoxigenic strain of the cocoa bean dried by samoas and stored in jute sacks. *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus*, were isolated during drying by protected shakers and storage in jute sack.

This work showed that during the fermentation of the cocoa bean there is no incidence of toxigenic fungi. However, drying by protected shakers and by samoas favor the development of toxigenic strains and the production of OTA and AFLA. In addition, it was found that the grains stored in jute sacks are those that presented contamination by toxigenic fungi with respect to those stored in polypropylene sacks. This study allowed identifying the stages of the process in which the development of toxigenic fungi and contamination of the cocoa bean with Aflatoxins and OTA is favored, which will allow to establish control measures to avoid their formation.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	2
ABSTRACT	4
ÍNDICE DE FIGURAS	9
ÍNDICE DE TABLAS	11
ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA	12
ECUACIONES	13
INTRODUCCIÓN	14
ANTECEDENTES	16
1. EL CACAO	16
1.1 Generalidades.....	16
1.1.1 Selección y preparación del terreno.....	18
1.2 Composición química del grano de cacao.....	19
1.3. El Cacao y su ubicación a nivel mundial.....	20
1.4. El cacao mexicano.....	21
1.4.1. Ubicación geográfica de la producción en México.....	23
1.5 Cosecha del fruto del árbol de cacao.....	25
1.6. Procesamiento postcosecha del fruto del árbol de cacao	27
1.6.1. Quiebra de mazorca.....	27
1.6.2. Fermentación del grano de cacao.....	28
1.6.3. Secado del grano de cacao	29
1.6.4. Almacenamiento del grano de cacao.....	30
1.7. Modalidades de fermentación del grano de cacao en México	31
1.7.1. Fermentación en cajones estáticos.....	31
1.7.2. Fermentación en cajones removibles	32
1.7.3. Fermentación en tambor rotario	33
1.7.4. Otras modalidades de fermentación del grano de cacao.....	34
1.8. Modalidades de secado del grano de cacao en México.....	35
1.8.1. Secado directamente al Sol.....	35
1.8.2. Secado en Samoas.....	36
1.8.3. Secado en Zarandas protegidas	37
2. HONGOS FILAMENTOSOS TOXIGÉNICOS Y SUS MICOTOXINAS, ASOCIADOS AL PROCESAMIENTO	
POSTCOSECHA DEL GRANO DE CACAO	38
2.1 Generalidades de los hongos filamentosos toxigénicos.....	38
2.2. Micotoxinas	39
2.3 Clasificación de las micotoxinas.....	34
2.3.1. Aflatoxinas.....	34
2.3.2. Ocratoxinas.....	34
2.3.3 Citrinina	35
2.3.4 Alcaloides Ergóticos.....	35
2.3.5. Patulina.....	36
2.3.6. Fumonicinas, Tricotecenos y Zearalenona.....	36
2.4. Micotoxicosis.....	37
2.5. Ocratoxina A (OTA) y sus hongos productores.....	38
2.5.1. Generalidades de OTA	38
2.5.2. Biosíntesis de OTA.....	39
2.5.3. Toxicocinética de OTA.....	41
2.5.4. Hongos productores y condiciones de producción	42

2.5.5. Consumo y límites máximos permitidos	42
2.6. Aflatoxina B1 (AFB1) y sus hongos productores.....	44
2.6.1. Generalidades.....	44
2.6.2. Clasificación de las Aflatoxinas	44
2.6.3. Biosíntesis de Aflatoxina B1 (AFB1).....	45
2.6.4. Toxicología de AFB1.....	46
2.6.5. Hongos productores de AFB1 y condiciones de producción	49
2.6.6. Consumo y límites máximos permitidos de AFB1.....	52
3. ESTUDIO DE HONGOS FILAMENTOSOS TOXIGÉNICOS Y SUS TOXINAS EN EL GRANO CACAO	53
3.1 Identificación por técnicas microbiológicas.....	53
3.1.1. Siembra de grano de cacao.....	53
3.1.2. Medios de cultivo.....	53
3.1.3. Claves taxonómicas	53
3.2 Identificación por técnicas de la Biología Molecular	53
3.2.1. Estudio por PCR – DGGE.....	55
3.2.1.1. Aplicaciones.....	56
3.3. Identificación Analítica de micotoxinas en el grano de cacao.....	58
3.3.1. Extracción y Purificación de micotoxinas.....	58
3.3.2. Determinación y Cuantificación.....	58
3.3.3 Estudio de micotoxinas mediante Ensayo de inmuno – absorción ligada a enzimas (ELISA)	58
3.3.2. Estudio mediante Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).....	59
OBJETIVOS	61
OBJETIVO GENERAL.....	61
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	61
JUSTIFICACIÓN.....	62
HIPÓTESIS.....	62
MATERIALES Y MÉTODOS	63
1. MATERIALES	63
1.1 Material Biológico	63
1.2 Equipo de Laboratorio.....	63
1.2.1. Lector de micropozos.....	63
1.2.2 Microscopio de campo claro	63
1.3 Equipo para Biología Molecular.....	64
1.3.1. Termociclador.....	64
1.3.2. Espectrofotómetro UV – Visible: Nanodrop 2000	64
1.3.3. Cuba de electroforesis para DGGE	64
1.3.4. Transiluminador UV.....	64
2. MÉTODOS	65
2.1. Muestreo.....	65
2.2. Técnicas Microbiológicas.....	68
2.2.1. Aislamiento y numeración de hongos filamentosos toxigénicos.....	68
2.2.3. Porcentaje de infección total.....	68
2.2.3. Claves taxonómicas	69
2.2.4. Pruebas presuntivas para hongos aflatoxigénicos	70
2.3. Técnicas Analíticas: Extracción y purificación de micotoxinas (OTA, AFB1) del grano de cacao.....	71
2.3.1. Extracción de OTA del grano de cacao.....	71
2.3.2. Purificación de OTA extraída del grano de cacao.....	71
2.3.3. Extracción de Aflatoxinas del grano de cacao	72

2.4. Purificación y Cuantificación de Aflatoxinas extraídas del grano de cacao por ELISA.....	73
2.4. Cuantificación de OTA por HPLC: Condiciones de operación.....	75
2.5. Técnicas de Biología Molecular.....	75
2.5.1. Acondicionamiento de las muestras para la extracción de DNA.....	75
2.5.2. Protocolo de extracción de DNA del grano de cacao.....	75
2.5.3. Verificación de DNA en gel de agarosa.....	77
2.5.4. Verificación por espectrofotómetro UV – Visible.....	77
2.5.5. Amplificación por PCR acoplada a un análisis por DGGE.....	77
2.5.5.1. Primers utilizados.....	77
2.5.7. Mezcla de reactivos para PCR.....	78
2.5.8. Condiciones PCR.....	78
2.5.9. Electroforesis en gel de acrilamida con gradiente desnaturizante (DGGE).....	78
2.5.9.1. Composición del gel DGGE.....	78
2.5.9.2. Preparación del gel DGGE.....	78
2.5.9.3. Condiciones de electroforesis de la DGGE.....	79
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	80
1. INCIDENCIA DE HONGOS FILAMENTOSOS Y TOXIGÉNICOS EN EL GRANO DE CACAO.....	80
1.1 Porcentaje de Infección Total por Hongos del grano de cacao (PITH).....	80
1.1.1. Reporte del PITH de la etapa de fermentación y sus modalidades.....	81
1.1.2. Reporte del PITH de la etapa de secado y sus modalidades.....	86
1.1.3. Reporte del PITH de la etapa de almacenamiento y sus modalidades.....	87
1.2 Aislamiento e identificación de especies de hongos ocratoxigénicos del grano de cacao.....	88
1.2.1. Hongos ocratoxigénicos aislados del grano de cacao, pertenecientes a la sección <i>Circumdati</i>	88
1.2.2. Hongos ocratoxigénicos aislados del grano de cacao, pertenecientes a la sección <i>Nigri</i>	90
1.3 Aislamiento e identificación de especies de hongos aflatoxigénicos del grano de cacao.....	97
1.3.1 Hongos aflatoxigénicos aislados del grano de cacao, pertenecientes a la sección <i>Flavi</i>	97
2. PRESENCIA FÚNGICA DEL GÉNERO ASERGILLUS MEDIANTE PCR – DGGE.....	101
2.1. Perfiles DGGE.....	101
3. CUANTIFICACIÓN DE OTA Y AFB1 EN GRANO DE CACAO Y LOS HONGOS ASOCIADOS A SU PRODUCCIÓN.....	104
3.1 Determinación de la humedad del grano de cacao.....	104
3.2 Cuantificación de toxinas en cepas ocratoxigénicas y grano de cacao.....	106
3.3 Cuantificación de toxinas en cepas aflatoxigénicas y grano de cacao.....	107
CONCLUSIONES.....	108
BIBLIOGRAFÍA.....	109
REFERENCIAS.....	109

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: <i>Árbol de cacao (Theobroma cacao) y su fruto. Fuente propia: Finca A.</i>	16
Figura 2: <i>Fruto del Cacao, mazorcas amarilla y naranja</i>	17
Figura 3: <i>Semilla o grano de cacao en el proceso de secado</i>	18
Figura 4: <i>Terreno adecuado para la siembra del árbol de cacao</i>	19
Figura 5: <i>Principales países productores de cacao en el mundo (México, 2016)</i>	20
Figura 6: <i>El cacao en el México prehispánico</i>	21
Figura 7: <i>Fruto de cacao infectado por el hongo causante de la enfermedad de moniliasis</i>	22
Figura 8: <i>Estados de la república mexicana productores de cacao</i>	23
Figura 9: <i>Producción Nacional de Cacao en toneladas por estado en el año 2009</i>	24
Figura 10: <i>Cosecha de la mazorca de cacao</i>	25
Figura 11: <i>Recolección de la mazorca de cacao</i>	26
Figura 12: <i>Quiebre de la mazorca de cacao</i>	28
Figuras 13: <i>Modalidad de fermentación en Cajones Estáticos</i>	31
Figuras 14: <i>Modalidad de Fermentación del grano de cacao en Cajones Removibles</i>	32
Figura 15: <i>Tambor rotatorio ocupado para fermentación del grano de cacao</i>	33
Figura 16: <i>Modalidad de Fermentación del grano de cacao en Tambor Rotatorio</i>	33
Figura 17: <i>Modalidad de Fermentación del grano de cacao en cajones escalonados</i>	34
Figura 18: <i>Modalidad de secado del grano de cacao directo al Sol</i>	35
Figura 19: <i>Modalidad de Secado del grano de cacao por Samoas</i>	36
Figura 20: <i>Modalidad de secado del grano de cacao por Zarandas Protegidas</i>	37
Figura 21: <i>Estructura química de la OTA</i>	38
Figura 22: <i>Biosíntesis de OTA</i>	40
Figura 23: <i>Metabolismo de la OTA</i>	41
Figura 24: <i>Clasificación de las Aflatoxinas</i>	45
Figura 25: <i>Biosíntesis de Aflatoxinas</i>	46
Figuras 26: <i>Aspergillus parasiticus, macroscópica (lado izquierdo) y microscópicamente (lado derecho). Medio PDA</i>	49
Figuras 27: <i>Aspergillus flavus, macroscópica (lado izquierdo) y microscópicamente (lado derecho). Medio PDA</i>	49
Figuras 28: <i>Aspergillus nomius, macroscópicamente. Colonias sembradas en medios CYA, MEA y YES (7 días, 25 °C)</i>	50
Figura 29: <i>Aspergillus nomius, (A) cuerpo conidial, observado microscópicamente. (B) Observaciones de esporas. (Manikandan, Samson, Anita, Miha, & Narendran, 2009)</i>	50
Figura 30: <i>Cultivos y exámenes microscópicos y macroscópicos de hongos filamentosos aislados en medio PDA con 5 días y 37 °C. A, D: Aspergillus flavus. B, E: Aspergillus parasiticus. C, F: Aspergillus tamarii</i>	51
Figura 31: <i>Aspergillus bertholletius. (A) Colonias aisladas en CYA después de 7 días de incubación a 25 °C. (B, C, D,) Cabeza conidial, bar= 10 µm. (E) Esporas, bar= 5 µm.</i>	51
Figura 32: <i>Porcentaje de Infección Total por Hongos de las muestras 10 y 11, de izquierda a derecha, en medio DG18.</i>	82
Figura 33: <i>Porcentaje de Infección Total por Hongos de las muestras 3, 4 Y 10, de izquierda a derecha, en medio DG18.</i>	83
Figura 34: <i>Porcentaje de Infección Total por Hongos de las muestras 11, 12 Y 13, de izquierda a derecha, en medio DG18.</i>	83
Figura 35: <i>Porcentaje de Infección Total por Hongos de las muestras 1, 2 y 5, de izquierda a derecha, en medio PDA</i>	84
Figura 36: <i>Porcentaje de Infección Total por Hongos de las muestras 27, 28 y 29, de izquierda a derecha, en medio PDA</i>	84

Figura 37: Porcentaje de Infección Total por Hongos de las muestras 33, 34 y 35, de izquierda a derecha, en medio PDA.....	85
Figura 38: Porcentaje de Infección Total por Hongos de las muestras 36, 39 y 40, de izquierda a derecha, en medio PDA.....	85
Figura 39: Cepa de la sección <i>Circumdati</i> aislada del grano de cacao: <i>Aspergillus ochraceus</i> , muestra 5.....	89
Figura 40: Colonias de <i>Aspergillus ochraceus</i> , aisladas del grano de cacao, cultivadas en medios PDA, MEA y CYA (De izquierda a derecha).....	89
Figura 41: Cepas de hongos de la sección <i>Nigri</i> aislados del grano de cacao.....	91
Figura 42: Cepas de hongos de la sección <i>Nigri</i> en el reverso de la colonia.....	91
Figura 43: Cepas de <i>A. carbonarius</i> aisladas del grano de cacao. Muestras 8, 30 y 42. Fotografía A: colonias observadas al derecho. Figura B: colonias observadas al reverso.	92
Figura 44: Cepas de <i>A. niger</i> aisladas del grano de cacao. Muestras 6 y 21. Fotografía A: colonias observadas al derecho. Figura B: colonias observadas al reverso.....	92
Figura 45: Colonias de <i>Aspergillus carbonarius</i> , aisladas del grano de cacao, cultivadas en medios PDA, MEA y CYA (De izquierda a derecha, muestra 8).	93
Figura 46: Colonias de <i>Aspergillus carbonarius</i> , aisladas del grano de cacao, cultivadas en medios PDA, MEA y CYA (De izquierda a derecha, muestra 30).	93
Figura 47: Colonias de <i>Aspergillus carbonarius</i> , aisladas del grano de cacao, cultivadas en medios PDA, MEA y CYA (De izquierda a derecha, muestra 42).	94
Figura 48: Colonias de <i>Aspergillus niger</i> , aisladas del grano de cacao, cultivadas en medios PDA, MEA y CYA (De izquierda a derecha, muestra 6).	95
Figura 49: Colonias de <i>Aspergillus niger</i> , aisladas del grano de cacao, cultivadas en medios PDA, MEA y CYA (De izquierda a derecha, muestra 21).	95
Figura 50: Cepas de hongos aflatoxigénicos pertenecientes a la sección <i>Flavi</i>	98
Figura 51: Colonias de <i>Aspergillus flavus</i> , aisladas del grano de cacao, cultivadas en medios PDA, MEA y CYA (De izquierda a derecha, muestra 6).	¡Error! Marcador no definido.
Figura 52: Colonias de <i>Aspergillus flavus</i> , aisladas del grano de cacao, cultivadas en medios PDA, MEA y CYA (De izquierda a derecha, muestra 7).	¡Error! Marcador no definido.
Figura 53: Colonias de <i>Aspergillus flavus</i> , aisladas del grano de cacao, cultivadas en medios PDA, MEA y CYA (De izquierda a derecha, muestra 8).	¡Error! Marcador no definido.
Figura 54: Figura 53: Colonias de <i>Aspergillus flavus</i> , aisladas del grano de cacao, cultivadas en medios PDA, MEA y CYA (De izquierda a derecha, muestra 14).	99
Figura 55: Fotografía en UV visible del gel de agarosa que contiene las muestras 1 - 8 (1, 2, 3, 4, 10, 11, 12, 13) y sus correspondientes duplicados 21 - 28.	¡Error! Marcador no definido.
Figura 56: Fotografía en UV visible del gel de agarosa que contiene las muestras 9 - 16 (27, 28, 29, 33, 34, 35, 36, 37) y sus correspondientes duplicados 29 - 36.....	¡Error! Marcador no definido.
Figura 57: Fotografía en UV visible del gel de agarosa que contiene las muestras 17 – 20 (38, 39, 40, 41) y sus correspondientes duplicados 37 - 40, y algunas muestras anteriores... ¡Error! Marcador no definido.	
Figura 58: Fotografía en UV visible del gel de agarosa que contiene las muestras 1a - 8a (1, 2, 3, 4, 10, 11, 12, 13) y sus correspondientes duplicados 1b - 8b.	¡Error! Marcador no definido.
Figura 59: Fotografía en UV visible del gel de agarosa que contiene las muestras 9a - 16a (27, 28, 29, 33, 34, 35, 36, 37) y sus correspondientes duplicados 9b - 16b.....	¡Error! Marcador no definido.
Figura 60: Fotografía en UV visible del gel de agarosa que contiene las muestras 17a - 20a (38, 39, 40, 41) y sus correspondientes duplicados 17b - 20b, y las muestras 1a – 4a (5, 6, 7, 8) y sus correspondientes duplicados 1b – 4b.....	¡Error! Marcador no definido.
Figura 61: Fotografía en UV visible del gel de agarosa que contiene las muestras 17a - 20a (38, 39, 40, 41) y sus correspondientes duplicados 17b - 20b.	¡Error! Marcador no definido.

Figura 62: Fotografía en UV visible del gel de agarosa que contiene las muestras 13a - 20a (21, 22, 23, 24, 25, 26, 30, 31) y sus correspondientes duplicados 13b - 20b. **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 63: Fotografía en UV visible del gel de agarosa que contiene las muestras 21a - 25a (32, 27, 33, 37, 38) y sus correspondientes duplicados 21b - 25b. **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 64: Fotografía en UV visible del gel de agarosa que contiene las muestras de cepas puras SAM001, SAM002, SAM005, SHM002, SHM003, SHM004 y SHM006... **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 65: Determinación de humedad por pérdida de peso de las muestras de cacao 106

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Recomendaciones para la siembra y cultivo del árbol de cacao (Barel, 2009).....18

Tabla 2: Composición química el grano de cacao después del secado (Champion Martínez, 2016)19

Tabla 3: Cifras de producción de cacao por estado, en el año 2016.....23

Tabla 4: Estrategia de muestreo del grano de cacao y clasificación de las muestras por origen, etapa, modalidad y tiempo.67

Tabla 5: Porcentajes de Infección Total por Hongos del grano de cacao de las muestras de fermentación y sus diferentes modalidades.....81

Tabla 6: Comparación entre la utilización de 2 diferentes medios de cultivo para el crecimiento y aislamiento de hongos.....82

Tabla 7: Porcentajes de Infección Total por Hongos del grano de cacao de las muestras de SECADO y sus diferentes modalidades.....86

Tabla 8: Porcentajes de Infección Total por Hongos del grano de cacao de las muestras de ALMACENAMIENTO y sus diferentes modalidades.87

Tabla 9: Cepas de hongos ocratoxigénicos aislados del grano de cacao.....88

Tabla 10: Descripción de la cepa SAM001 aislada del grano de cacao: *Aspergillus ochraceus*, muestra 5.....89

Tabla 11: Cepas de hongos aflatoxigénicos aislados del grano de cacao.....97

Tabla 12: Cuantificación de la concentración de DNA en las muestras de cacao.. **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla 13: Códigos del gel de agarosa de la figura anterior, muestras de cepas puras. **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla 14: Humedades de las muestras de cacao de las etapas de fermentación, secado y almacenamiento..... 105

ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA

ADN	Acido desoxirribonucleico
Aw	Actividad de agua
BLAST	Basic Local Alignment SearchTool
DG18	Dicloran Glicerol 18
DGGE	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
EFSA	Autoridad en Seguridad Alimenticia de la Unión Europea
ELISA	
g	Gramo
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HACCP	Análisis de peligros y puntos de control críticos
IARC	International Agency for Research on Cancer
IGS	Intergenic Spacer Region
ITS	Internal Transcribed Spacer
JECFA	Join FAO/WHO Expert Committe on Food Additives
kg	Kilogramo
L	Litro
MEA	Malt extract Agar
MAA	Medio ácido acético
MRS	Man rogosa sharpe
min	Minuto
ml	Mililitros
ng	Nanogramo
nm	Nanómetro
OMS	Organización mundial de la salud
OTA	Ocratoxina A
OTB	Ocratoxina B

PBS	Solucion tampón salina de fosfato
PCR	Polymerase chain reaction
pH	Potencial hidrogeno
rpm	Revoluciones por minuto
SCF	Comité Científico para los Alimentos de la Comisión Europea
SCOOP	Grupo de Cooperación Científica
V	Volumen
UV	Ultravioleta
YES	Yeast Extract Supplemented

ECUACIONES

<i>Ecuación 1: Porcentaje de Infección Total</i>	68
--	----

INTRODUCCIÓN

Los granos de cacao se originan como semillas en las mazorcas del fruto del árbol *Theobroma cacao*. El cacao es un ingrediente muy importante en farmacéuticos y un gran número de alimentos, es el componente principal del chocolate (Tafari *et al.*, 2004). Los principales países productores de cacao se encuentran en África y, en el centro y sur de América. En México el estado de Tabasco es el principal productor de cacao.

En todos los casos, las condiciones de cosecha y almacenamiento se llevan a cabo sin controles sanitarios, por lo que la contaminación por hongos puede ocurrir en varios puntos de la cadena de producción (Magan y Aldred, 2005). En 2010 Copetti, *et al.*, reportan que los altos contenidos de Ocratoxina A (OTA) en cacao se encuentran íntimamente relacionados con las condiciones de cosecha y post-cosecha, específicamente durante la fermentación y el secado.

En México, el proceso de **beneficiado del cacao** se realiza en la mayoría de los casos, sin control sanitario, por lo que la contaminación por hongos toxigénicos es muy probable y puede ocurrir en varias etapas de proceso.

Las **micotoxinas** que mayormente han sido reportadas, son producidas por algunas especies de hongos filamentosos de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*, que están presentes de forma natural en el grano de cacao. Las principales micotoxinas que se han reportado en el cacao son la **Ocratoxina A** (OTA, IARC: grupo 2 B, con propiedades nefrotóxicas, inmunotóxicas, teratogénicas y carcinogénicas) y la **Aflatoxina B1** (AFB1, IARC: grupo 1; que es hepatocarcinógena y neurotóxica).

La OTA es producida por *A. carbonarius*, *A. niger* y *A. ochraceus*, siendo el primero, el principal productor. La OTA es un metabolito secundario tóxico, producido por varias especies de hongos filamentosos de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*. La OTA posee propiedades nefrotóxicas, inmunotóxicas, teratogénicas y carcinogénicas que la hacen perjudicial para humanos y animales (Höhler, 1998).

En zonas tropicales la OTA es producida generalmente por *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus niger* y *Aspergillus ochraceus*, siendo el primero el principal productor de OTA con un alto nivel de incidencia. Esta micotoxina se encuentra presente en diversos productos alimenticios alrededor del mundo tales como: cereales, café, cerveza, jugo de uva, frutos secos y vino; así como cacao, nueces y especias (Pitt, 2000). En 2012 Copetti *et al.*, estudiaron grano de cacao comercial de Brasil y reportaron a *A. carbonarius* como el principal productor de OTA, encontrando contenidos de OTA entre 1.7-5.54 µg/kg a lo largo de la cadena de producción, siendo las etapas de secado y almacenamiento las más críticas.

Debido a los problemas de salud que se le atribuyen a la OTA y a las Aflatoxinas, se vuelve necesario estudiar la presencia de hongos toxigénicos en el grano de cacao durante el procesamiento postcosecha, con la finalidad de observar aquellas modalidades o vías que favorecen el crecimiento de estos y la presencia de las micotoxinas.

El presente trabajo enriquecerá el conocimiento sobre el tratamiento postcosecha de cacao en México y permitirá esclarecer las condiciones que puedan favorecer y/o perjudicar la calidad e inocuidad del grano, para posteriormente aplicar medidas correctivas sobre la manipulación y mejorar la calidad sanitaria del grano al final del proceso.

ANTECEDENTES

1. El Cacao

1.1 Generalidades

El árbol del cacao es una planta de tipo tropical que crece en climas cálidos y húmedos, que requiere suelos ricos en materia orgánica, y es originario de América del Sur, posiblemente de la Amazonía de Colombia Ecuador y Perú. Pertenece al género *Theobroma*, que significa “Alimento de los Dioses”. La palabra cacao, se deriva del nahua cacáhua y era utilizado como moneda de cambio, en las antiguas rutas comerciales de la época prehispánica.

Cuenta con una altura media de cinco metros, tiene hojas lustrosas y pequeñas flores en su tronco y ramas. El tallo es un tronco ortotrópico, en donde se forma el primer verticilo de 80 a 100 cm de altura, del cual salen las ramas plagiotrópicas (laterales). Después de un año, se forma otra rama ortotrópica, formando un segundo verticilo y las respectivas ramas plagiotrópicas (Ogata & Aztecas, 2007).



Figura 1: Árbol de cacao (*Theobroma cacao*) y su fruto. Fuente propia: Finca A.

De esta manera el árbol forma tres o cuatro verticilos, pudiendo llegar hasta diez. La raíz es pivotante. Las hojas son de color verde oscuro y textura fina. La inflorescencia se ubica en la base de la hoja, alrededor de la cicatriz de la yema axilar que deja una hoja, en ramas o troncos maduros. Las flores son hermafroditas y de polinización cruzada por lo que es muy difícil que el cacao se autofecunde.

El fruto del árbol es una baya o vaina elipsoidal, ovoide, fusiforme, oblonga o esférica, de 10 a 35 cm de largo, y pesa de 200 a 500 g. Su superficie es lisa, corrugada o amelonada, de color varía desde verde hasta amarillo, también es llamada mazorca. Contiene aproximadamente de 20 a 40 semillas.



Figura 2: Fruto del Cacao, mazorcas amarilla y roja

Las semillas son polimorfos (aplanadas, elipsoides, ovoides, triangulares) de 2 a 4 cm de largo, cubiertas por un mucílago. Estas se recolectan cuando las vainas han tomado un color anaranjado o amarillento, de forma manual utilizando herramientas sencillas. Luego de fermentadas y secadas al sol las semillas se desprenden de su tegumento, y después de tostadas se extrae los principales ingredientes del chocolate. Este cultivo se utiliza también para la elaboración de aromatizantes y perfumes por su alto contenido en antioxidantes.



Figura 3: Semilla o grano de cacao en el proceso de secado

A la fecha se conocen tres variedades principales de cacao: Criollo, Forastero e Híbrido; aunque se existen más de 22 especies (Champion Martínez, 2016).

1.1.1 Selección y preparación del terreno

Para la siembra y cultivo del árbol del cacao, se estiman las siguientes recomendaciones:

VARIABLE	CARACTERÍSTICAS
Temperatura:	Entre 21°C y 30°C en promedio.
Precipitación:	2.500 milímetros anuales, preferiblemente bien distribuidos a través del año.
Clima:	Tropical húmedo.
Vientos:	Zonas de vientos fuertes permanentes son inconvenientes, a no ser que se puedan instalar barreras vivas rompe vientos a base de franjas abundantes de árboles.

Tabla 1: Recomendaciones para la siembra y cultivo del árbol de cacao (Barel, 2009)



Figura 4: Terreno adecuado para la siembra del árbol de cacao

1.2 Composición química del grano de cacao

Después de la fermentación y el secado, el grano de cacao está compuesto químicamente como se muestra en la siguiente tabla:

COMPONENTE	CANTIDAD
Agua	3.2 %
Manteca	57 %
Azúcares	9.0 %
Fibra cruda	3.2 %
Cenizas	4.2 %
Nitrógeno total	2.5 %
Teobromina	1.3 %
Cafeína	0.7 %

Tabla 2: Composición química el grano de cacao después del secado (Champion Martínez, 2016)

1.3. El Cacao y su ubicación a nivel mundial

El cacao se cultiva principalmente en África del Oeste, América Central, Sudamérica y Asia. Según la producción anual, recogida por la Conferencia de las Naciones Unidas sobre Comercio y Desarrollo (UNCTAD, por sus siglas en inglés) para el año agrícola 2005/06, los ocho mayores países productores del mundo fueron (en orden descendente) Costa de Marfil (38%), Ghana (19%), Indonesia (13%), Nigeria (5%), Brasil (5%), Camerún (5%), Ecuador (4%) y Malasia (1%). Estos países representan el 90% de la producción mundial.

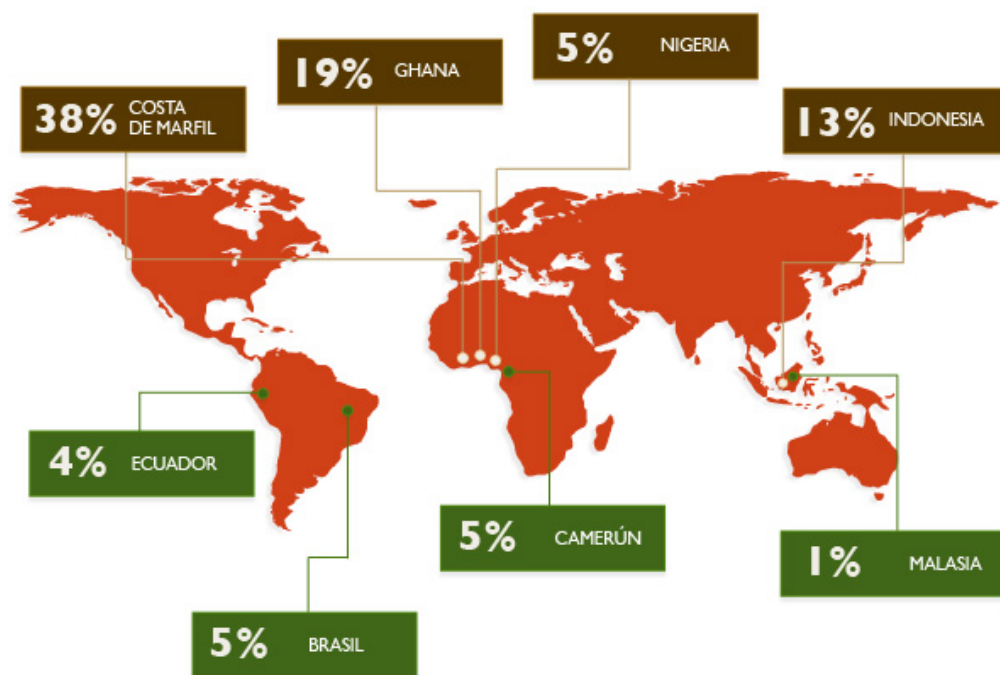


Figura 5: Principales países productores de cacao en el mundo (México, 2016)

Los principales productores son también los mayores exportadores, con excepción de Brasil y Malasia cuyo consumo interno absorbe la mayor parte de su producción. En América Latina, por ejemplo, las exportaciones de cacao de República Dominicana superan a las de Brasil (UNCTAD, 2006).

1.4. El cacao mexicano

En México, desde la época prehispánica, el cultivo del cacao estaba esparcido en toda la zona templada y cálida del país, a partir de la provincia de Tabasco, hasta Michoacán, Colima, Chiapas y Campeche. Se producía de manera espontánea, pero también se cultivaban cuatro variedades principales de la planta: Quauhcahuatl, Xochicahuatl y Tlacacahuatl.



Figura 6: El cacao en el México prehispánico

Los cacaos más estimados eran los de las provincias de Tabasco y Soconusco, o Xoconocho, por sus semillas grandes, oleaginosas y de buen sabor.

Actualmente, México ocupa el onceavo lugar en producción a nivel mundial, participando con menos del 2% de la producción mundial, produciendo entre 20 000 y 30 000 ton de cacao anualmente, esto representa una entrada de cerca de \$ 64 606 USD (SIAP/SAGARPA, 2014). Solo 2% de esta producción es destinada al mercado internacional, principalmente como pasta de cacao. El 75% de los cultivos se concentran en el estado de Tabasco con 40 782 ha.

El cacao trinitario es el principal cultivo, resultado de una hibridación natural de semillas criollo y forastero (González y Amaya, 2005). Aunque algunas superficies son exclusivamente para el cultivo de cacao grano blanco Criollo

(Carmelo 1), el cual ha sido premiado en los premios Internacionales de Cacao en 2011 en la categoría de Frutos frescos en la región central de América y el Caribe (ICA, 2011). Esto representa una oportunidad para la exportación de este cacao a Europa en términos de calidad y no cantidad.

El cacao es producido principalmente por el estado de Tabasco, quien produce el 66% de la producción nacional, seguido por Chiapas que produce el 33% y que aportan el 99% de la producción total, el resto se produce entre Oaxaca, Guerrero y Veracruz.

A pesar de sus condiciones climáticas para ser uno de los principales productores de cacao en el mundo no lo es, por eso, la Fundación Cacao México busca incrementar la producción de cacao en el país y hacer de México uno de los principales países productores de cacao a nivel mundial, buscando mejorar la calidad del cacao, al mismo tiempo que las condiciones de vida de los campesinos y elevando su calidad de vida.

Sin embargo, la presencia de la enfermedad denominada moniliasis y su rápida diseminación al 95% de la superficie cultivada, el envejecimiento de las plantaciones y el descuido de las mismas, han sido factores relacionados con la caída en la producción de cacao (García, 1994). De 2001 a 2009 la producción de cacao disminuyó 47%, pasando de 46,700 a 24,700 toneladas (CACAO, 2009).



Figura 7: Fruto de cacao infectado por el hongo causante de la enfermedad de moniliasis

1.4.1. Ubicación geográfica de la producción en México

A continuación se muestra la ubicación geográfica de los estados productores de cacao en México:



Figura 8: Estados de la república mexicana productores de cacao

El cacao en México se cultiva actualmente por cerca de 37,000 productores en los estados de Tabasco, Chiapas, Guerrero y Oaxaca conforme a las siguientes cifras de producción:

ENTIDAD	SUPERFICIE SEMBRADA (Ha)	SUPERFICIE COSECHADA (Ha)	PRODUCCIÓN (Ton)	RENDIMIENTO (Ton/Ha)
Tabasco	41, 117	41, 117	16, 560	0.4
Chiapas	20, 203	20, 203	7, 855	0.39
Guerrero	240	240	196	0.81
Oaxaca	36	1	0.8	0.8
TOTAL	61, 595	61, 510	24, 611.8	0.4

Tabla 3: Cifras de producción de cacao por estado, en el año 2016

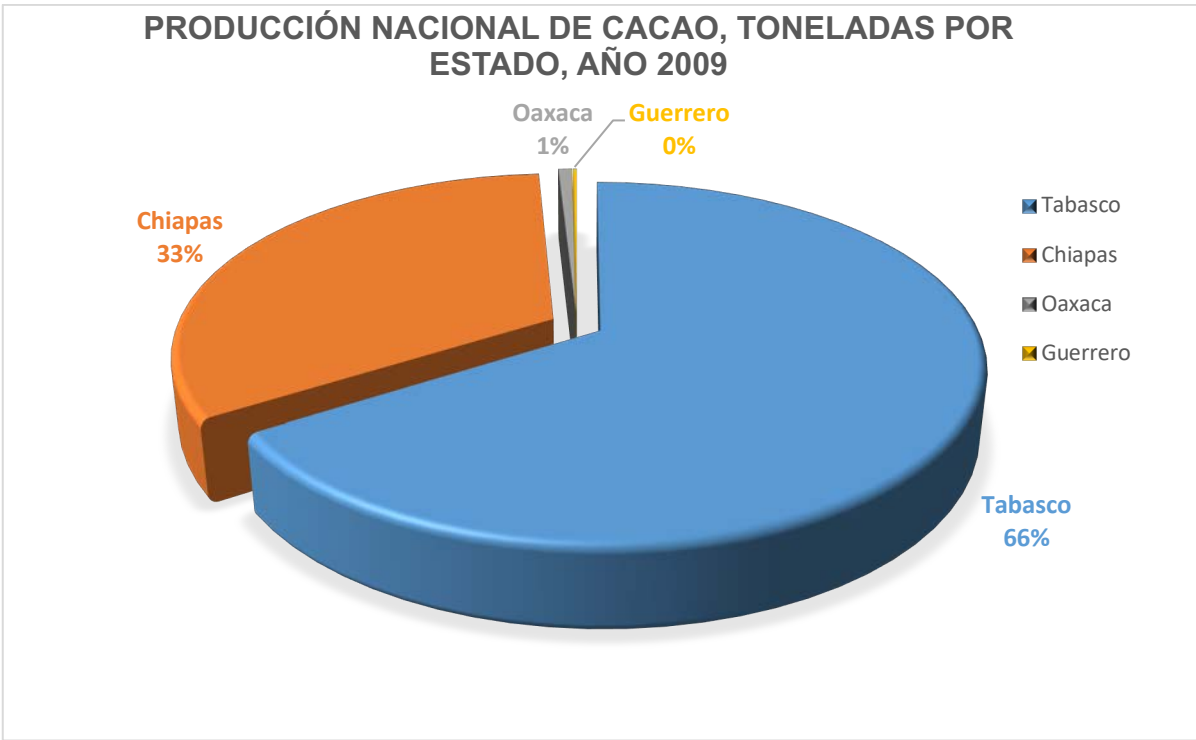


Figura 9: Producción Nacional de Cacao en toneladas por estado en el año 2009

1.5 Cosecha del fruto del árbol de cacao

El cacao se recolecta en dos grandes cosechas. La principal, de octubre a marzo, da la mayor cantidad de frutos, quedando el resto para la cosecha secundaria, realizada de mayo a julio. La recolección de los frutos es manual y se realiza con extremo cuidado de no dañar los "pedúnculos florales" de donde sale el fruto, ya que impediría que volvieran a florecer si han sido deteriorados.

La cosecha es una operación manual que requiere de una alta capacitación de la mano de obra utilizada. Esta actividad comúnmente es realizada por mujeres y/o niños, dentro de las fincas de cacao. Las mazorcas son cortadas del árbol de manera perpendicular con un cuchillo o machete, con la precaución de no dañarla. Una vez cosechadas las mazorcas, no deben ser almacenadas, sino procesadas de manera inmediata (Champion Martínez, 2016).



Figura 10: Cosecha de la mazorca de cacao

Una vez recolectadas las mazorcas, se amontonan, separando las que pueden estar enfermas o no alcanzaron su grado de madurez para garantizar que sólo se beneficien los frutos maduros y sanos, para que no se afecte la calidad final del producto (Barel, 2009).



Figura 11: Recolección de la mazorca de cacao

Por otro lado, durante la recolección de las mazorcas, se cosechan únicamente frutos maduros, ya que las mazorcas verdes no deben ser recolectadas porque el grano sin madurez origina un producto de sabor amargo, y generaría un descontrol en el tratamiento pos cosecha. Una cosecha tardía representa un riesgo de contaminación y/o germinación de los granos.

1.6. Procesamiento postcosecha del fruto del árbol de cacao

Para la elaboración de productos derivados del cacao, como el chocolate, la cadena productiva es muy extensa y variada, e involucra a varios protagonistas. Todo inicia desde las fincas, donde es plantado el árbol cacaotero y se desarrollan las mazorcas, que después son cosechadas y es ahí donde se inicia el procesamiento postcosecha del cacao, que consiste en el quiebre de la mazorca, la fermentación de los granos, el secado de los granos, el empaque y el almacenamiento.

Una variedad de estudios han mostrado diferencias significativas entre las prácticas postcosecha de los países productores y en la mayoría de los casos, entre las fincas del mismo país. La mayor parte del cacao producido a nivel mundial proviene de fincas de pequeños productores.

Las actividades y materiales utilizados durante el procesamiento postcosecha de cacao en las fincas productoras son responsables de las características finales del grano, por lo que es preciso, que las manufactureras de chocolate, reciben lotes heterogéneos de granos de cacao, debido a las diferentes prácticas realizadas en cada finca (Dano et al., 2013).

Esto a su vez se traduce en una pérdida de la trazabilidad, ya que no es posible llevar a cabo análisis precisos de identificación de cultivos y origen de los granos (Saltini, 2012). Es entonces que surge la necesidad de generar información acerca del procesamiento postcosecha del cacao y a su vez capacitar a los productores en sistemas de trazabilidad, calidad e inocuidad alimentaria. En efecto, se describen parcialmente las etapas de procesamiento postcosecha del grano de cacao y el impacto sobre sus características físicas, químicas y sensoriales.

1.6.1. Quiebra de mazorca

Esta actividad se realiza a la sombra del árbol cacaotero o en un lugar específicamente designado para la misma. Las mazorcas cosechadas son abiertas por la mitad con el golpe de un instrumento cortante como un cuchillo o machete, en forma perpendicular sin dañar los granos contenidos en el centro de la mazorca. El propósito es hacer un corte que facilite el desprendimiento de los granos de la

corteza interna de la cáscara. Una vez abiertas, los granos son extraídos manualmente y los restos son desechados. Inmediatamente, los granos se depositan en cajas de madera o contenedores donde se llevará el proceso de fermentación. En algunos países, los granos se cubren con hojas de plátano cuando estos son depositados directamente en el suelo (Barel, 2009).



Figura 12: Quiebre de la mazorca de cacao

1.6.2. Fermentación del grano de cacao

De manera precisa, el principal objetivo de la fermentación del grano de cacao es eliminar la pulpa que lo recubre y provocar la muerte del embrión para evitar la germinación. Mediante este proceso, se desarrollan los precursores del sabor y aroma que tendrá el chocolate, lo que contribuye a mejorar la apariencia de este. Una adecuada fermentación origina un cacao que al ser convertido en chocolate, es agradable al paladar y al olfato.

Se ha determinado en diversos estudios que la fermentación es un proceso que consiste en una serie de cambios bioquímicos y físicos en las estructuras del grano. Las bacterias presentes en el aire se multiplican en la pulpa que rodea los granos y ésta se descompone formando diversos ácidos líquidos (ácido láctico, ácido acético), lo cual aumenta la temperatura del proceso, modificando el color del grano a un marrón chocolate (Lambert, n.d.).

1.6.3. Secado del grano de cacao

El secado se puede hacer al sol o de forma artificial. Tradicionalmente, los granos fermentados son secados por exposición directa al sol, sin embargo, algunos productores recurren al secado artificial por samoas o zarandas protegidas. El propósito del secado es disminuir la humedad hasta menos de un 10 %.

Es recomendable comenzar el secado con una temperatura cercana a los 50 °C y luego aumentar hasta que se mantenga con una temperatura cercana a los 60 °C. Si el grano se somete a temperaturas superiores a los 70 °C, no terminaran el proceso normal de desarrollo de sabores y aromas, se vuelven quebradizos y de muy difícil manejo, cambio el pH del mismo por el incremento desmedido de la acidez (Barel, 2009).

Debido a que el secado es una continuación del estrés oxidativo del proceso de fermentación, en esta etapa, los sabores se desarrollan, el proceso de pardeamiento continua y la astringencia, amargor y acidez son reducidas (Champion Martínez, 2016).

El secado termina cuando el productor considera que es necesario, basado en su propio criterio, sin embargo, y aunque tenga mucha experiencia el productor, el contenido de humedad y la calidad del grano, puede variar significativamente. En el estudio realizado por Bart – Plange y Brayeh (2003) donde evaluaron las propiedades físicas de granos de cacao de la cosecha 2000/2001, encontraron una variación en el contenido de humedad del grano de cacao del 5 al 24 %.

Este proceso es considerado crucial para la calidad final del grano de cacao. Si se realiza un secado rápido, los granos tienden a retener una cantidad excesiva de ácidos, como el ácido acético y láctico, quienes son responsables del sabor en el chocolate.

Por otro lado, un secado lento, puede otorgar baja acidez, colores pálidos y alta presencia de hongos en el grano. Al finalizar el secado, el grano de cacao deber ser almacenado en sacos, para su manipulación y transporte antes de la venta.

1.6.4. Almacenamiento del grano de cacao

Cuando el proceso de fermentación y secado del grano de cacao está terminado, prosigue una clasificación de los granos y estos son introducidos en sacos adecuados tanto de yute o polipropileno y almacenarse hasta su venta. Para que el producto pueda ser almacenado, con la seguridad de que no se afecte por causa de hongos es necesario acondicionar su humedad a un máximo del 7%.

Los granos de cacao deben introducirse en sacos limpios bien cocidos o sellados. Estos deben ser materiales no tóxicos, libres de hidrocarburos grado alimentario, que no contengan insectos o roedores y sean lo suficientemente fuertes para aguantar el almacenamiento durante periodos largos.

Los sacos sellados, deben guardarse en almacenes permeables, con buena ventilación, libres de humedad e insectos, y alejados de humos y otros olores que pueden afectar la calidad e integridad del grano de cacao. Los sacos nunca deben tocar el suelo ni las paredes. Las zonas de almacenamiento se deben mantener siempre limpias, cerradas y controladas de cualquier factor negativo (Barel, 2009).

1.7. Modalidades de fermentación del grano de cacao en México

Existen diferentes modalidades de fermentar el grano de cacao, cuyas características físicas, variables de proceso y materiales utilizados, otorgan variaciones en la calidad e inocuidad final del grano de cacao. A continuación, se describen parcialmente.

1.7.1. Fermentación en cajones estáticos

Es el método más utilizado y considerado uno de los mejores si se cuenta con grandes cantidades de cacao. Estas cajas son construidas con madera con dimensiones de 90 x 90 x 120 cm. El fondo de la caja debe estar agujerado, lo cual permite el escurrimiento de los jugos de fermentación provenientes del mucílago y provocar la ventilación del proceso. El sistema debe estar separado del piso aproximadamente a una distancia de 15 a 20 cm. Este tipo de cajas permiten procesar hasta 800 kg de cacao fresco. Una vez depositado el grano de cacao sobre estos cajones, se deja reposar hasta el final de la fermentación. Es tipo de fermentación tarda aproximadamente de 7 a 8 días (Champion Martínez, 2016).



A

Figuras 13: Modalidad de fermentación en Cajones Estáticos

B

1.7.2. Fermentación en cajones removibles

Es uno de los métodos menos utilizados y considerado uno de los más costosos, debido a que cuenta con un sistema de grúas y poleas que realizan la remoción de los cajones después de las 48 horas de haber iniciado la fermentación. Estos cajones son construidos con madera con dimensiones de 90 x 90 x 120 cm.

El fondo de los cajones debe estar agujerado, lo cual permite el escurrimiento de los jugos de fermentación provenientes del mucílago y provocar la ventilación del proceso. El sistema debe estar separado del piso aproximadamente a una distancia de 15 a 20 cm. Este tipo de cajones permiten procesar hasta 1000 kg de cacao fresco. Una vez depositado el grano de cacao es necesaria la remoción para lograr una fermentación uniforme. Este tipo de fermentación tarda aproximadamente 6 días (Lambert, n.d.).



A Figuras 14: Modalidad de Fermentación del grano de cacao en Cajones Removibles **B**

1.7.3. Fermentación en tambor rotario

Consiste en un sistema adaptado de un cilindro de madera, puesto en un soporte mecánico giratorio, el cual es cargado con los granos de cacao y sellado para propiciar el aumento del calor del proceso, y removido utilizando el sistema de palancas que lo hacen girar y lograr un proceso homogenizado, después de las 48 horas de haber iniciado la fermentación. Aproximadamente este tipo de fermentación tarda 6 días, dependiendo de las condiciones y precisión del proceso.



Figura 15: Tambor rotatorio ocupado para fermentación del grano de cacao



Figura 16: Modalidad de Fermentación del grano de cacao en Tambor Rotatorio

1.7.4. Otras modalidades de fermentación del grano de cacao

Existen otras modalidades de fermentación del grano de cacao utilizadas en México, como la de cajones escalonados, que consiste en el mismo principio de los cajones estáticos pero estos son colocados de manera vertical y ascendentes, formando una pirámide como se muestra en la figura 15. Los jugos de fermentación son recuperados por un sistema de tuberías y son utilizados como biocombustibles. La fermentación en esta modalidad tiene una duración de 5 días y la remoción se realiza de forma descendente, es decir, a partir de las 48 horas, el cajón de arriba es vaciado al siguiente de abajo y así sucesivamente cada 24 horas.



Figura 17: Modalidad de Fermentación del grano de cacao en cajones escalonados

1.8. Modalidades de secado del grano de cacao en México

Existen diferentes modalidades de secado el grano fermentado de cacao, cuyas características físicas, variables de proceso y materiales utilizados, otorgan variaciones en la calidad e inocuidad final del grano. A continuación, se describen parcialmente.

1.8.1. Secado directamente al Sol

El secado directamente al sol es considerado el mejor método para obtener un mayor y mejor desarrollo de sabores, el cual es un proceso realizado tradicionalmente, donde se extienden los granos fermentados de cacao después de concluir con el proceso de fermentación, sobre el suelo, costales o bolsas de polietileno.



Figura 18: Modalidad de secado del grano de cacao directo al Sol

1.8.2. Secado en Samoas

Este tipo de secado consiste en colocar los granos fermentados de cacao en recipientes cubiertos con mallas metálicas con una entrada de alimentación de aire caliente en uno de los costados del recipiente. El tiempo varía de acuerdo a la humedad contenida en los granos.



Figura 19: Modalidad de Secado del grano de cacao por Samoas

1.8.3. Secado en Zarandas protegidas

Este tipo de secado consiste en un sistema donde se colocan los granos de cacao sobre bases de madera, con rejillas y hendiduras para el escurrimiento de los líquidos y el movimiento de la humedad, y además se protege con un arco de lonas traslucidas, misma que deja pasar la luz solar y sirve de protección contra plagas y otros factores como la lluvia. El tiempo de secado varía dependiendo las condiciones climáticas y la humedad contenida en el grano de cacao fermentado.



Figura 20: Modalidad de secado del grano de cacao por Zarandas Protegidas

2. Hongos filamentosos toxigénicos y sus micotoxinas, asociados al procesamiento postcosecha del grano de Cacao

2.1 Generalidades de los hongos filamentosos toxigénicos

Los hongos filamentosos son aquellos que están formados por una serie de ramas tubulares llamadas hifas, el conjunto de las cuales forman el micelio. Se reproducen por la formación de esporas, las cuales pueden ser pigmentadas y le dan el color al hongo. Al centro de la colonia se ubican las hifas fértiles que dan origen a las esporas, razón por la cual los hongos son más coloreados en esa zona. Se caracterizan por presentar crecimiento rápido, tener reservorios naturales en el suelo, plantas, animales y vegetales muertos, crecen a temperaturas de 25 – 30°C y sus esporas o conidios son transportados por el aire, son normalmente inhalados y presentan gran resistencia en el medio ambiente (Pelczar *et al.*, 1997)

La mayoría de los hongos filamentosos de interés clínico y vegetal, tienen una fase de reproducción sexuada (telomorfa), pero es su forma asexual (anamórfica) la que casi siempre produce las enfermedades y es observada en las muestras.

2.2. Micotoxinas

Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por hongos filamentosos, capaces de crecer en gran variedad de sustratos y bajo las más diversas condiciones ambientales, contaminando con frecuencia los alimentos a los cuales se asocian, en especial los de origen vegetal.

Hasta ahora, más de 300 micotoxinas con diversas estructuras han sido identificadas. Estas contaminan la mayoría de los cereales y alimentos frescos, y afectan directamente a la salud humana y animal, ejerciendo enfermedades transmitidas por alimentos y efectos toxicológicos subagudos y crónicos agudos, y algunos considerados como cancerígenos. Muchas micotoxinas a bajas concentraciones son capaces de inducir la expresión de citocromo P450 y otras enzimas implicadas en la biotransformación.

Las micotoxinas y sus metabolitos provocan trastornos celulares diferentes y tan específicos como el estrés oxidativo, la inhibición de la traducción, el daño del ADN y la apoptosis en las células huésped, lo que provoca diversos tipos de citotoxicidades (Wen, Mu, & Deng, 2016).

La biotransformación de micotoxinas en las células animales por isoformas del CYP450 y otras enzimas, su expresión alterada bajo la exposición a micotoxinas, y los recientes avances en la citotoxicidad en líneas celulares de micotoxinas son los temas de interés de los últimos años, en cuanto a toxicología alimentaria se refiere. Pueden disolverse en las fases lipídicas (fundamentalmente) o acuosas de los alimentos, y difundir al interior de ellos, ya que presentan una amplia variedad química (Pitt, 1996). En consecuencia, pueden ser encontradas en cereales, semillas, frutas, y alimentos elaborados en base a estas materias primas.

La mayoría son moléculas raras, con estructuras que van desde anillos heterocíclicos sencillos con pesos moleculares de 50 Da, a estructuras complejas con pesos moleculares mayores a 500 Da. Al ser moléculas pequeñas, no inducen respuesta en el sistema inmune humano. Por lo tanto, el principal riesgo de la presencia de micotoxinas en la dieta humana reside en la incapacidad del ser humano para detectarlas biológicamente (Pitt, 1996).

2.3 Clasificación de las micotoxinas

Las micotoxinas con mayor índice de importancia y estudio son las Aflatoxinas, Ocratoxinas, Citrinina, Alcaloides ergóticos, Patulinas y Fumonicinas, debido a su alta toxicidad y daños provocados al ser humano. A continuación se describen brevemente.

2.3.1. Aflatoxinas

Las aflatoxinas son un tipo de micotoxinas, producidas por especies de hongo del género *Aspergillus*. El término genérico Aflatoxina puede referirse a cuatro tipos diferentes de micotoxinas, conocidas como B1, B2, G1 y G2.

La Aflatoxina B1 es el grupo con mayor toxicidad; es un carcinogénico potente y se lo asocia en particular con el cáncer de hígado en varias especies de vertebrados. Las aflatoxinas se encuentran con más frecuencias en matrices provenientes de áreas tropicales y subtropicales, como el algodón, cacahuates, especias y maíz.

En 2004, 125 personas fallecieron y unas 200 otras enfermaron en Kenia como consecuencia de consumir maíz contaminado. La concentración máxima de aflatoxinas establecida por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) es de 15 µg/kg de peso corporal.

2.3.2. Ocratoxinas

Las Ocratoxinas tienen tres formas, denominadas A, B y C. Todas ellas son producidas por hongos de los géneros *Penicillium* y *Aspergillus*. La ocratoxina A es una forma clorada de la ocratoxina B y la ocratoxina C es un etil – éster de la forma A.

La especie productora de Ocratoxinas *Aspergillus ochraceus* se encuentra a menudo en la cerveza y el vino. *Aspergillus carbonarius* es la especie más abundante en las uvas, y sus toxinas contaminan el mosto durante su extracción.

La ocratoxina A se ha identificado como un agente cancerígeno y se asocia a tumores del tracto urinario.

2.3.3 Citrinina

La citrinina se descubrió por primera vez en la especie *Penicillium citrinum*; desde entonces se han encontrado en más de una docena de especies de *Penicillium* y varias de *Aspergillus*, algunas de las cuales se utilizan en la confección de queso (*Penicillium camemberti*), sake, miso, y salsa de soja (*Aspergillus oryzae*).

La citrinina actúa como una nefrotoxina (riñones, como órganos diana) en todas las especies animales investigadas. Aunque se encuentra en muchos cereales y en el pigmento Monascus, de uso en alimentos, su impacto en la salud humana aún no ha sido totalmente elucidado. En conjunción con la ocratoxina A puede disminuir la síntesis de ARN en los riñones de ratas y ratones (Wen et al., 2016).

2.3.4 Alcaloides Ergóticos

Los alcaloides ergóticos o alcaloides del ergot son una mezcla tóxica de compuestos producidos en el esclerocio de especies del género *Claviceps*, patógenos comunes en varias especies herbáceas.

La ingestión del esclerocio presente en la harina proveniente de cereales infectados causa ergotismo, la enfermedad tradicionalmente conocida como “fuego de San Antonio”.

Aunque los métodos modernos de limpiado de grano han reducido significativamente la incidencia del ergotismo, este todavía constituye un problema veterinario de importancia. Los alcaloides ergóticos tienen usos farmacéuticos.

Se dan dos formas de ergotismo: gangrenoso afectando el riego sanguíneo de las extremidades y convulsivo, que afecta al sistema nervioso central (Wen et al., 2016).

2.3.5. Patulina

La Patulina es segregada por *Penicillium expansum*, y especies de *Aspergillus*, *Penicillium* y *Paecilomyces*.

P. expansum se puede encontrar en frutas y verduras mohosas y podridas, en particular manzanas e higos. La fermentación puede destruir esta toxina, por lo cual puede no aparecer en sidra confeccionada con manzanas infectadas.

Es posible que la Patulina sea carcinogénica, además de causar trastornos gastrointestinales y del sistema nervioso. En 2004, la Unión Europea estableció límites a la concentración máxima de Patulina en alimentos: 50 µg/kg en jugo de frutas y concentrados, 25 µg/kg en manzanas y 10 µg/kg en productos a base de manzanas destinados al consumo infantil, incluyendo el jugo de manzana.

2.3.6. Fumonicinas, Tricotecenos y Zearalenona

Más de 50 especies de hongos del género *Fusarium* producen micotoxinas que contaminan el grano de cereales en desarrollo, como el trigo y el maíz.

Entre estas toxinas se encuentran las fumonisinas, que afectan el sistema nervioso de los caballos y causan cáncer en roedores; los tricotecenos, que tienen diversos efectos tóxicos, a veces fatales, en animales y personas; y la Zearalenona, que es hiperestrogénica.

Otras micotoxinas importantes producidas por hongos *Fusarium* incluyen la beauvericina, eniatinas, butenolide, equisetina y fusarinas.

2.4. Micotoxicosis

Los efectos de las micotoxinas en animales y personas, son diversos e incluyen enfermedades y problemas de salud, depresión del sistema inmunológico, irritación y alergias.

El término general para la intoxicación por micotoxinas es Micotoxicosis. En algunos casos, la Micotoxicosis puede ocasionar la muerte. Los síntomas y efectos de la Micotoxicosis dependen del tipo de micotoxina, la edad, estado de salud y el sexo del individuo afectado. Los efectos sinérgicos de las micotoxinas con factores genéticos, la dieta e interacciones con otras sustancias tóxicas no han sido completamente investigados; se considera posible que las deficiencias vitamínicas, la subalimentación, el alcoholismo y las enfermedades infecciosas puedan influir en el efecto de las micotoxinas (Arroyo-manzanares, Huertas-pérez, Gámiz-gracia, & García-campaña, 2014).

Las micotoxinas causan efectos mediante su ingestión, contacto con la piel o inhalación. Pueden inhibir la síntesis de proteínas, dañar el sistema inmunitario, los pulmones e incrementar la sensibilidad a las toxinas bacterianas (Bohnert, Wackler, & Hoffmeister, 2010).

La ingestión inhalación y/o absorción de micotoxinas, produce enfermedad e incluso la muerte en animales y personas (Pitt, 1996). Los órganos y sistemas más afectados incluyen el sistema nervioso central, sistema gastrointestinal, sistema inmune, hígado, riñón y piel (IARC, 1993)

El principal efecto de intoxicación por micotoxinas reportado, es la deterioración del hígado o la función renal, los cuales a largo plazo pueden inducir cáncer. Algunas toxinas afectan la replicación del ADN y presentan efectos mutágenos o teratógenos (Rodricks, et al., 1977; Smith y Moss, 1985).

Existen dos tipos de toxicidad: aguda y crónica. En la toxicidad aguda el individuo consume alimentos con una alta carga de micotoxina, por otro lado, en la toxicidad crónica el individuo consume alimentos con una baja carga de micotoxina pero de manera repetida a lo largo de un cierto período de tiempo.

2.5. Ocratoxina A (OTA) y sus hongos productores

2.5.1. Generalidades de OTA

La Ocratoxina A (OTA) es una micotoxina neurotóxica, inmunosupresora, genotóxica, carcinógena y teratogénica de gran actualidad que contamina alimentos de consumo humano, principalmente cereales y derivados, bebidas alcohólicas y productos de molienda (café, cacao). Los niveles de Ocratoxina A en los alimentos están estrechamente relacionados con las condiciones de producción y conservación.

La Ocratoxina A (OTA) ($C_{20}H_{18}O_6NCl$) es una molécula formada por un anillo de 3,4- dihidro metil isocumarina unido, por medio de su grupo carboxilo y través de un enlace tipo amida, a una molécula de fenilalanina.

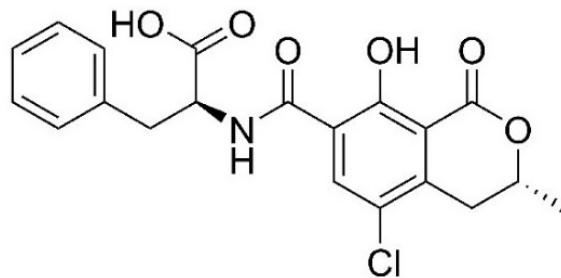


Figura 21: Estructura química de la OTA

La OTA es muy estable, incolora, soluble en disolventes orgánicos polares, poco soluble en agua, con características de ácido débil y capaz de emitir fluorescencia al ser excitada con luz ultravioleta.

Fue detectada por primera vez en muestras de maíz africanas, y es considerada un metabolito secundario tóxico producido por especies de hongos filamentosos superiores de los géneros *Penicillium* y *Aspergillus*, capaces de crecer sobre una amplia gama de sustratos orgánicos. Los cereales, en humanos, y los piensos, en animales, constituyen las principales fuentes de exposición alimentaria, aunque también pueden encontrarse niveles notables de contaminación en otros alimentos. Los granos de café verde, la carne y sus derivados, las uvas, el vino, las pasas e higos secos, el chocolate, las legumbres, la cerveza y las especias, constituyen fuentes dietéticas a considerar sólo en caso de altas ingestas.

Otras fuentes no convencionales de OTA son el té, las infusiones, el regaliz, el aceite de oliva y los alimentos infantiles a base de cereales. Las prácticas agrícolas y las condiciones medioambientales (humedad y temperatura) durante el almacenamiento y el transporte afectan de forma directa a los niveles de OTA en los alimentos. Asimismo, se ha demostrado que una alta actividad de agua favorece la producción de OTA en los alimentos.

Además de la OTA, existen otros tipos de Ocratoxinas como son la Ocratoxina B (OTB) que se caracteriza por ser un derivado no clorado de la OTA con carácter menos tóxico y la Ocratoxina C (OTC) éster de la OTA con escaso potencial tóxico, ambos productos de la hidrólisis de OTA y OTB, respectivamente, que se caracterizan por carecer de toxicidad.

2.5.2. Biosíntesis de OTA

Una posible ruta para la biosíntesis de OTA fue publicada por Huff y Hamilton (1979), de acuerdo a su hipótesis, se presentaron 3 pasos en la biosíntesis de OTA; la primera parte es la síntesis de un policétido de ocratoxina α vía meleina, que involucra la enzima policétido sintasa, seguida por una acil – activación, donde la meleina es metilada y se oxida a 7 – carboxi – meleina (OTB).

La cloración por una cloroperoxidasa da lugar a una OT α . Este componente se transforma entonces en una mezcla anhídrida, mediante una reacción de activación usando ATP. El segundo precursor, fenilalanina, se sintetiza por la vía de ácido succínico seguido por una activación étil éster, que participa en la subsecuente reacción de desplazamiento del grupo acil. En el tercer paso, la unión de estos precursores activados vía sintetasa tiene lugar, generando OTC, y étil éster de OTA. La de-esterificación por una esterasa o trans-esterificación es el último paso en esta ruta de síntesis propuesta (Moss, 1996,).

Sin embargo en un estudio realizado por Harris y Mantle en 2001 no se encuentra evidencia de que métil – meleina y OTC jueguen un rol de intermediarios en la ruta biosintética de OTA. Ellos difieren de la ruta propuesta por Huff y Hamilton, y sugieren una ruta, donde la OT β , un intermediario pentacétido, puede transformarse eficientemente tanto en OTA como en OTB con valores de 14 y 19 %

respectivamente. Por otro lado observaron que la OT α previamente clorada puede transformarse en OTA, por lo que sugieren que la cloración es el penúltimo paso en la ruta de síntesis de OTA.

Una de las enzimas clave para la biosíntesis es la ocratoxina – A – sintetasa. Se presume que esta enzima cataliza el último paso de la biosíntesis de OTA, a partir de ocratoxina α y fenilalanina.

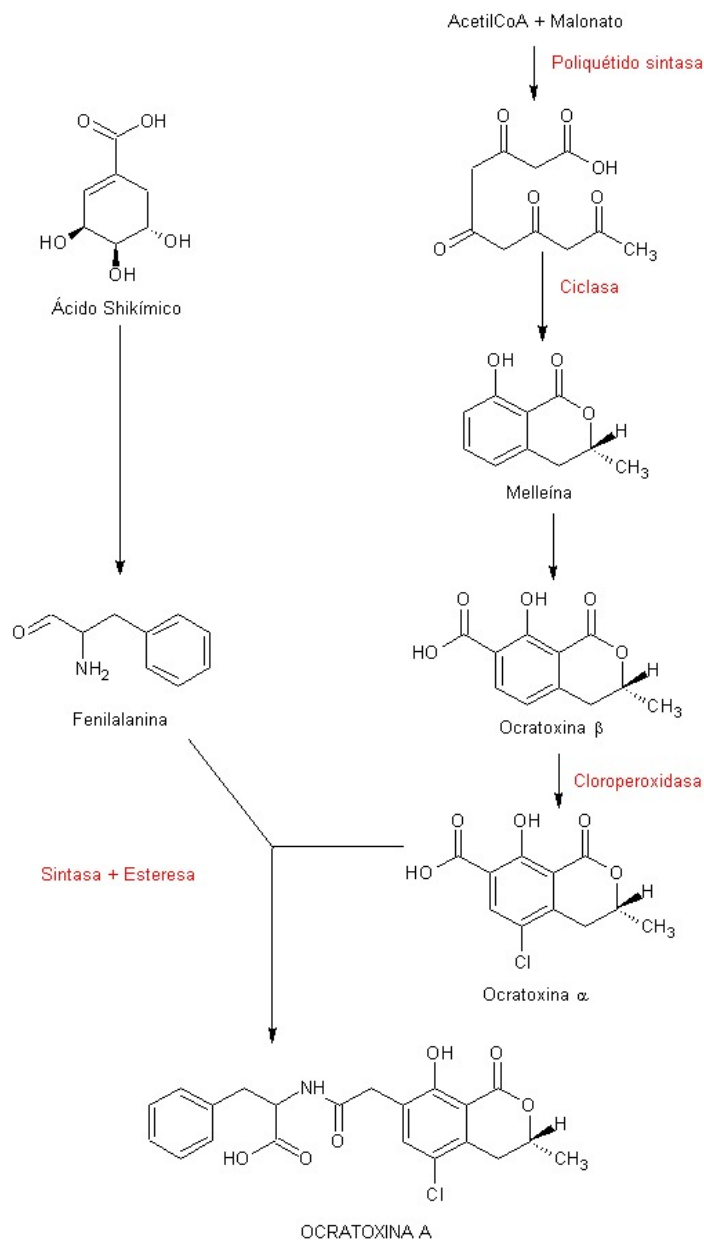


Figura 22: Biosíntesis de OTA

2.5.3. Toxicocinética de OTA

La OTA se absorbe en el tracto gastrointestinal, y pasa a la circulación sistémica, detectándose en sangre y tejidos. Las concentraciones más altas se detectan en los órganos de mayor actividad metabólica como riñón, hígado, músculo y grasa.

Durante su distribución, la OTA tiene una alta capacidad de fijación a las proteínas plasmáticas, y presenta una semivida de eliminación larga, con valores en el cerdo de 72 a 120 horas y en el hombre 840 horas (35 días), siendo la fracción libre de toxina < 0,2%. Tanto la OTA como sus metabolitos se excretan por vía renal y hepatobiliar.

También se han observado niveles de OTA en las secreciones lácteas, lo cual constituye un riesgo para el recién nacido afectándolo de manera directa en su crecimiento y desarrollo.

Un caso excepcional es el de los rumiantes ya que la OTA no es excretada por vía láctea debido a su previa degradación por acción de la microflora del rumen. El metabolismo de Ocratoxina A genera derivados hidroxilados (4-OH-OTA y 10-OH-OTA) y productos de conjugación con glutatión.

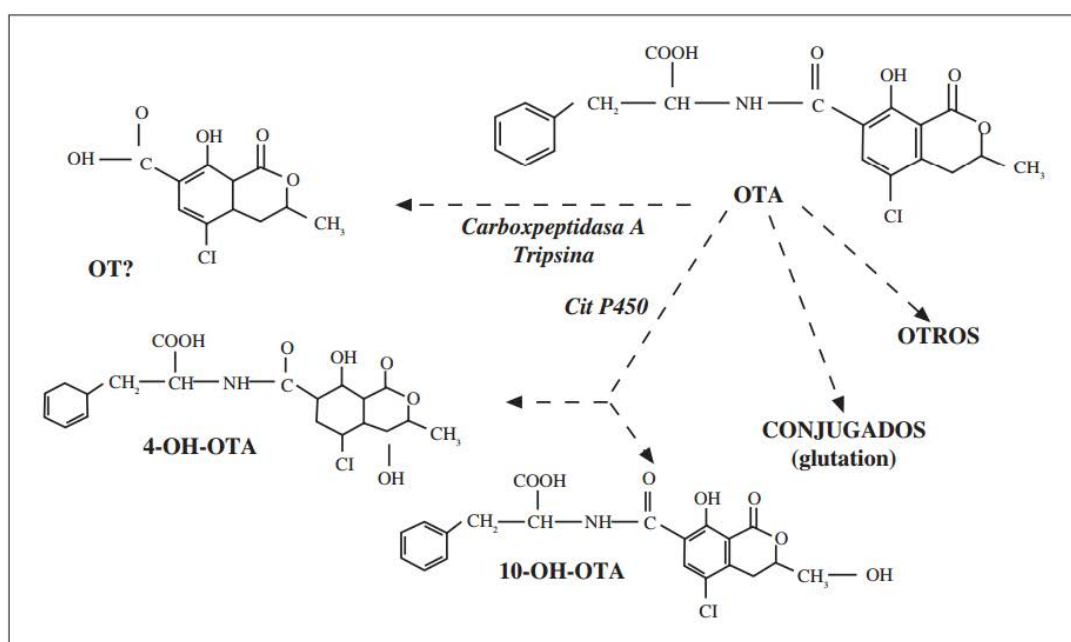


Figura 23: Metabolismo de la OTA

La OTA puede actuar como sustrato de la enzima fenilalanina hidroxilasa dando lugar como producto final a la Tyr-OTA que es metabolizado a 4R/S-hidroxitirosin-OTA y otros metabolitos

2.5.4. Hongos productores y condiciones de producción

Aspergillus carbonarius, *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium verrucosum* y *P. viricatum*, se consideran los principales productores de Ocratoxina A en alimentos debido a su gran facilidad de dispersión y crecimiento.

Aspergillus crece en un intervalo de temperatura comprendido entre 12 a 37 °C, y se asocia a climas cálidos y tropicales, detectándose sobre todo en alimentos almacenados. Abarca *et. al*, describieron, por primera vez, la producción de OTA por *A. niger var. niger*, y desde entonces son numerosos los estudios que describen la producción de OTA por otras especies negras de *Aspergillus* presentes en viñedos, fincas de café y cacao (Abreu, Armendáriz, Fernández, Hardisson, & Torre, 2011).

El género *Penicillium* crece en un intervalo de temperatura más bajo (4 a 31 °C) y con una actividad de agua de 0,80 por lo que va a contaminar alimentos producidos en climas templados y fríos, especialmente en cereales y derivados. Entre todas ellas, *Aspergillus carbonarius* y *P. purpurogenum* se caracterizan por tener un alto potencial ocratoxigénico (Champion Martínez, 2016).

2.5.5. Consumo y límites máximos permitidos

Para evitar la presencia de micotoxinas en los alimentos la Comisión Europea publicó el Reglamento (CE) nº 472/200236 que fijaba los límites máximos de OTA en: 5 µg/kg para cereales; 3 µg/kg para derivados elaborados a base de cereales y 10 µg/kg en uvas pasas, así como los métodos de toma de muestra y análisis. Posteriormente, se adoptó el Reglamento (CE) nº 683/200437 de la Comisión, de 13 de Abril de 2004, que modifica el Reglamento (CE) nº 466/2001 en lo que respecta a los contenidos de Aflatoxinas y Ocratoxina A en alimentos destinados a niños lactantes o de corta edad (Copetti, Iamanaka, Nester, Efraim, & Taniwaki, 2013).

Sin embargo, determinados países de la Unión Europea, han establecido sus propios límites máximos de OTA en alimentos y piensos; por ejemplo en Italia se limita el contenido de OTA en carne de cerdo y productos derivados a 1 µg/kg, en café tostado e instantáneo a 4 µg/kg y en los alimentos infantiles a 0,5 µg/kg (Edem et al., 2016).

Actualmente el Reglamento que regula los niveles de Ocratoxina A en los alimentos, es el Reglamento (CE) nº 1881/2006/39 de la Comisión, en el cual se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios.

El Comité científico sobre alimentación de la Comisión Europea (1998), basándose en los datos de genotoxicidad y carcinogenicidad, considera que sería prudente reducir la exposición de OTA lo máximo posible, a niveles inferiores a 5 ng/kg de peso corporal al día. Sin embargo, el Comité Mixto FAO/WHO de expertos sobre aditivos alimentarios (JECFA, 1995) estableció un valor máximo de ingesta semanal tolerable de 100 ng / kg de peso corporal, lo que equivale a una ingesta diaria de 14 ng/kg de peso corporal (Company, 2004).

El Panel de Contaminantes de la Cadena Alimentaria (CONTAM) de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (2006) declaró una ingesta semanal tolerable (IST) de 120 ng/kg de peso corporal para la OTA, lo que equivale a una ingesta diaria de 17,1 ng/kg de peso corporal, siendo este valor superior al propuesto por JECFA en 1995.

La exposición alimentaria a OTA en los consumidores adultos europeos, oscila en un rango de 15-60 ng OTA/kg de peso corporal/semana, siendo este valor inferior al valor propuesto por EFSA en 2006 (Copetti, Pereira, Iamanaka, Pitt, & Taniwaki, 2010).

2.6. Aflatoxina B1 (AFB1) y sus hongos productores

2.6.1. Generalidades

Las aflatoxinas son micotoxinas producidas por mohos del género *Aspergillus*, especialmente por algunas cepas de *Aspergillus flavus* y por casi todas las de *Aspergillus parasiticus*. El interés en ellas se despertó con motivo de la aparición, en primavera y verano de 1961, de una epidemia entre la población de pavos de las granjas de Gran Bretaña, que ocasionó la muerte a más de 100.000 ejemplares. La investigación reveló que la causa era la harina de cacahuets, contaminada con *Aspergillus flavus*, importada de Brasil. Estos mohos pueden proliferar en mucha materia prima de uso alimentario y para piensos, causando problemas principalmente en cacahuets, maíz, semillas de algodón, todo tipo de frutos secos, copra, y también en cereales.

La Aflatoxina B1 está englobada en el grupo 1 de IARC, por ser cancerígena para el ser humano. La aflatoxina M1 se considera posiblemente cancerígena para el ser humano, y está incluida en el grupo 2B.

2.6.2. Clasificación de las Aflatoxinas

Aunque han sido identificados al menos 20 tipos diferentes de aflatoxinas, existen cuatro aflatoxinas principales: Aflatoxina B1, Aflatoxina B2, Aflatoxina G1 y Aflatoxina G2.

Las vacas que se alimentan con pienso contaminado por aflatoxinas B son capaces de metabolizar las aflatoxinas, hidroxilándolas en una posición determinada. Así, a partir de la aflatoxina B1 se forma la aflatoxina M1, y a partir de la aflatoxina B2 se forma la aflatoxina M2.

Las aflatoxinas M1 (AFM1) y M2 aparecen en la leche, la orina y las heces. Las aflatoxinas son tóxicos hepáticos y carcinogénicas. El grado de toxicidad carcinogenicidad de las aflatoxinas sigue el orden B1 > G1 > B2 > G2(Su, n.d.).

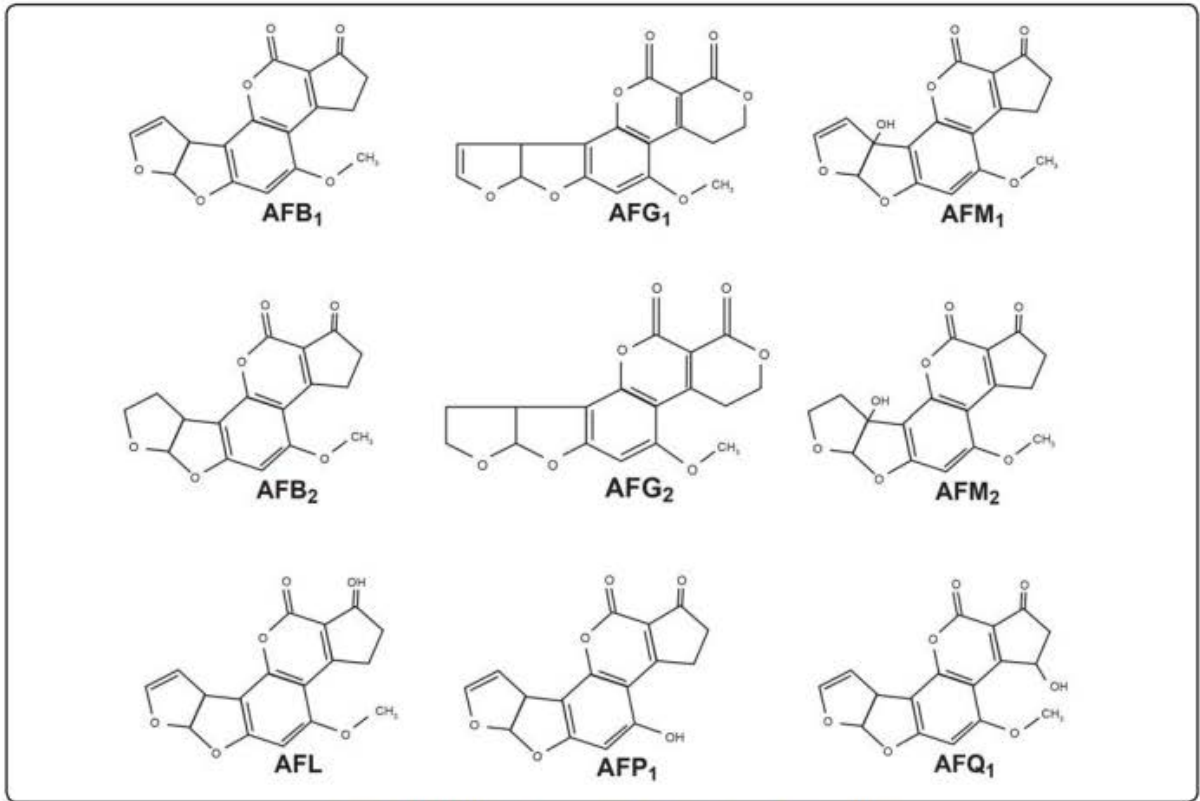


Figura 24: Clasificación de las Aflatoxinas

2.6.3. Biosíntesis de Aflatoxina B1 (AFB1)

Los patrones de formación de las Aflatoxinas y de lípidos son similares, vienen de un acetato que es el precursor común. Cuando la glucosa C¹⁴ se incorpora en posición uno en condiciones anaeróbicas, la vía catabólica de la glucosa Emblem Meyerhoff se rompe y favorece la producción de Aflatoxinas.

Los precursores metabólicos de la biosíntesis de AFB1 tienen una estructura básica C₂₀ poli-β-quétido y pertenecen a diferentes grupos como: xantonas (esterigmatocistina, O-metil-esterigmatocistina, aspertoxina), poli-hidroxi-antraquinonas (averufina, O-dimetil nidurufina, ácidos solorínico y norsolorínico, averantina 1-O-dimetilaverantina, averitrina y acetato versiconal), Aflatoxinas y parasiticol.

Las AF se producen por hongos filamentosos cuando la reducción de grupos cetónicos se interrumpe y se favorecen las reacciones de condensación en la ruta metabólica de la producción de ácidos grasos.

Este proceso trae la síntesis de compuestos policetónicos (aflatoxinas). La ruta bioquímica aceptada para la síntesis de AF comprende alrededor de 23 reacciones enzimáticas, y la mayoría de los genes responsables se han caracterizado y aislado (Carvajal, 2013).

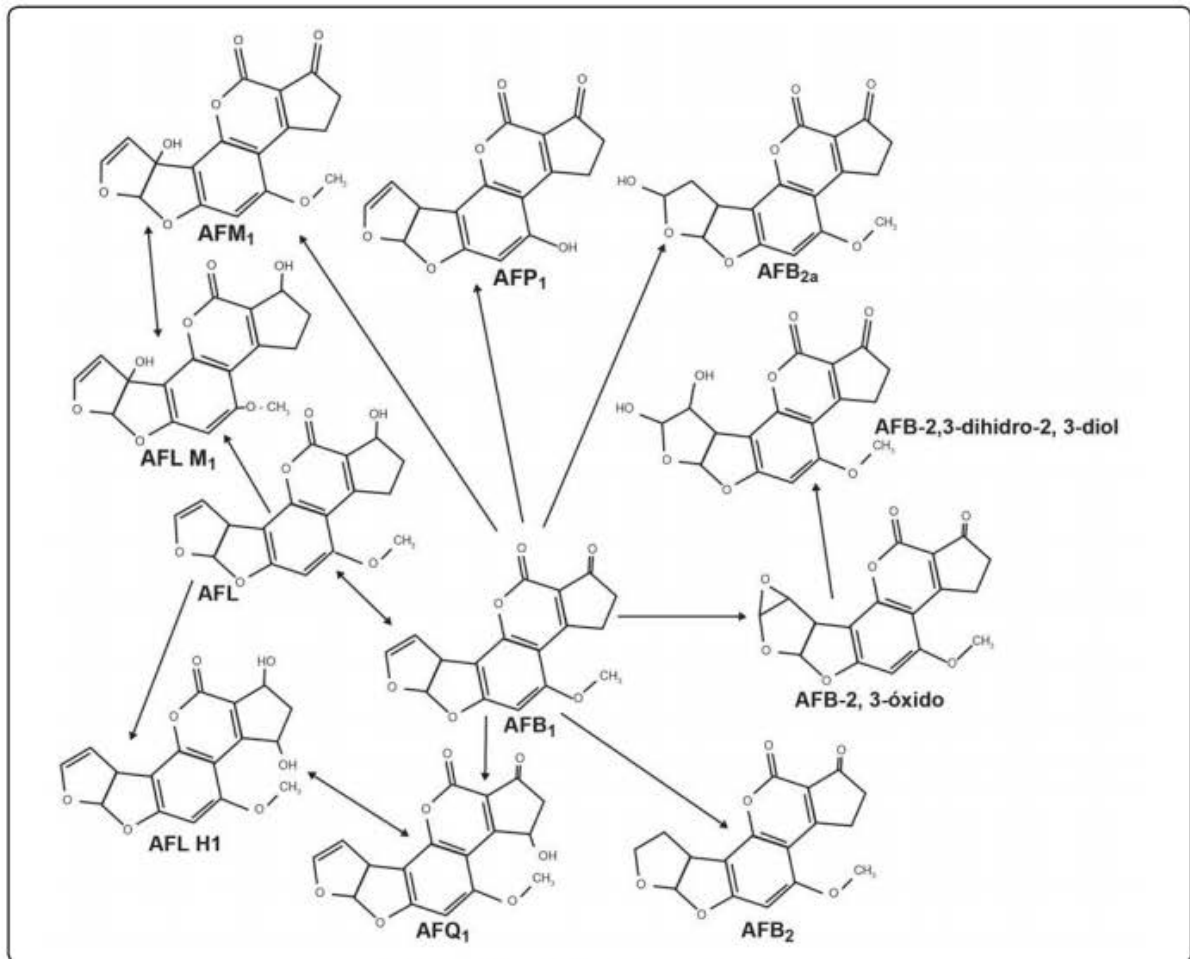


Figura 25: Biosíntesis de Aflatoxinas

2.6.4. Toxicología de AFB1

La AFB1 produce amplia absorción gastrointestinal tras ingestión vía oral, excepto en rumiantes, ya que en ellos gran parte de las aflatoxinas son destruidas en el rumen y no llegan al resto del organismo.

La AFB1 es distribuida por la corriente circulatoria y es metabolizada en parte a AFM1 en el hígado. La excreción de la aflatoxina B1 se produce en un 50% por la

bilis, ya metabolizada, y 15 a 25% por la orina, sin metabolizar. La excreción de la aflatoxina M1 se produce con la leche.

El grupo poblacional de mayor riesgo son los niños y jóvenes porque tienen el metabolismo basal diferente y porque no tienen mecanismos biológicos de defensa. También se debe tener en cuenta a las mujeres embarazadas por la posibilidad de intoxicación del bebé con la AFM1, que la mujer excreta con la leche materna (Uribe-yunda, 2012).

La magnitud de la expresión de los síntomas se puede ver influida por:

- La edad.
- El sexo.
- La exposición a otros patógenos (Virus de la hepatitis, parásitos, etc.)

Las Aflatoxinas se ligan o adhieren a ácidos nucleicos ADN y ARN, y a proteínas, y afectan a todos los seres vivos con ácidos nucleicos, desde virus a vegetales y al hombre. EL DNA afectado puede almacenar las moléculas de AFB1 por años, y al tratar de regenerarse corta la porción de nucleótidos donde se pegó la AFB1 y la elimina por orina, leche o heces fecales.

Cuando se ingieren altas concentraciones de Aflatoxinas en los alimentos, se producen efectos agudos a corto plazo (vómitos, diarreas, hemorragias, necrosis, abortos, defectos en coagulación y muerte), en bajas concentraciones por largo tiempo sus efectos son crónicos (teratogénesis, inmunodepresión, mutagénesis, hepatitis, cirrosis, aplasia del timo y cánceres diversos) y se han asociado con el Síndrome de Reye, con encefalitis y degeneración grasa de las vísceras de los niños, amarillamiento, inmunosupresión, falla renal, neurotóxica o gástrica, kwashiorkor y marasmo.

Las Aflatoxinas afectan la absorción y el metabolismo de lípidos, carbohidratos, proteínas, vitaminas y minerales, y su toxicidad afecta el transporte electrónico de la cadena respiratoria y las membranas celulares y subcelulares.

Las Aflatoxinas ingeridas con los alimentos se absorben por la mucosa intestinal, pasando de la sangre al hígado, riñón, conductos biliares y sistema nervioso.

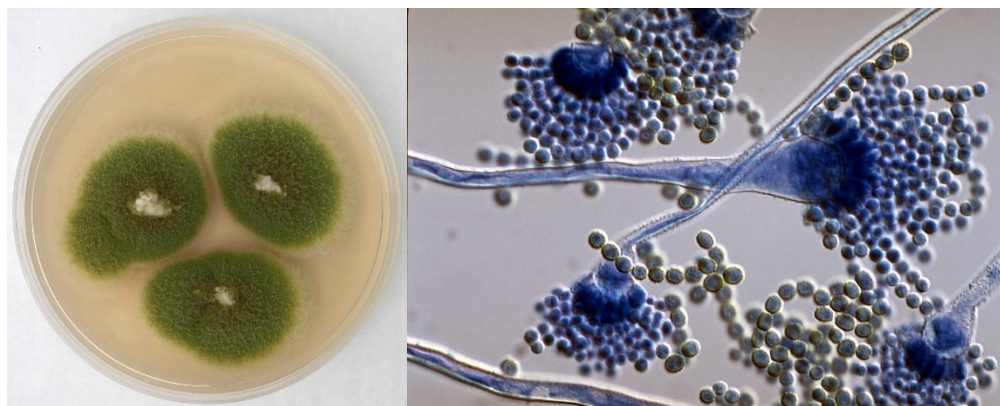
Los cambios citológicos causados por las Aflatoxinas en las células vegetales y animales son similares: nucléolos en forma de anillo con capas diferenciadas, numerosos cuerpos lipídicos, mitocondrias con cisternas alargadas, retículo endoplásmico desgranulado, núcleos alargados e irregulares y cromatina con muchos gránulos.

La AFB1 actúa como un antimetabolito que se liga al ADN e interfiere con el ARN y la síntesis de proteínas (Epóxidos) (Carvajal, 2013).

2.6.5. Hongos productores de AFB1 y condiciones de producción

Las especies más relacionadas con la producción de aflatoxinas son *A. flavus*, *A. parasiticus* y *A. nomius*. Existen otras cepas asociadas a la contaminación de AFB1, pero hasta el momento no se ha comprobado su toxicidad.

- ***Aspergillus parasiticus***: produce aflatoxinas B y G. Normalmente se aísla en el suelo. A continuación se muestra macroscópica y microscópicamente una cepa de este hongo.



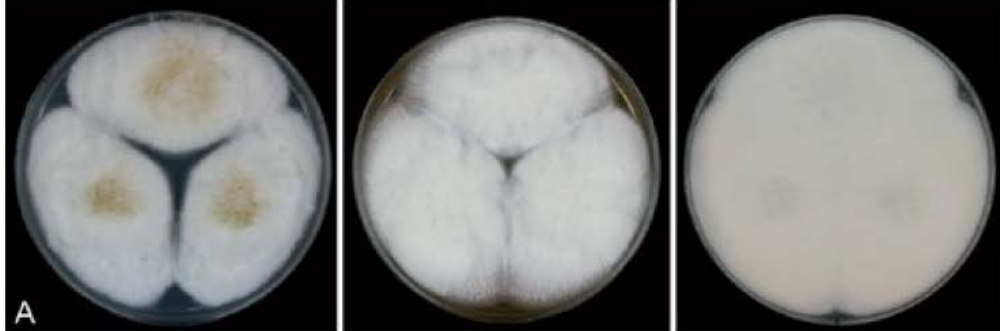
Figuras 26: *Aspergillus parasiticus*, macroscópica (lado izquierdo) y microscópicamente (lado derecho). Medio PDA.

- ***Aspergillus flavus***: sólo produce aflatoxinas B. Se encuentra normalmente en las partes aéreas de la planta (tallo y hojas). A continuación se muestra macroscópica y microscópicamente una cepa de este hongo.



Figuras 27: *Aspergillus flavus*, macroscópica (lado izquierdo) y microscópicamente (lado derecho). Medio PDA

- ***Aspergillus nomius***: produce aflatoxinas B y G. Normalmente se aísla en el suelo. A continuación se muestra macroscópicamente y microscópicamente una cepa de este hongo.



Figuras 28: *Aspergillus nomius*, macroscópicamente. Colonias sembradas en medios CYA, MEA y YES (7 días, 25 °C).

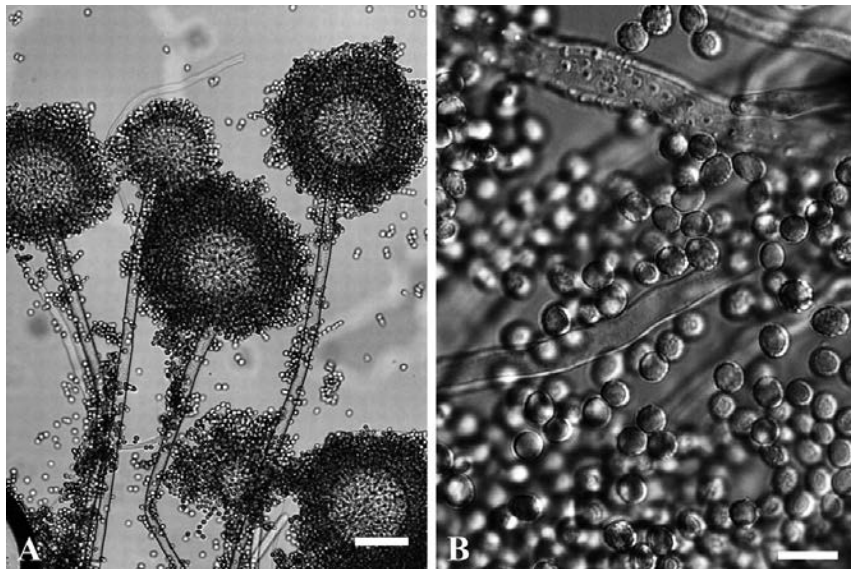


Figura 29: *Aspergillus nomius*, (A) cuerpo conidial, observado microscópicamente. (B) Observaciones de esporas. (Manikandan, Samson, Anita, Miha, & Narendran, 2009)

Las especies del género *Aspergillus* normalmente requieren ciertas condiciones especiales para crecer y producir aflatoxinas. El hongo puede crecer desde 4°C hasta 45°C, mientras que la toxina puede ser producida desde 11°C hasta 35°C, con una temperatura óptima de 22°C y una humedad relativa del 80 a 90% (Elika, 2013).

- *Otras cepas asociadas:*

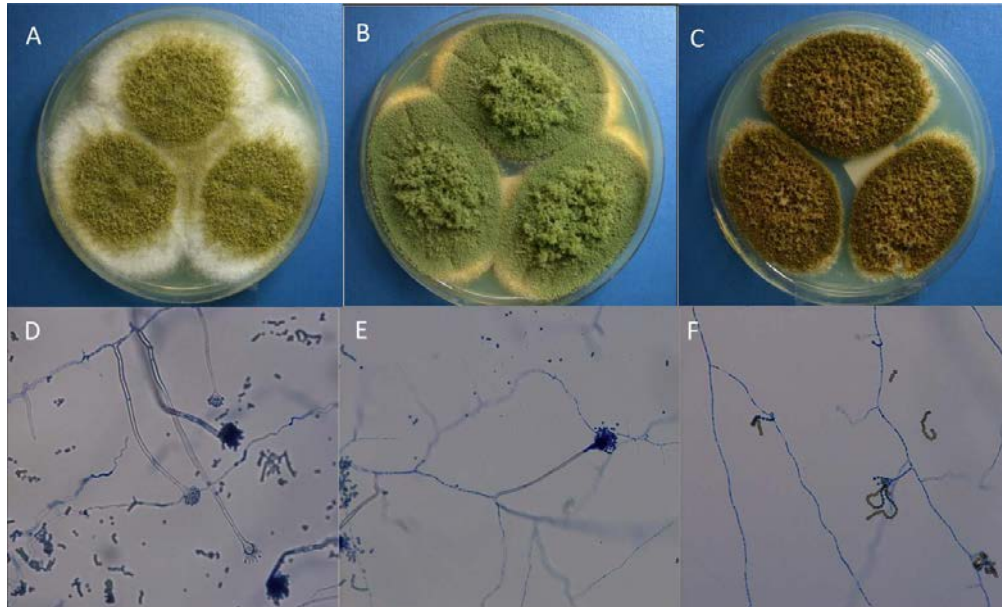


Figura 30: Cultivos y exámenes microscópicos y macroscópicos de hongos filamentosos aislados en medio PDA con 5 días y 37 °C. A, D: *Aspergillus flavus*. B, E: *Aspergillus parasiticus*. C, F: *Aspergillus tamarii*.

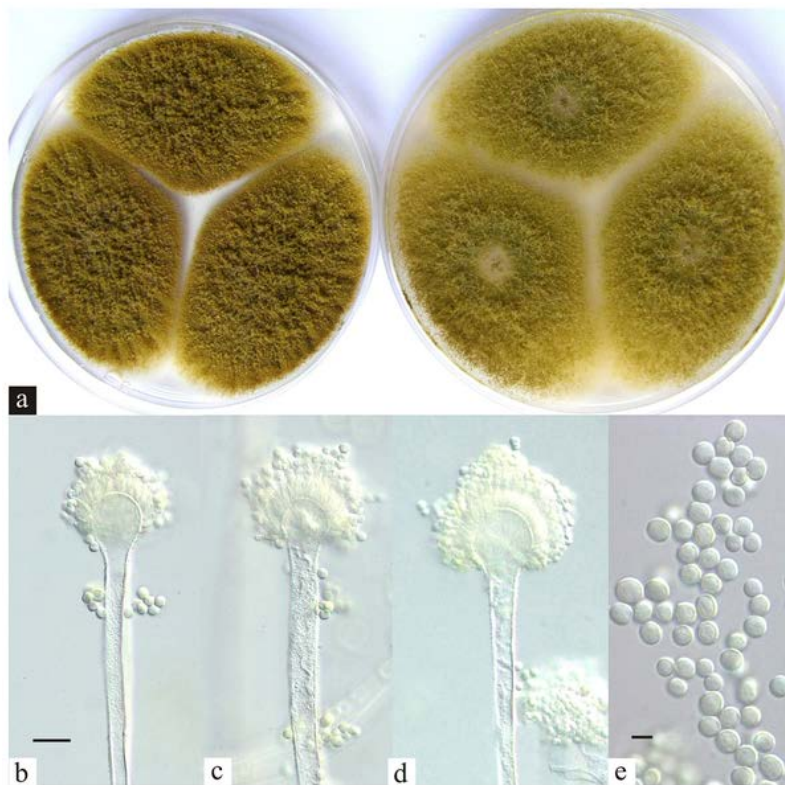


Figura 31: *Aspergillus bertholletius*. (A) Colonias aisladas en CYA después de 7 días de incubación a 25 °C. (B, C, D,) Cabeza conidial, bar= 10 µm. (E) Esporas, bar= 5 µm.

2.6.6. Consumo y límites máximos permitidos de AFB1

En los últimos años la creciente preocupación que, desde el punto de vista de seguridad alimentaria, ha supuesto la presencia de micotoxinas en los alimentos, se ha traducido a nivel legislativo en un incremento del número de normativas que regulan no sólo los niveles máximos para cada micotoxina en diferentes alimentos, sino también los protocolos de toma de muestras y las especificaciones requeridas a los métodos de análisis a utilizar para las determinaciones analíticas.

Las autoridades para fijar los límites y establecer reglamentaciones sobre las micotoxinas han tenido en cuenta varios factores como son el riesgo, la distribución de la micotoxina en el producto y los procedimientos de muestreo, la disponibilidad de métodos de análisis y la disponibilidad de alimentos evaluando la política económica.

La presencia de aflatoxina B1 en los piensos está regulada por el Reglamento (UE) N° 574/2011 de la Comisión, por el que se modifica el anexo I de la Directiva 2002/32/CE del Parlamento Europeo y del Consejo con respecto a los contenidos máximos de nitritos, melamina y *Ambrosia spp.*, y a la transferencia de determinados coccidiostáticos e histomonóstatos.

El Real Decreto 47/1988, de 13 de mayo de 1988, por el que se establecen los límites máximos permitidos de las aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 en alimentos para consumo humano. La JECFA estableció una Ingesta Diaria Tolerable (TDI) de 0.11 – 0.19 ng/kg de peso corporal al día.

3. Estudio de hongos filamentosos toxigénicos y sus toxinas en el grano cacao

3.1 Identificación por técnicas microbiológicas

Las técnicas microbiológicas se utilizan para detectar si hay microorganismos sobre una muestra y para identificarlos y cuantificarlos. Por tanto, el primer paso en el estudio microbiológico será aislar las diferentes especies de hongos filamentosos y/o toxigénicos que haya en la muestra de grano de cacao.

3.1.1. Siembra de grano de cacao

La técnica para el aislamiento comienza preparando un inóculo de siembra, que es la deposición de una pequeña porción de la muestra en el medio o en los medios de cultivo adecuado, en función de las especies microbianas que se espera encontrar. Por eso, existen distintos métodos o tipos de siembra, en función de la muestra de partida, del medio en el que se siembra y de la finalidad del estudio. Describiremos la siembra para inoculación y la siembra para aislamiento.

3.1.2. Medios de cultivo

3.1.3. Claves taxonómicas

3.2 Identificación por técnicas de la Biología Molecular

La flora microbiana puede ser estudiada mediante el análisis de su ADN (Ácido desoxirribonucleico); después de la extracción del ADN total de una muestra natural, esta es amplificada con primers universales para cada una de las poblaciones a analizar.

Los estudios sobre la ecología microbiana del grano de cacao, son complicados debido a diversos factores. Muchas de las fincas productoras, están localizadas en lugares remotos de difícil acceso, de tal forma que las facilidades para el estudio científico son mínimo.

El uso de procedimientos microbiológicos convencionales, ha permitido obtener información sobre la ecología microbiana viable de fermentaciones de grano de cacao, sin embargo, estas técnicas son laboriosas y la especificidad depende del sustrato, lo cual limita el alcance de la identificación.

Estudios basados en técnicas de biología molecular tales como PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) y DGGE (Gel de Electroforesis con Gradiente Desnaturalizante) permiten identificar la flora microbiana presente en diversos procesos (Fleet, 1999) de manera más amplia que con la microbiología tradicional. Su especificidad está basada en “huellas genéticas”, los resultados se obtienen más rápido y las técnicas son relativamente más sencillas.

3.2.1. Estudio por PCR – DGGE

La electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización, también referida como electroforesis en gel desnaturalizante en gradiente (DGGE, por sus siglas en inglés), es una técnica de huella, rastreo o trazado molecular usada en diversas disciplinas de la ciencia, que consiste en la separación de cadenas de ADN de doble cadena dependiendo de su punto de desnaturalización, siendo dicha desnaturalización definida en éste caso como la separación de cadenas complementarias de ADN.

Se basa en que un fragmento de ADN de doble cadena puede ser desnaturalizado por medios físicos (temperatura) o químicos (agentes desnaturalizantes como urea). El punto de desnaturalización de tal fragmento de ADN aumentará con el tamaño de la secuencia de nucleótidos que lo conforman, y también por la composición de nucleótidos de la secuencia, que suele aumentar con altos contenidos de Guanina (G) y Citosina (C), aumentando la probabilidad en el incremento de secuencias que lleven consecutivamente G o C.

Hay relaciones derivadas de esta relación: secuencias ricas en GC tienen, con sus secuencias de bases complementarias, apareamientos más espontáneos) ya que en estos casos, tienen energía de Gibbs más negativa y por tal motivo aumenta la temperatura mínima de fundición de la secuencia de ADN.

Cuando un fragmento de ADN de un determinado tamaño y secuencia se encuentra en las condiciones que producen su desnaturalización, desenrollándose la doble hélice, la migración de dichas cadenas en una electroforesis en gel se detiene o es considerablemente más lenta. Por tal motivo dicha técnica utiliza un gradiente de desnaturalización durante la migración de fragmentos de ADN en un gel de electroforesis con rangos en los cuales sea posible tener estados de ADN de cadena doble iniciales y estados de cadena sencillas desnaturadas en algún punto de la migración para un fragmento de un tamaño y una secuencia específica.

Los fragmentos de ADN de doble cadena presentan secuencias diferentes por lo que también presentarán migraciones diferentes, ya que se detendrán a diferentes

posiciones o longitudes del gel, de acuerdo a la concentración del gradiente desnaturalizante.

Con la finalidad de analizar los fragmentos ya separados y detenidos en algún punto del gel, se realiza una coloración o marcaje de ADN y se toma una “impresión genética” de las muestras.

El perfil de una muestra se compone de varias bandas horizontales, dispuestas verticalmente a lo largo del gradiente de concentración, donde una banda representa teóricamente una especie.

Actualmente esta técnica se está utilizando para poner de manifiesto la ecología microbiana correspondiente a un proceso específico, descubrir sus relaciones e interacciones con la matriz a la cual están anclados y así poder puntualizar la relación microorganismo – ambiente (Fernández & Le, 1987).

3.2.1.1. Aplicaciones

Desde que Muyzer *et al.*, en 1993, introdujeron el empleo de la técnica PCR-DGGE, esta ha sido empleada con éxito para estudiar las comunidades microbianas en el ambiente, cada técnica es habitualmente empleada para evaluar la diversidad y la dinámica de la comunidad microbiana en respuesta a los cambios ambientales. Son relativamente pocos los estudios que utilizan esta técnica para caracterizar la diversidad de eucariontes.

Las aplicaciones más recientes se han hecho sobre el estudio de la estructura y la evolución de comunidades de hongos en el ambiente (López-Achilla *et al.*, 2001; Aguilera *et al.*, 2006), suelo (Van Elsas *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2008), frutas frescas (El sheikha *et al.*, 2009; El Sheikha y Montet, 2011), trigo (Smith *et al.*, 1999; Gomes *et al.*, 2003) o lodos (Vainio y Hantula, 2000).

Durante los últimos años, la técnica DGGE ha sido utilizada para estudiar las poblaciones de hongos en la leche, la levadura de pan (Meroth *et al.*, 2003; Gatto y Torriani, 2004; Cocolin *et al.*, 2002), el café (Masoud *et al.*, 2004; Vilela *et al.*, 2010) y las fermentaciones en vino (Cocolin *et al.*, 2000, 2001, 2002b; Hernán-Gómez *et al.*, 2000).

Estos estudios muestran que la técnica PCR-DGGE es una alternativa más viable que el método de microbiología tradicional, para evaluar la microflora presente en las fermentaciones de vinos. En cada caso, los autores han obtenido una excelente correlación entre los datos obtenidos con microbiología tradicional y la presencia o ausencia de una banda en el perfil DGGE obtenido.

En 2011, Papalexandratou *et al.*, realizaron una comparación entre la modalidad de fermentación de grano de cacao en caja y la de por montones, proveniente de Costa de Marfil y Brasil. Utilizaron la técnica PCR-DGGE para conocer la dinámica de levaduras y bacterias, y por otro lado estudiaron la producción de metabolitos a lo largo de esta. Finalmente observaron que la evolución cuantitativa de los compuestos analizados se encontraba aunada a la dinámica de las principales especies presentes en la fermentación.

Aunque la técnica PCR-DGGE en cacao, solo aporta estimación general del número de las comunidades microbianas como una función de tiempo, y aún en ausencia de resultados de cultivos, la evolución de compuestos o cualquier otra característica, puede ser relacionada con las dinámicas de la flora microbiana en cualquier caso.

Por otro lado, a pesar de que la técnica PCR-DGGE ha probado ser una herramienta muy útil para el estudio de dinámicas microbianas, presenta ciertas limitantes por lo que se recomienda el análisis por métodos microbiológicos tradicionales para reducir cualquier sesgo.

3.3. Identificación Analítica de micotoxinas en el grano de cacao.

3.3.1. Extracción y Purificación de micotoxinas

3.3.2. Determinación y Cuantificación

Los métodos de determinación y cuantificación han variado a lo largo de los años, así como los procedimientos de extracción y purificación. El objetivo principal en la elaboración de técnicas es la obtención de niveles de detección muy bajos, pudiendo ser utilizados tanto en investigación como en análisis de prospección o control.

Entre los métodos más usuales empleados para la determinación y cuantificación de los niveles de Ocratoxina A, debido a la rapidez y semicuantificación en el procedimiento de screening se incluyen:

- Cromatografía líquida de alta resolución.
- Cromatografía de capa fina.
- Cromatografía de intercambio iónico.
- Técnicas de electroforesis capilar.

A pesar de todo esto, diferentes investigadores, han realizado de manera independiente y de forma patentada diferentes métodos, para fomentar el desarrollo a la investigación y la creación de diferentes técnicas debido a la escasez de los métodos analíticos.

3.3.3 Estudio de micotoxinas mediante Ensayo de inmuno – absorción ligada a enzimas (ELISA)

El Ensayo de inmuno – absorción ligado a enzimas (ELISA) es una técnica inmunológica en la cual un antígeno inmovilizado se detecta mediante un anticuerpo enlazado a una enzima capaz de generar un producto detectable, como cambio de color o algún otro tipo; en ocasiones, con la finalidad de reducir los costes del ensayo, se centra con que existe un anticuerpo primario que reconoce al antígeno y que a su vez es reconocido por un anticuerpo secundario que lleva

enlazado la enzima anteriormente mencionada. La aparición de colorantes permite medir indirectamente mediante espectrofotometría el antígeno en la muestra.

Se usa en muchos laboratorios para determinar si un anticuerpo particular está presente en la muestra de sangre de un paciente. En cuestiones de los alimentos se ocupa el mismo principio, debido a las reacciones: antígeno – anticuerpo, que generan las micotoxinas con el sistema inmunológico del cuerpo.

Aunque el procedimiento es rutinario y sencillo, involucra a un gran número de variables, tales como selección de reactivo, temperatura, medición de volumen y tiempo, que si no se ajustan correctamente, puede afectar los pasos sucesivos y el resultado de la prueba. Una mala realización del protocolo de esta técnica, generará datos erróneos.

3.3.2. Estudio mediante Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

La cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) es un tipo de cromatografía en columna utilizada frecuentemente en bioquímica y química analítica. También se la denomina a veces cromatografía líquida de alta presión o cromatografía líquida de alta resolución, aunque esta terminología se considera antigua y está en desuso.

El HPLC es una técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias analizadas y la columna cromatográfica.

En la HPLC isocrática el compuesto pasa por la columna cromatográfica a través de la fase estacionaria (normalmente, un cilindro con pequeñas partículas redondeadas con ciertas características químicas en su superficie) mediante el bombeo de líquido (fase móvil) a alta presión a través de la columna.

La muestra a analizar es introducida en pequeñas cantidades y sus componentes se retrasan diferencialmente dependiendo de las interacciones químicas o físicas con la fase estacionaria a medida que adelantan por la columna. El grado de retención de los componentes de la muestra depende de la naturaleza del compuesto, de la composición de la fase estacionaria y de la fase móvil.

El tiempo que tarda un compuesto a ser eluido de la columna se denomina tiempo de retención y se considera una propiedad identificativa característica de un compuesto en una determinada fase móvil y estacionaria.

La utilización de presión en este tipo de cromatografías incrementa la velocidad lineal de los compuestos dentro de la columna y reduce así su difusión dentro de la columna mejorando la resolución de la cromatografía. Los disolventes más utilizados son el agua, el metanol y el acetonitrilo. El agua puede contener tampones, sales, o compuestos como el ácido trifluoroacético, que ayudan a la separación de los compuestos (Taylor, Amézqueta, Murillo, & Cerain, 2014).

El gradiente separa los componentes de la muestra como una función de la afinidad del compuesto por la fase móvil utilizada respecto a la afinidad por la fase estacionaria. En el ejemplo, utilizando un gradiente agua/acetonitrilo los compuestos más hidrofílicos eluirán a mayor concentración de agua, mientras que los compuestos más hidrofóbicos eluirán a concentraciones elevadas de acetonitrilo. A menudo, hace falta realizar una serie de pruebas previas con tal de optimizar el gradiente de forma que permita una buena separación de los compuestos (Durand, Galindo, Guyot, & Guyot, 2012).

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Estudiar la diversidad de hongos filamentosos toxigénicos en las diferentes modalidades de fermentación, secado y almacenamiento del grano de cacao, y correlacionar su impacto sobre la calidad sanitaria.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estudiar la presencia de hongos filamentosos toxigénicos en cada una de las vías de tratamiento postcosecha analizadas.
2. Cuantificar los niveles de contaminación por micotóxicas en las diferentes vías de proceso (Ocratóxina A y Aflatóxina B1).
3. Determinar las modalidades del proceso que favorecen la pérdida de inocuidad del grano.
4. Proponer medidas de control mediante la elaboración de estrategias de prevención del manejo postcosecha del grano de cacao.

JUSTIFICACIÓN

Debido a la importancia de generar productos alimenticios inocuos al ser humano, surge la necesidad de puntualizar y controlar el proceso postcosecha del cacao en México, ya que la forma de procesamiento actualmente no está previniendo el ataque por hongos toxigénicos y a la vez, la aparición de las micotóxicas (OTA, AFB1).

Las diferentes vías de tratamiento postcosecha no se fundamentan en ningún parámetro de control sanitario y propician la contaminación del grano de cacao.

Entonces, es de vital importancia proponer un tratamiento postcosecha con controles sanitarios y que sea inocuo, conservado la calidad aromática del cacao.

HIPÓTESIS

La contaminación del grano de cacao mexicano por hongos toxigénicos y la variación de los niveles de OTA y AFB1, está estrechamente relacionada con las diferentes vías de procesamiento postcosecha del mismo.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Materiales

1.1 Material Biológico

Las muestras de granos de cacao se recolectaron de la cosecha 2016, en la región de mayor producción del estado de Tabasco, México.

Para este estudio se eligieron las fincas que contaban con las diferentes modalidades de fermentación y secado del grano de cacao y del almacén general de la Unión de Productores de Cacao.

La recolección se realizó de forma manual y en condiciones asépticas, utilizando guantes de látex estériles y cuidando las medidas de seguridad para evitar la contaminación de la muestra por fuentes externas.

Las muestras se depositaron en bolsas estériles de cierre hermético y fueron transportadas al laboratorio de Bromatología en condiciones de refrigeración para su posterior análisis.

1.2 Equipo de Laboratorio

1.2.1. Lector de micropozos

Para la determinación de OTA y AFB1 en medio de cultivo y en el grano de cacao, se utilizó un lector ELISA automático para tiras de pozos, NEOGEN® Stat Fax® 4700, con un rango de medición lineal: 0.00 a 3.0 (A), una exactitud fotométrica de $\pm 1.0\%$ y una longitud de onda de 650 nm para ambas toxinas.

1.2.2 Microscopio de campo claro

Las observaciones microscópicas se llevaron a cabo con un microscopio Motic® BA200, que posee objetivos de 10X, 40X, 100X (inmersión), además cuenta con una interfase electrónica (Motic® Camera MCI001/2001) que permite visualizar las observaciones en computadora mediante el uso de software Motic® Images Plus Versión 2.0 ML elaborado por Motic® China Group Co. (China).

1.3 Equipo para Biología Molecular

1.3.1. Termociclador

Las reacciones de PCR se realizaron en un Termociclador modelo PTC – 100 de Peltier ThermalCycler, MJ Research Inc., USA.

1.3.2. Espectrofotometro UV – Visible: Nanodrop 2000

Para medir la cantidad y calidad del ADN se utilizó un espectrofotómetro de tipo Biospec Nano (Shimadzu, Japan). Este equipo permitió leer la concentración de ADN a 260 nm, y 260/280 nm para el contenido de ácidos nucleicos/ proteínas y 260/230 nm para ácidos nucleicos/inhibidores.

1.3.3. Cuba de electroforesis para DGGE

Para realizar la DGGE, se utilizó una cuba de electroforesis (Bio – Rad Dcode System, USA), precalentada a una temperatura de 60 °C.

1.3.4. Transiluminador UV

Se utilizó un Transiluminador UV (Gel Smart 7.3 System) a 318 nm para revelar los productos de PCR y las bandas en DGGE.

2. Métodos

2.1. Muestreo

Se tomaron muestras de los granos de cacao durante el procesamiento postcosecha. Para el seguimiento de la fermentación, se tomaron 500 g (200 g para Biología Molecular, 100 g para Microbiología tradicional y el resto para los extractos para HPLC) de cada una de las modalidades de fermentación (Cajones Estáticos: CE, Cajones Removibles: CR, Tambor Rotatorio: TR), cada 24 horas a partir de que se realizó el quiebre de la mazorca.

Para la etapa de secado, se siguió la misma metodología utilizada para la fermentación, se tomaron 500 g (200 g para Biología Molecular, 100 g para Microbiología tradicional y el resto para los extractos para HPLC) de cada una de las modalidades de secado (Directo al Sol: DS, Samoas: SM, Zarandas Protegidas: ZP), cada 24 horas a partir de que se terminó la fermentación.

Para la etapa de Almacenamiento se siguió la misma metodología anterior, haciendo hincapié en los dos tipos de empaque que se utilizan: sacos de yute y sacos de polipropileno.

A continuación se detalla con mayor precisión la estrategia de muestreo realizada en la temporada diciembre 2016.

CLASIFICACIÓN DE LA MUESTRA						
ORIGEN	NÚMERO	ORIGEN	ETAPA	MODALIDAD	TIEMPO (DÍAS)	
TEAPA	1	A	F	CE	2.5	
	2	A	F	CE	3.5	
	3	A	F	CE	4.5	
	4	A	F	CE	5.5	
	5	A	S	ZP	3	
	6	A	S	ZP	6	
	7	A	S	DS	11.5	
	8	A	A	SY	5	
	9	A	A	SY	20	
HUIMANGU ILLO	10	B	F	CR	1	
	11	B	F	CR	3	
	12	B	F	CR	5	
	13	B	F	CR	7	
	14	B	S	SM	5	
	15	B	S	SM	7	
	16	B	Sb	SM	7	
CÁRDENAS	17	C	Af	SP	1	
	18	C	A	SP	30	
	19	C	A	SP	60	
	20	C	A	SY	25	
	21	C	A	SY	40	
COMALCALCO	22	D	Sb	SM	2	
	23	D	Al	SY	8	
	24	D	Al	SY	15	
	25	D	Ab	SY	15	
	26	D	Af	SY	15	
COSTA DE COMAL CALCO (SERRA)	27	E	F	CE	1	
	28	E	F	CE	4	
	29	E	F	CE	5	
	30	E	S	SM	6h	
	31	E	Af	SP	2	
	32	E	Ab	SY	8	
	33	E	Af	SY	15	
CUNDU ACÁN	34	F	F	TR	1	
	35	F	F	TR	5	
	36	F	F	TR	7	
	37	F	S	SM	1	

	CONTINUACIÓN				
	NÚMERO	ORIGEN	ETAPA	MODALIDAD	TIEMPO (DÍAS)
	38	F	S	SM	2
E. ZAPATA, ALDAMA	39	G	F	CE	1
	40	H	S	DS	1
	41	H	S	DS	2
	42	H	AI	SP	60

Tabla 4: Estrategia de muestreo del grano de cacao y clasificación de las muestras por origen, etapa, modalidad y tiempo.

A	FINCA AGROFLORESTA, TEAPA	F	ETAPA DE FERMENTACIÓN DEL GRANO DE CACAO
B	FINCA ALAPCH, HUIMANGUILLO	S	ETAPA DE SECADO DEL GRANO DE CACAO
C	UNIÓN DE PRODUCTORES DE CACAO, CARDENAS	A	ETAPA DE ALMACENAMIENTO DEL GRANO DE CACAO
D	CACAO DEL SURESTE, COMACALCO	CE	MODALIDAD DE FERMENTACIÓN POR CAJONES ESTÁTICOS
E	ASOCIACIONES AGROINDUSTRIALES SERRANAS, COMACALCO	CR	MODALIDAD DE FERMENTACIÓN POR CAJONES REMOVIBLES
F	PRODUCTOR MINORITARIO, CUNDUACÁN (SERRANAS)	TR	MODALIDAD DE FERMENTACIÓN POR TAMBOR ROTATORIO
G	COOPERATIVA DE PRODUCTORES DE CACAO, EMILIANO ZAPATA	DS	MODALIDAD DE SECADO DIRECTO AL SOL (PATIO)
H	PRODUCTOR MINONITARIO, ÁLDAMA	SM	MODALIDAD DE SECADO POR SAMOAS
		ZP	MODALIDAD DE SECADO POR ZARANDAS PROTEGIDAS
		SY	ALMACENAMIENTO DEL GRANO EN SACOS DE YUTE
		SP	ALMACENAMIENTO DEL GRANO EN SACOS DE POLIPROPILENO
		AI	ALMACENAMIENTO DEL GRANO DE CACAO LAVADO
		Af	ALMACENAMIENTO DEL GRANO DE CACAO FERMENTADO
		Ab	ALMACENAMIENTO DEL GRANO DE CACAO BENEFICIADO

2.2. Técnicas Microbiológicas.

2.2.1. Aislamiento y numeración de hongos filamentosos toxigénicos

Con el propósito de aislar a los hongos presentes en el cacao, los granos fueron fragmentados en cuatro partículas de tamaño homogéneo con ayuda de un bisturí estéril y depositados directamente sobre el medio de cultivo Dicloran – Glicerol 18 % (DG18) desarrollado específicamente para el aislamiento y la numeración de hongos xerófilos presentes en productos alimenticios almacenados. Se incubaron durante 7 días a una temperatura entre 25 y 28 °C.

Se observó a las primeras 24 h y después cada 24 h a partir del cuarto día de haber realizado la siembra de las partículas. Al término de los días de incubación, el porcentaje de infección se reportó de acuerdo al número de partículas que presenten contaminación por hongos, y a la vez, los que eran toxigénicos.

En general, este método facilitó la detección de hifas que están presentes en el grano y no únicamente las esporas de la superficie.

2.2.3. Porcentaje de infección total

El porcentaje de infección total se determinó mediante inspecciones visuales, considerando como grano infectado aquel que presentaba crecimiento de algún tipo de hongo, sin importar si era o no, toxigénico.

$$\% \text{ De infección hongos toxigenicos} = \frac{C}{B} \times 100$$

Ecuación 1: Porcentaje de Infección Total

Donde:

B= No. De partículas infectadas.

C= No. De partículas infectadas por hongos toxigénicos

2.2.3. Claves taxonómicas

De acuerdo a las claves taxonómicas de Samson (1992) y Pitt (2000), 20 presuntas cepas toxigénicas fueron seleccionadas por su incidencia y representatividad del procesamiento postcosecha del cacao. Estas fueron aisladas y estudiadas de manera particular sobre agar extracto de malta (MEA) y en Agar Czapek Extracto de Levadura (CYA) siguiendo la presente metodología:

De las partículas infectadas del grano de cacao identificadas en el protocolo del porcentaje de infección total por hongos, y con ayuda de un estereoscopio se ubicaron y numeraron las colonias de hongos a aislar. Se tomaron con la punta de una asa estéril las conidias de una colonia de hongo puro. Se colocó en el centro de una caja de Petri con medio de cultivo, MEA y/o CYA, y se incubó a 25° C durante 7 días. Se realizaron observaciones cada 24 horas después del crecimiento del hongo aislado y se reportó las características taxonómicas.

Posteriormente, se analizó la capacidad de dichas cepas como productoras de OTA y AFB1, y fueron caracterizadas molecularmente.

2.2.4. Pruebas presuntivas para hongos aflatoxigénicos

Con el propósito de identificar las muestras del grano de cacao que contenían contaminación por hongos aflatoxigénicos, se realizó el siguiente protocolo.

Se Procesaron las muestras de grano de cacao en una incubadora usando 40 g de la muestra, puestas en un frasco estéril, con 200 ml de agua peptonada estéril al 0,1 %. Se agitó periódicamente durante 30 minutos a 150 RPM. Se tomó y diluyó la muestra lavada en tubos de ensayo como 1:10, 1:20 y 1:40 en agua de peptona estéril al 0,1%. Después se tomó de la superficie 0,1 ml de cada dilución y se agregó a la placa de medio Agar *Aspergillus Flavus* y *Parasiticus* (AFPA). Se dispersó por todo el medio la alícuota tomada, utilizando una varilla de vidrio en forma de L, en una campana de flujo laminar. Se Incubó a 30 ° C y se examinó después de 42 a 43 horas, observando y contando todas las colonias \pm que mostraron en el reverso pigmentación amarilla / naranja. Por último, se reportó los resultados como un número de colonias de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* por gramo de muestra de grano de cacao.

Como notas importantes se tuvo que, *Aspergillus oryzae* puede producir la misma pigmentación amarilla / naranja, y es importante en la producción de alimentos fermentados asiáticos, particularmente la salsa de soja, y es raramente aislado de otras fuentes. *Aspergillus niger* produce colonias de tamaño y textura similares a *Aspergillus flavus* a 30 ° C; sin embargo, en el reverso las colonias pueden aparecer amarillo pálido pero nunca será amarillo / naranja. Después de 43 horas o más de incubación, las colonias de *Aspergillus niger* permanecen de color amarillo pálido pero comienzan la producción de cabezas de conidios negras que permite una clara diferenciación a partir de *Aspergillus flavus*.

También, se consideró que los hongos y mohos que crecen en este medio pueden producir micotoxinas, por lo tanto, se tomaron las precauciones normales para evitar la diseminación de la infección, como la manipulación cuidadosa de las placas y su eliminación de manera segura. Esta precaución también se aplicaría a las muestras positivas de alimentos.

2.3. Técnicas Analíticas: Extracción y purificación de micotoxinas (OTA, AFB1) del grano de cacao

2.3.1. Extracción de OTA del grano de cacao

Las muestras de cacao (de las diferentes modalidades de fermentación, secado y almacenamiento) fueron congeladas a -80°C , posteriormente se molieron 100g con ayuda de un molino (Laboratory Mill 3600, Perten).

Se tomaron 50g de muestra molida y se colocaron en una licuadora con 200ml de solvente de extracción (acetonitrilo / H_2O , 60:40) y 4 g de NaCl, todo se licuó por 2 min a velocidad máxima.

Se transfirieron 48 mL a un tubo falcon y se centrifugaron a 6000 rpm por 10 min en una centrifuga Modelo 2K15 (Sigma, Alemania).

2.3.2. Purificación de OTA extraída del grano de cacao

Para la purificación, se tomaron 4mL del sobrenadante (fase acuosa) del extracto obtenido y se mezclaron con una solución previamente preparada de 44 mL de tampón fosfato (PBS) y 48 μL de Tween 20, con la finalidad de obtener una emulsión y a un pH de 7.3, el cual es ideal para que los anticuerpos reconozcan la OTA y la AFB1.

El fundamento de la columna de purificación se basa en el reconocimiento del antígeno en este caso, ocratoxina A y el de aflatoxina B1, por los anticuerpos contenidos en la columna. Ambas columnas de inmunoafinidad (Ochraprep® y Afla prep®, R-Biopharm, France) contienen una suspensión en gel de anticuerpos monoclonales específicos para cada una de las toxinas.

La columna se acondicionó con 10 mL de PBS e inmediatamente después se agregó la solución con el extracto y el flujo de salida se ajustó a una velocidad de 1gota/s sobre la columna.

La micotoxina (OTA) contenida en los extractos se fijó en la columna de inmunoafinidad por los anticuerpos, una vez que terminó de pasar el extracto por la columna, se lavó 2 veces con 10 mL de PBS en cada lavado, con la finalidad de eliminar aquellos compuestos provenientes del sustrato y ajenos a los anticuerpos.

La columna se eluyó una primera vez con 2 mL de metanol (grado HPLC) con una velocidad de 1gota/s, después se agregó 1 mL más de metanol a la misma velocidad, una vez que el último mililitro de metanol empezó a atravesar la columna se hizo un “backflash” con una jeringa, aspirando el metanol por la columna de inmunoafinidad en sentido inverso y después se dejó pasar normalmente, hasta que terminó de caer la última gota. La solución eluída se recuperó en un vial ámbar y se secó a 70°C con una corriente de nitrógeno. El residuo se resuspendió en 1 mL de la solución de fase móvil (H₂O/acetonitrilo/ácido acético, 51:48:1) en el mismo vial, finalmente se analizó por HPLC.

2.3.3. Extracción de Aflatoxinas del grano de cacao

La finalidad de la extracción y purificación de la toxina presente en el grano de cacao, producida por el género de hongo *Aspergillus*, es la cuantificación de la Aflatoxina B₁, que está clasificada como 1A por la IARC, como un carcinógeno para los humanos.

Para la extracción de las aflatoxinas se realizó la recolección de la muestra que llevando a cabo técnicas de muestreo aceptadas. La muestra de cacao (fermentado, seco o almacenado) se debe congelar a – 80°C, cuando menos 24 h antes de haber sido procesadas. Posteriormente, se trituraron 100 g de la muestra con la ayuda de una licuadora a velocidad máxima por 2 min, o utilizando un molino, de manera que al menos el 75 % del material triturado pasara a través de un tamiz de malla 20. El tamaño de partículas fue como las de un instantáneo de grano fino. Se almacenó la muestra molida a 2 – 8 °C, por al menos 12 h.

Se tomaron 50 g de la muestra triturada y se colocaron en una licuadora. Se adicionaron 250 mL de solución de extracción (MeOH/H₂O, 70:30, por cada 100 mL de solución, 70 mL de metanol grado reactivo y 30 mL de agua destilada miliQ). Se licuó todo el contenido, por 1 min a velocidad máxima. Se filtró el extracto, vertiendo al menos 5 mL a través de un filtro Whatman No. 1, utilizando una bomba para generar vacío y promover el filtrado. Se reservó el extracto filtrado obtenido, hasta su purificación.

2.4. Purificación y Cuantificación de Aflatoxinas extraídas del grano de cacao por ELISA

Para la purificación de las Aflatoxinas extraídas del grano de cacao se usó la metodología expuesta por un KIT VERATOX FOR AFLATOXIN QUANTITATIVE TEST, que consiste en lo siguiente:

Primeramente, se retiró un micropocillo de mezclar marcado con rojo por cada muestra que se analizó y otro para el duplicado de la misma, más 4 micropocillos marcados de color rojo para los controles (estándares de la toxina) y se colocaron en el estante para micropocillos. Se retiró la misma cantidad de micropocillos revestidos de anticuerpo (transparentes), y se marcaron en un extremo de la tira reactiva con “1” y se colocaron en el estante para micropocillos con el extremo marcado a la izquierda, cuidando de no tocar o marcar el interior ni el fondo de los micropocillos. A continuación, se mezcló cada reactivo agitando enérgicamente el frasco antes de utilizarlo. Se vertieron 100 µL del conjugado procedente del frasco con etiqueta azul en cada micropocillo de mezclar marcado con rojo. Utilizando una nueva punta de pipeta para cada uno, se transfirieron 100 µL de controles y muestras de extracción, a los micropocillos de mezclar marcados en rojo como se describe a continuación:

C0	C5	C15	C50	M1R	M1D	M2R	M2D	M3R	M3D	M4R	M4D	TIRA 1
M5R	M5D	M6R	M6D	M7R	M7D	M8R	M8D	M9R	M9D	M10R	M10D	TIRA 2

Nomenclatura. C0: Control 0, C5: Control 5, etc. M1R: Muestra 1 Real, M1D: Muestra 1 Duplicado, etc.

Utilizando una pipeta de 12 canales, se mezcló el líquido de los 12 micropocillos pipeteándolo hacia arriba y hacia abajo tres veces. Se transfirieron 100 µL a los micropocillos revestidos de anticuerpo. Se desecharon los micropocillos de mezclar marcados en rojo. Se fijó el cronometro en 2 minutos y se mezclaron los micropocillos durante los primeros 20 segundos de las incubaciones, a temperatura ambiente, para ello, se deslizaron por el estante para micropocillos hacia atrás y hacia adelante sobre una superficie plana, cuidando de no salpicar o derramar los reactivos contenidos en los micropocillos. Se sacudieron los micropocillos con anticuerpos para vaciar su contenido y se llenaron los

micropocillos con agua destilada o desionizada y se vació el contenido, provocando un enjuague, repitiendo este paso, por 5 veces. Se invirtieron los micropocillos y se golpearon ligeramente sobre una toalla de papel absorbente, hasta que se extrajo toda el agua restante. Se vertió el volumen necesario de sustrato procedente del frasco con etiqueta verde en la cubeta de reactivo con etiqueta verde. Utilizando una pipeta de 12 canales con puntas nuevas, se cebó y pipeteó 100 μ L de sustrato en los micropocillos. Se fijó el cronometro en 3 minutos y se mezclaron los micropocillos durante 10 – 20 minutos deslizando el estante para micropocillos hacia atrás y hacia adelante sobre una superficie plana. Se desechó el sustrato restante y se enjuagó la cubeta de reactivo con agua destilada o desionizada. Se vertió la solución detenedora Red Stop procedente del frasco con etiqueta roja en el bote de reactivo con etiqueta roja. Se expulsó el sustrato sobrante de la pipeta de 12 canales, cebando las puntas y pipeteando 100 μ L de solución detenedora **Red Stop** en cada micropocillo. Se mezclaron deslizándolos hacia atrás y hacia adelante sobre una superficie plana. Se desecharon las puntas y se pasó una toalla seca por el exterior de los micropocillos.

Para la cuantificación de las aflatoxinas se eliminaron las burbujas de aire de cada pocillo, y se leyeron utilizando un lector de micropocillos Stat Fax de Neogen, con un filtro de 650 nm. Se calcularon los resultados con un software Veratox de Neogen, instalado en el equipo.

2.4. Cuantificación de OTA por HPLC: Condiciones de operación

La cuantificación de OTA en los extractos purificados fue hecha por HPLC con detector fluororimétrico (Shimadzu LC-10 ADVP, Japan) (Nakajima *et al.*, 1997). Las condiciones de operación fueron las siguientes: volumen de inyección de 100 μ L, columna C18 en fase reversa, ODS de 1 a 5 μ m, con un termostato a 35°C, flujo isocrático de 1mL/min (fase móvil: H₂O/ acetonitrilo/ácido acético, 51:48:1), longitud de onda de excitación de 333 nm y de emisión de 460 nm. Los contenidos fueron calculados a partir de una curva de calibración elaborada a partir de un estándar de OTA (1 μ g/mL; ref. PD 226 R. Biopharm Rhone Ltd., Glasgow, UK).

2.5. Técnicas de Biología Molecular

2.5.1. Acondicionamiento de las muestras para la extracción de DNA

Esta técnica tiene como propósito recuperar los microorganismos presentes en la superficie de las muestras de grano de cacao y mazorcas.

Se depositaron 20 g de cacao en un tubo falcon y se agregaron 20 ml de agua peptonada 1%, estos colocaron en una incubadora a 20°C con agitación media durante 1 hora.

2.5.2. Protocolo de extracción de DNA del grano de cacao

Para la extracción de DNA de levaduras y hongos, El Sheikha *et al.*, (2009, 2010) crearon un protocolo modificado a partir de los métodos de Masoud *et al.*, (2004) y Ros Chumillas *et al.*, (2007), quienes optimizaron la extracción de ADN a partir de levaduras, y de Karakousis *et al.* (2006) quienes trabajaron sobre la extracción de ADN de hongos.

Se tomaron 2 ml de la solución de lavado de granos de cacao y mazorcas (o de suspensión de esporas cosechadas de medios de cultivo) y se colocaron en un tubo eppendorf de 2 ml con 0.3 g de perlas de vidrio de 425 a 600 μ m de diámetro (SIGMA), se utilizaron dos series de tubos marcados como A y B. Se agitaron en vórtex durante 30 min a velocidad máxima. Se centrifugó a 12000 x g, durante 15 min, se tiró el sobrenadante y se resuspendió el residuo en 300 μ L de Tampón de Lisis (2% Tritón X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA pH 8) y se agitó manualmente.

Se agregaron 100 μ L de TE (10mM). Se adicionaron 100 μ L de lisozima (25 mg/ml) y posterior a esto se adicionaron 100 μ L de proteinasa K (20 mg/ml) en cada solución añadida se realizó una agitación manual.

Esta mezcla se incubó a 42°C durante 30 min. Después se adicionaron 50 μ l de SDS 20% (Sodio dodecil sulfato) y nuevamente se incubó a 42°C por 10 min después de una agitación manual.

Se agregaron 400 μ L de MATAB (Sigma, France) 2% NaCl 3M al tubo y se incubó a 65°C durante 10 min. 700 μ L de una mezcla de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:21, v/v/v) fueron agregados y los tubos se agitaron manualmente para luego ser centrifugados a 12 000 x G durante 15 min. La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo eppendorf. La etapa de lavado con la mezcla fenol/cloroformo/alcohol isoamílico se repitió una vez más.

El fenol residual fue eliminado con 600 μ L de una mezcla de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) y una posterior centrifugación durante 15 min a 12 000 x g.

La fase acuosa se recuperó y el ADN se precipitó agregando 30 μ L de acetato de sodio 3M pH5 e inmediatamente se agregó un volumen de Isopropanol frío (-20°C).

Los tubos se guardaron en congelación durante 12h (toda la noche). Al otro día se centrifugaron los tubos a 12000 x g durante 15 min y se eliminó el sobrenadante.

Se adicionó un volumen de 500 μ l de etanol al 70% y se centrifugó a 12 000 x g durante 10 min. Finalmente se eliminó la fase acuosa y se dejó secar el pellet depositado en el fondo del tubo a temperatura ambiente (2-3h).

Al finalizar esta etapa se agregaron 50 μ L de agua ultra pura (molecular) para resuspender el pellet, se dejó solubilizar durante 3 h y se conservó en el congelador a -20°C hasta su análisis. Se verificó el ADN en gel de agarosa 0.8% y ADN leader 1Kb. El ensayo se llevó a cabo por duplicado para cada muestra.

2.5.3. Verificación de DNA en gel de agarosa

La cantidad y la pureza de extractos de ADN fueron estimados por electroforesis en gel de agarosa (Promega, France) a 0.8% (p/v) en una solución TAE 1X (Eppendorf, Alemania).

Se tomaron 5µl del extracto de ADN de cada muestra y se mezclaron con 2 µl de una solución del colorante Blue/Orange (Promega, France), la mezcla se depositó en los pozos del gel de agarosa. Se utilizó un marcador de talla molecular de 1kb (Invitrogen, USA) La migración duró de 45 min a 1 hora con una tensión de 100V.

El gel de agarosa se sumergió inmediatamente en una solución de bromuro de etidio (Promega, France) a 0.1µg/ml durante 15 min, después se sumergió en agua destilada durante 10 min, para retirar los residuos de bromuro de etidio. Posteriormente se observó en un trans-iluminador UV a 318 nm. El gel fue fotografiado por una cámara digital dirigida por el programa Image Lab 4.

2.5.4. Verificación por espectrofotómetro UV – Visible

La cuantificación y la pureza del ADN extraído, fueron estimadas en un espectrofotómetro UV-visible de tipo Biospec Nano (Shimadzu, Japón). Este equipo permite observar la relación de contenidos entre ácidos nucleicos y proteínas que idealmente debe ser entre 1.8 y 2, valores superiores a 2 representa una contaminación por ARN e inferiores a 1.8, un contenido elevado de proteínas.

Para efectuar la lectura en este equipo se requieren 2µL del extracto de ADN, cabe mencionar que previamente el equipo debe ser calibrado con agua ultrapura de grado biología molecular, libre de ácidos nucleicos u otros contaminantes.

2.5.5. Amplificación por PCR acoplada a un análisis por DGGE

Para la técnica DGGE, se agregó una GC – clamp de 30 nucleótidos al extremo 5' de uno de los primers para asegurar que el fragmento de ADN no sea totalmente separado durante la migración (Sheffield *et al.*, 1989).

2.5.5.1. Primers utilizados

El par de primers utilizados para la PCR-DGGE fueron GC-U1f y U2r. El primer U1 corresponde de 403 a 422, y el primer U2 corresponde de 645 a 662 de

un ADNr de referencia del gen del ARN 28S de *S. cerevisiae* (J01355 GenBank). Este par de primers dan un amplicón de 260 pb.

2.5.7. Mezcla de reactivos para PCR

La amplificación por PCR se realizó en una placa de 96 pozos Sorenson TM (BioScience, USA). Para el ADN de hongos la mezcla de reactivos fue preparada como lo describió El Sheikha y Montet (2011). Se utilizó TopTaq en lugar de ATaq, y además, se utilizó una solución de MgCl₂.

2.5.8. Condiciones PCR

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un Termociclador PTC-100 (Peltier Thermal Cycler, MJ Research Inc., USA).

La amplificación por PCR fue realizada de acuerdo a los métodos de El Sheikha y Montet (2011). Una desnaturalización inicial a 94°C durante 3 min, después 30 ciclos con una desnaturalización a 94°C por 45 s, una hibridación a 50°C durante 50 s y una elongación a 72°C por 90 s, finalizados los 30 ciclos, una elongación final durante 5 min.

2.5.9. Electroforesis en gel de acrilamida con gradiente desnaturalizante (DGGE)

2.5.9.1. Composición del gel DGGE

Los fragmentos de ADNr amplificados por PCR fueron analizados por DGGE en un gel de acrilamida/bis acrilamida 8% (37.5/1, v/v, Promega, France) con un gradiente desnaturalizante que se extiende de 30% a 60% para el ADN de bacterias (Le Nguyen *et al.*, 2008) y levaduras (El Sheika *et al.*, 2010) y de 40% a 70% para los ADN de hongos (El Sheika y Montet, 2011).

Este gradiente se conforma de urea (Promega, France) y de formamida (Promega, France). 100% corresponde a 7M de urea y 40% de formamida (v/v).

2.5.9.2. Preparación del gel DGGE

Las soluciones A y B fueron preparadas en dos tubos falcon (50 ml) diferentes antes de ser depositados en el compartimento A y B (Figura 14) correspondientes a la preparación del gradiente en un equipo (Bio-Rad Modelo 485, USA) especial para mezclar los componentes de este gel. Una vez preparadas y depositadas las

soluciones en sus respectivos compartimentos, se les agregó 50 µl de per sulfato de

2.5.9.3. Condiciones de electroforesis de la DGGE

La cuba de electroforesis (Bio-Rad Dcode System, USA) fue llenada con TAE 1X (Tris-acetato, EDTA pH 8.3) y precalentada a la temperatura de migración, 60°C (Díez *et al.*, 2001).

El gel DGGE se colocó en la cuba precalentada a 60°C. Previamente se depositaron 10 µL de colorante Blue/Orange (Promega, France) y 30 µL de los productos de PCR con ayuda de una micropipeta.

La electroforesis se realizó primero a 20V durante 10 min y después a 80V durante 12 h para el ADN de bacterias y levaduras y 16h para el ADN de hongos. Después de la migración el gel fue retirado delicadamente de las placas de vidrio y sumergido en una solución de Bromuro de etidio (Promega, France) a 0.1 µl/ml durante 30 min y después fue lavado con TAE 1X durante 20 min. El gel se observó inmediatamente sobre el trans-iluminador UV a 318 nm. Y fue fotografiado por una cámara digital dirigida por el programa Gel Smart 7.3.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Incidencia de hongos filamentosos y toxigénicos en el grano de cacao

Se estudió la presencia de hongos toxigénicos y no toxigénicos, presentes en la superficie de las muestras de granos de cacao de las etapas post-cosecha de cada hacienda o almacén muestreado. Se depositaron sobre placas con medio de cultivo DG18 y PDA, partículas de cacao (el grano se partió en 4 partes) de tamaño homogéneo, y se incubaron a 25 – 28 °C y se observó su evolución durante 5 días.

1.1 Porcentaje de Infección Total por Hongos del grano de cacao (PITH)

A continuación se presentan los resultados del porcentaje de las muestras analizadas y observadas durante 7 días en los diferentes medios de cultivo para hongos filamentosos. Cabe destacar que en el medio PDA hubo una predominancia de las especies de hongos negros, como posibles *Aspergillus carbonarius* o *Aspergillus niger*, y con el medio DG18, se obtuvo un panorama más amplio, al observar especies de *Penicillium*, especies de hongos amarillos, rosas y blancos.

Para mayor organización, los resultados fueron agrupados por etapa del proceso postcosecha del grano de cacao, ya sea, la fermentación, secado y el almacenamiento.

1.1.1. Reporte del PITH de la etapa de fermentación y sus modalidades

CLASIFICACIÓN DE LA MUESTRA					REPORTE		
NÚMERO	ORIGEN	ETAPA	MODALIDAD	TIEMPO (DÍAS)	MEDIO DE CULTIVO	% PITH	PREDOMINANCIA DE GÉNERO DE HONGOS
1	A	F	CE	2.5	PDA	30	Penicillium
1	A	F	CE	2.5	DG18	20	Penicillium
2	A	F	CE	3.5	PDA	88	Aspergillus
2	A	F	CE	3.5	DG18	100	Penicillium
3	A	F	CE	4.5	PDA	30	Aspergillus
3	A	F	CE	4.5	DG18	30	Penicillium
4	A	F	CE	5.5	PDA	90	Aspergillus
4	A	F	CE	5.5	DG18	100	Penicillium
10	B	F	CR	1	PDA	86	Aspergillus
10	B	F	CR	1	DG18	100	Penicillium
11	B	F	CR	3	PDA	54	Aspergillus
11	B	F	CR	3	DG18	100	Penicillium
12	B	F	CR	5	PDA	48	Aspergillus
12	B	F	CR	5	DG18	100	Penicillium
13	B	F	CR	7	PDA	97	Aspergillus
13	B	F	CR	7	DG18	100	Penicillium
27	E	F	CE	1	PDA	88	Aspergillus
28	E	F	CE	4	PDA	24	Aspergillus
29	E	F	CE	5	PDA	96	Aspergillus
34	F	F	TR	1	PDA	24	Aspergillus
35	F	F	TR	5	PDA	8	Penicillium
36	F	F	TR	7	PDA	100	Aspergillus
39	G	F	CE	1	PDA	50	Aspergillus

Tabla 5: Porcentajes de Infección Total por Hongos del grano de cacao de las muestras de fermentación y sus diferentes modalidades.

Dada la diferencia de la predominancia de especies fúngicas entre los medios PDA y DG18, se hizo el análisis correspondiente comparando los porcentajes de infección total del grano de ambos medios. A continuación, se presentan los resultados.

CLASIFICACIÓN DE LA MUESTRA					REPORTE		
NÚMERO	ORIGEN	ETAPA	MODALIDAD	TIEMPO (DÍAS)	PDA	DG18	PREDOMINANCI A DE ESPECIES
1	A	F	CE	2.5	100	13	<i>Penicillum</i>
2	A	F	CE	3.5	88	100	<i>Penicillum</i>
5	A	S	ZP	3	98	58	<i>Penicillum</i>
27	E	F	CE	1	88	0	<i>Penicillum</i>
28	E	F	CE	4	24	16	<i>Penicillum</i>
29	E	F	CE	5	96	16	<i>Penicillum</i>

Tabla 6: Comparación entre la utilización de 2 diferentes medios de cultivo para el crecimiento y aislamiento de hongos.

Se presenta las fotografías de los porcentajes de infección total por hongos en el grano de cacao de las 18 muestras analizadas.

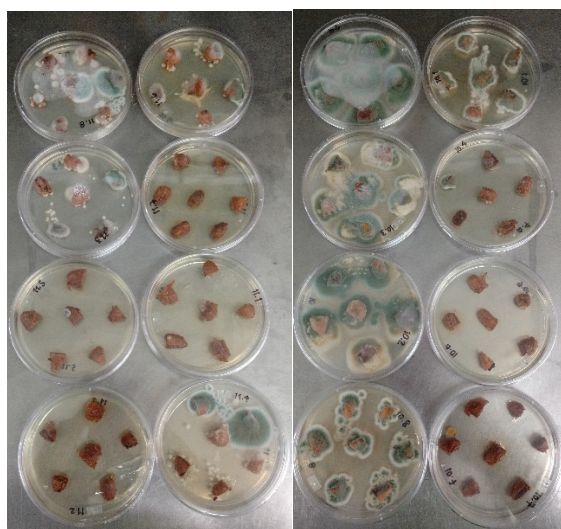


Figura 32: Porcentaje de Infección Total por Hongos de las muestras 10 y 11, de izquierda a derecha, en medio DG18.

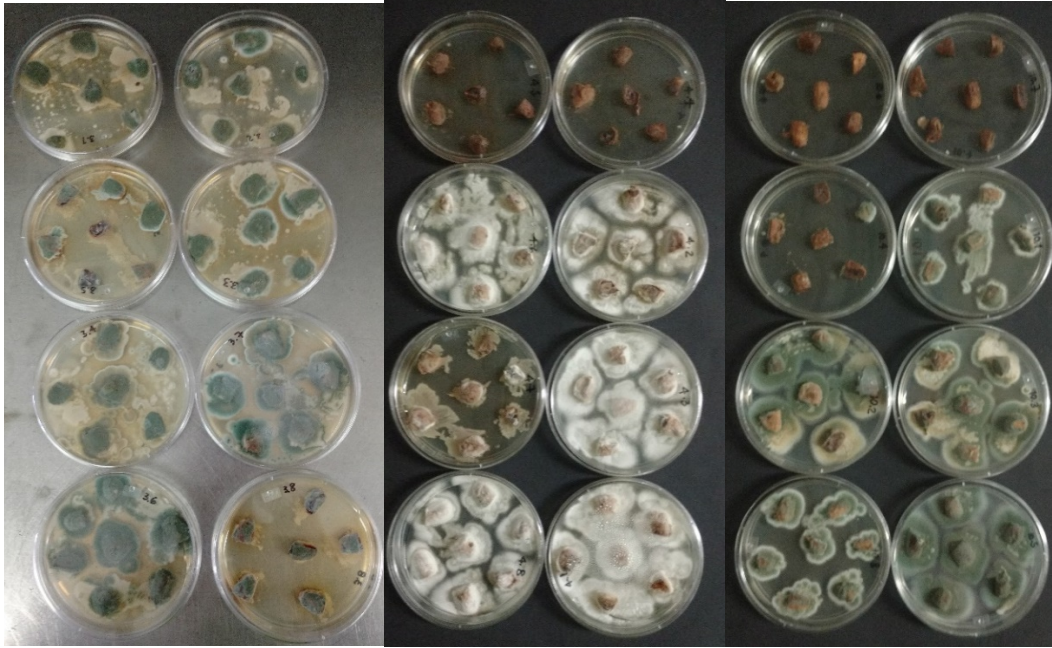


Figura 33: Porcentaje de Infección Total por Hongos de las muestras 3, 4 Y 10, de izquierda a derecha, en medio DG18.

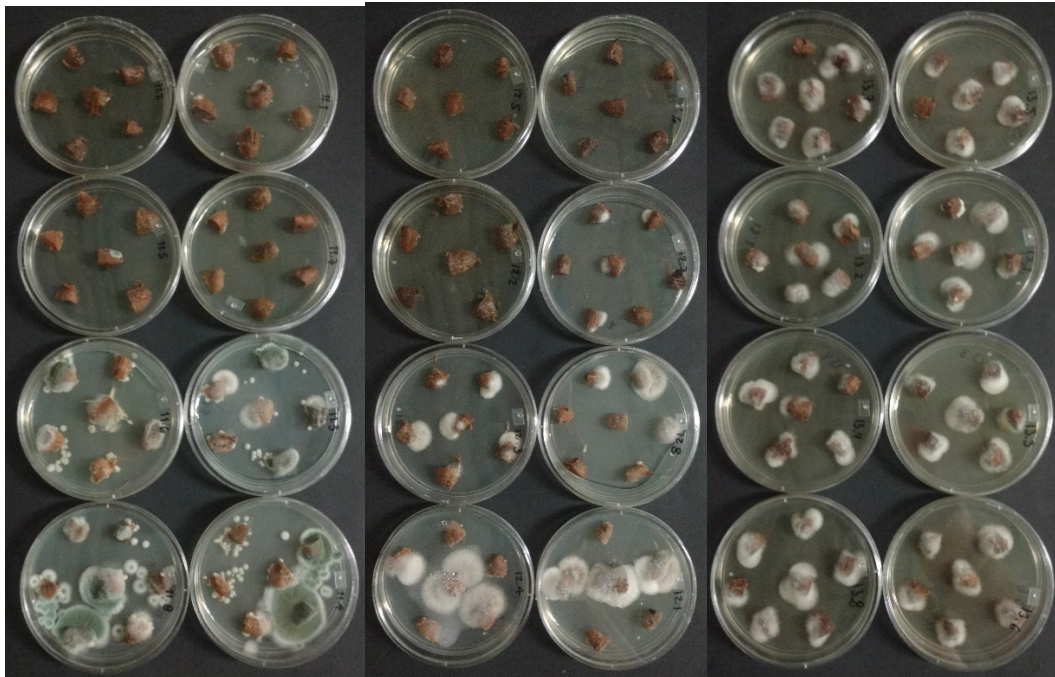


Figura 34: Porcentaje de Infección Total por Hongos de las muestras 11, 12 Y 13, de izquierda a derecha, en medio DG18.

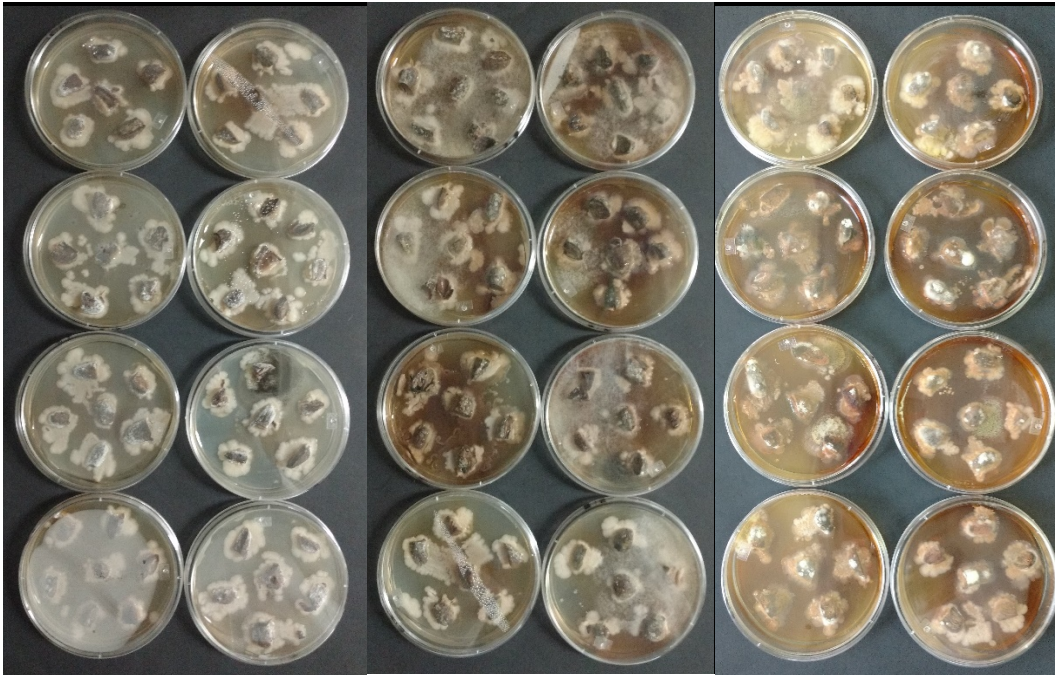


Figura 35: Porcentaje de Infección Total por Hongos de las muestras 1, 2 y 5, de izquierda a derecha, en medio PDA.

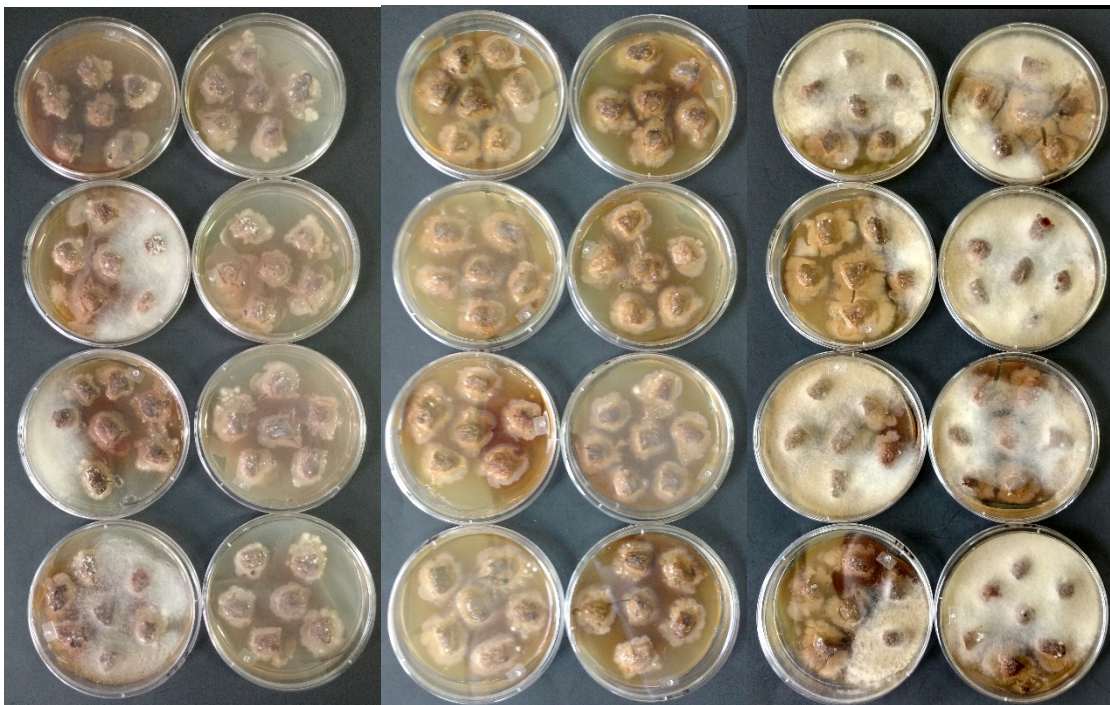


Figura 36: Porcentaje de Infección Total por Hongos de las muestras 27, 28 y 29, de izquierda a derecha, en medio PDA.

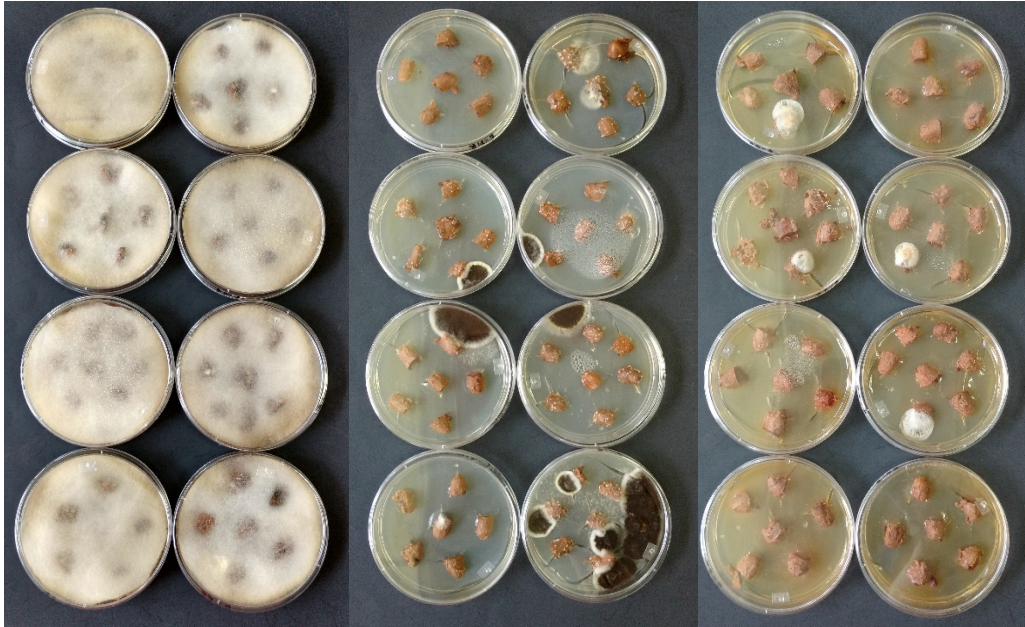


Figura 37: Porcentaje de Infección Total por Hongos de las muestras 33, 34 y 35, de izquierda a derecha, en medio PDA.

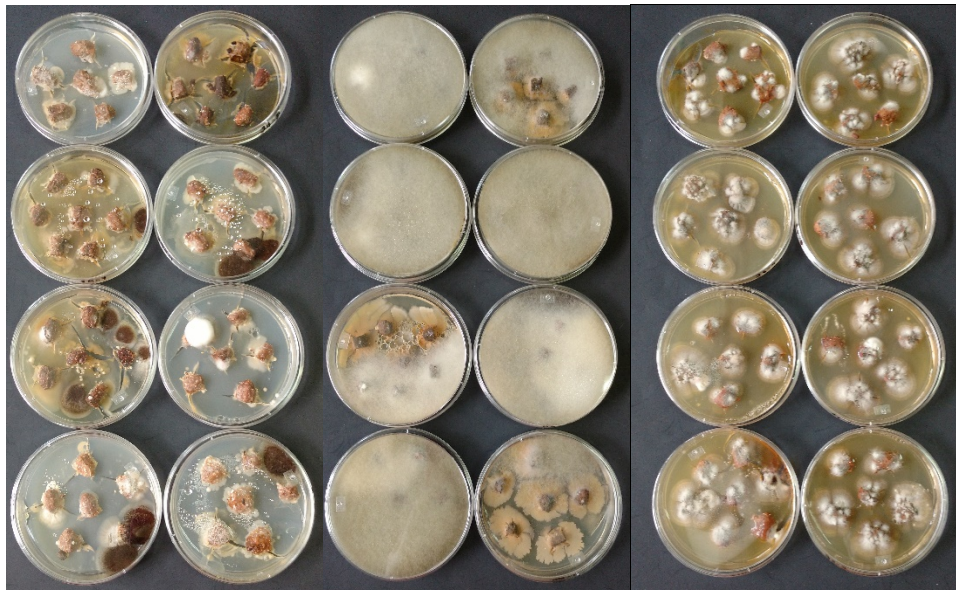


Figura 38: Porcentaje de Infección Total por Hongos de las muestras 36, 39 y 40, de izquierda a derecha, en medio PDA.

La baja incidencia de especies del genero *Aspergillus* durante la fermentación del grano de cacao puede ser atribuida a que durante esta etapa existe la presencia de bacterias ácido lácticas tales como, *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus brevis*,

las cuales se han reportado con la capacidad de inhibir el desarrollo de hongos toxigénicos en cacao (Champion Martínez, 2016), ya sea por competición de nutrientes, o por la producción de metabolitos tales como, ácido propiónico, peróxido de hidrogeno y diacetil (Lindgren y Dobrogosz, 1900), los cuales han sido reportados como compuestos antifúngicos.

Por otro lado, se ha reportado que la presencia de levaduras durante la fermentación del grano de cacao, también son capaces de producir compuestos antifúngicos. Armand *et al.*, (2013), mostraron que ciertas cepas de *S. cerevisiae* disminuyen el crecimiento de *Aspergillus carbonarius* y *Fusarium graminearum* dando como resultado la inhibición de a producción de Ocratoxina A (OTA), Zearalenona y Deoxinivaleol (DON). En otro trabajo *S. cerevisiae* inhibió la incidencia de *A. ochraceus* y *A. niger*, y como consecuencia la contaminación por OTA en el grano de cacao (Velmourougame, 2013).

1.1.2. Reporte del PITH de la etapa de secado y sus modalidades

CLASIFICACIÓN DE LA MUESTRA					REPORTE		
NÚMERO	ORIGEN	ETAPA	MODALIDAD	TIEMPO (DÍAS)	MEDIO DE CULTIVO	% PITH	PREDOMINANCIA DE GÉNERO DE HONGOS
5	A	S	ZP	3	DG18	100	Penicillium
6	A	S	ZP	6	DG18	100	Aspergillus
7	A	S	DS	11.5	DG18	88	Aspergillus
14	B	S	SM	5	DG18	30	Aspergillus
15	B	S	SM	7	DG18	20	Aspergillus
16	B	Sb	SM	7	DG18	100	Aspergillus
22	D	Sb	SM	2	DG18	100	Penicillium
30	E	S	SM	6h	DG18	100	Penicillium
37	F	S	SM	1	DG18	100	Penicillium
38	F	S	SM	2	DG18	80	Penicillium
40	H	S	DS	1	DG18	80	Aspergillus
41	H	S	DS	2	DG18	56	Aspergillus

Tabla 7: Porcentajes de Infección Total por Hongos del grano de cacao de las muestras de SECADO y sus diferentes modalidades.

1.1.3. Reporte del PITH de la etapa de almacenamiento y sus modalidades

CLASIFICACIÓN DE LA MUESTRA					REPORTE		
NÚMERO	ORIGEN	ETAPA	MODALIDAD	TIEMPO (DÍAS)	MEDIO DE CULTIVO	% PITH	PREDOMINANCIA DE GÉNERO DE HONGOS
8	A	A	SY	5	DG18	100	Aspergillus
9	A	A	SY	20	DG18	84	Aspergillus
17	C	Af	SP	1	DG18	84	Aspergillus
18	C	A	SP	30	DG18	60	Aspergillus
19	C	A	SP	60	DG18	36	Aspergillus
20	C	A	SY	25	DG18	100	Aspergillus
21	C	A	SY	40	DG18	96	Aspergillus
23	D	Al	SY	8	DG18	100	Aspergillus
24	D	Al	SY	15	DG18	100	Aspergillus
25	D	Ab	SY	15	DG18	100	Aspergillus
26	D	Af	SY	15	DG18	100	Aspergillus
31	E	Af	SP	2	DG18	64	Aspergillus
32	E	Ab	SY	8	DG18	100	Aspergillus
33	E	Af	SY	15	DG18	100	Aspergillus
42	X	Al	SP	60	DG18	100	Aspergillus

Tabla 8: Porcentajes de Infección Total por Hongos del grano de cacao de las muestras de ALMACENAMIENTO y sus diferentes modalidades.

1.2 Aislamiento e identificación de especies de hongos ocratoxigénicos del grano de cacao

La ocratoxina A (OTA) es una micotoxina ampliamente distribuida en el grano de cacao con una ligera toxicidad frente a humanos y animales.

Después de la realización de las técnicas para la determinación del PITH y las de claves taxonómicas, se identificaron especies productoras de Ocratoxina A que están reportadas en la literatura, y que a continuación se enlistan.

No. CONTROL	CEPA IDENTIFICADA	SECCIÓN	MUESTRA DE AISLAMIENTO	ETAPA Y MODALIDAD
COTA – 001	<i>Aspergillus ochraceus</i>	Circumdati	5	Secado – Zarandas protegidas
COTA – 002	<i>Aspergillus carbonarius</i>	Nigri	8	Almacenamiento – Saco de yute
COTA – 003	<i>Aspergillus carbonarius</i>	Nigri	30	Secado – Samoas
COTA – 004	<i>Aspergillus carbonarius</i>	Nigri	42	Almacenamiento – Saco polipropileno
COTA – 005	<i>Aspergillus niger</i>	Nigri	6	Secado – Zarandas protegidas
COTA – 006	<i>Aspergillus niger</i>	Nigri	21	Almacenamiento – Saco de yute

Tabla 9: Cepas de hongos ocratoxigénicos aislados del grano de cacao

1.2.1. Hongos ocratoxigénicos aislados del grano de cacao, pertenecientes a la sección Circumdati

Dentro del género *Aspergillus*, en la sección Circumdati se encuentran importantes especies ocratoxígenas como *A. ochraceus*, *A. steynii* y *A. westerdijkiae*, algunas de las cuales habían sido poco estudiadas hasta el momento debido a su reciente descripción. En las muestras del grano de cacao de este estudio, solo encontró una cepa perteneciente a esta sección, y que a continuación se detallan sus características, morfología colonial y claves taxonómicas.



Figura 39: Cepa de la sección Circumdati aislada del grano de cacao: *Aspergillus ochraceus*, muestra 5.

No. CONTROL	CEPA IDENTIFICADA	MUESTRA DE AISLAMIENTO	% del PITH en el grano
SAM001	<i>Aspergillus ochraceus</i>	5	10

FOTOGRAFÍA

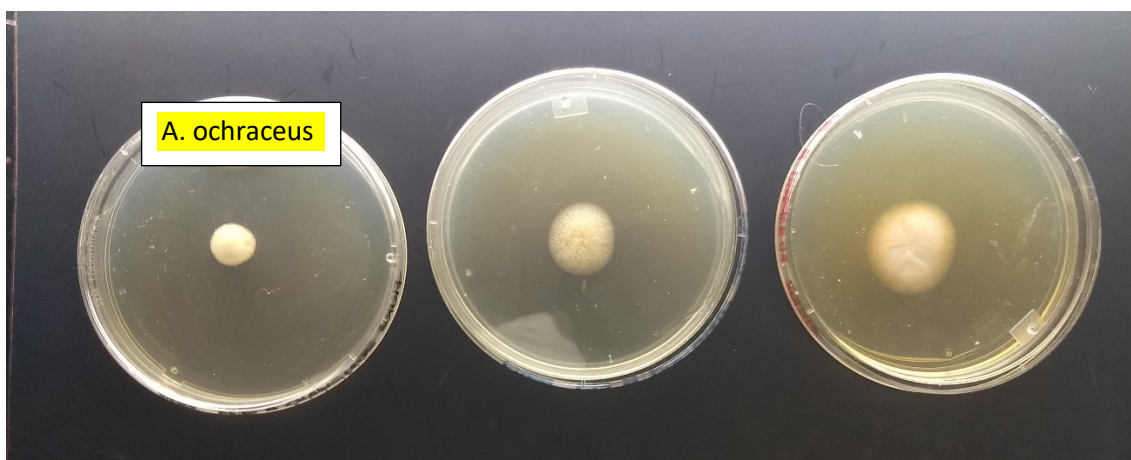
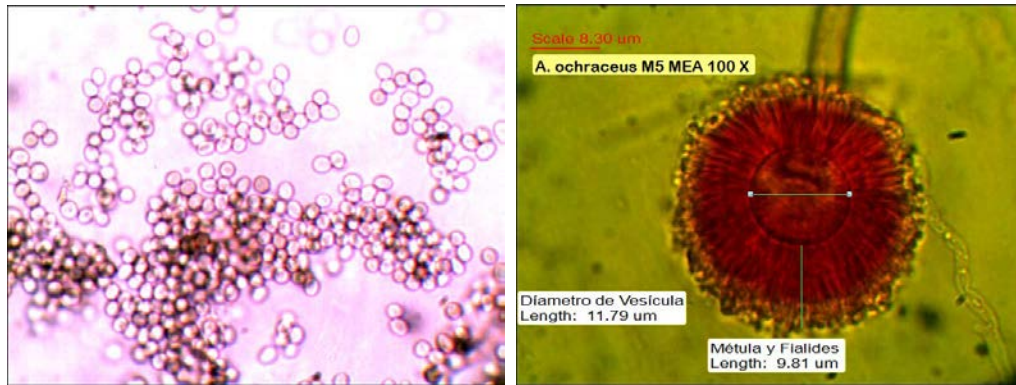


Figura 40: Colonias de *Aspergillus ochraceus*, aisladas del grano de cacao, cultivadas en medios PDA, MEA y CYA (De izquierda a derecha).

Claves taxonómicas: Colonias en PDA a 25 °C a 7 días de incubación con 2.8 cm de diámetro y conidios amarillos. Cabezas conidiales amarillas, globosas a los primeros días y compactadas después del día 5. Presenta esclerocios muy rara vez de color blanco. En MEA, las colonias fueron blancas con destellos amarillos. En CYA, las colonias fueron blancas.

Tabla 10: Descripción de la cepa COTA – 001 aislada del grano de cacao: *Aspergillus ochraceus*, muestra 5.



1.2.2. Hongos ocratoxigénicos aislados del grano de cacao, pertenecientes a la sección Nigri

En otra sección del género *Aspergillus*, sección Nigri, la de los hongos negros, se encuentran importantes especies ocratoxígenas como *A. carbonarius*, y el recientemente agregado, *A. niger*, el cual ha sido poco estudiado hasta el momento debido a su reciente descripción (Castrillo & Horiński, 2013). En las muestras del grano de cacao de este estudio, se encontraron seis cepas pertenecientes a esta sección, y que a continuación se detallan sus características, morfología colonial y claves taxonómicas.

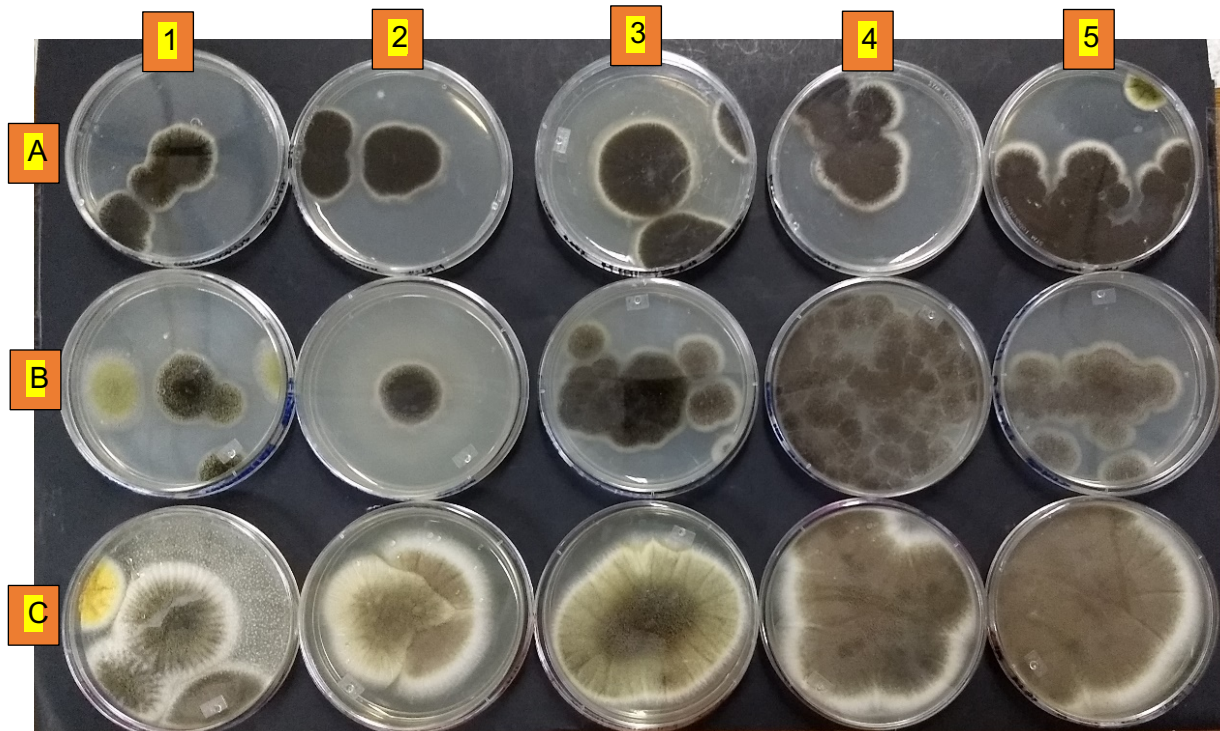


Figura 41: Cepas de hongos de la sección Nigri aislados del grano de cacao.

Descripción: De izquierda a derecha, 1. *A. carbonarius*, muestra 5; 2. *A. carbonarius*, muestra 8; 3. *A. carbonarius*, muestra 30; 4. *A. niger*, muestra 6; 5. *A. niger*, muestra 21. Horizontalmente: A, cepas cultivadas en PDA; B, cepas cultivadas en MEA; C, cepas cultivadas en CYA.

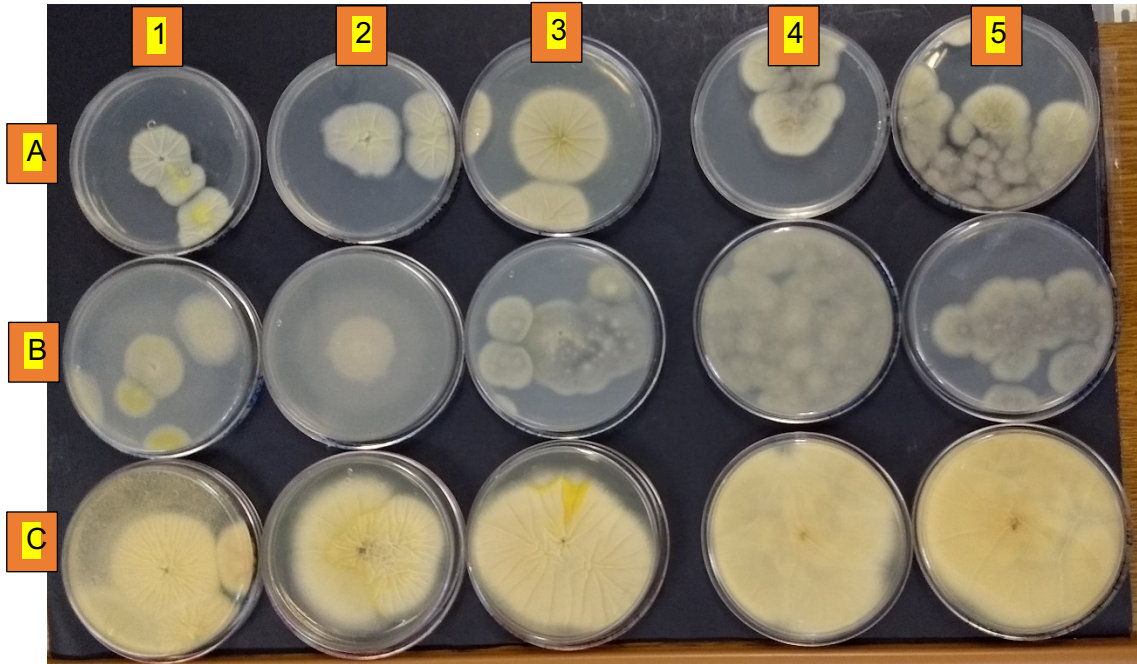


Figura 42: Cepas de hongos de la sección Nigri en el reverso de la colonia.

Descripción: De izquierda a derecha, 1. *A. carbonarius*, muestra 5; 2. *A. carbonarius*, muestra 8; 3. *A. carbonarius*, muestra 30; 4. *A. niger*, muestra 6; 5. *A. niger*, muestra 21. Horizontalmente: A, cepas cultivadas en PDA; B, cepas cultivadas en MEA; C, cepas cultivadas en CYA.

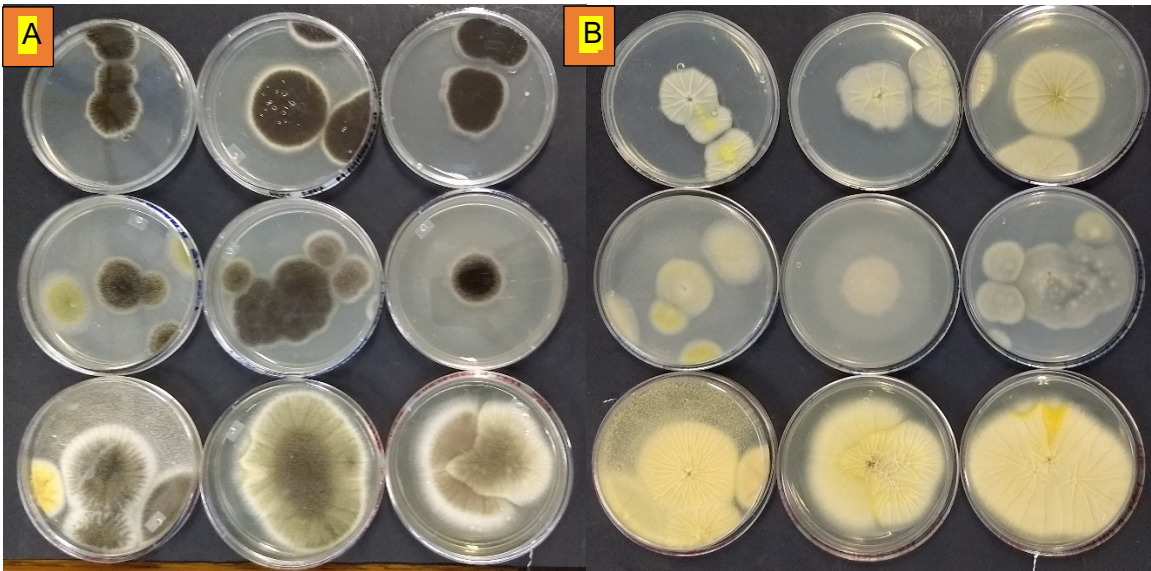


Figura 43: Cepas de *A. carbonarius* aisladas del grano de cacao. Muestras 8, 30 y 42. Fotografía A: colonias observadas al derecho. Fotografía B: colonias observadas al reverso.

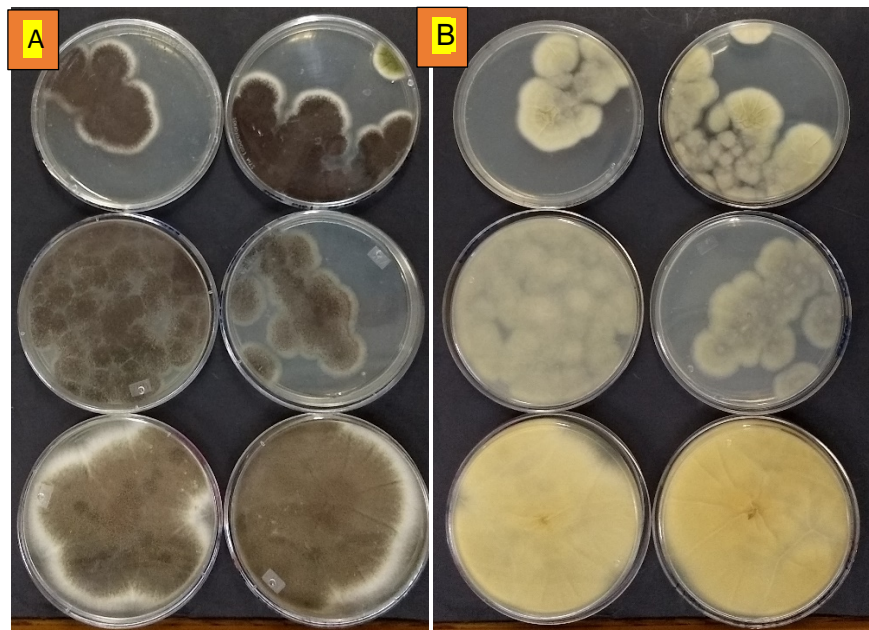


Figura 44: Cepas de *A. niger* aisladas del grano de cacao. Muestras 6 y 21. Fotografía A: colonias observadas al derecho. Fotografía B: colonias observadas al reverso

No. CONTROL	CEPA IDENTIFICADA	MUESTRA DE AISLAMIENTO	% del PITH en el grano
SAM002	<i>Aspergillus carbonarius</i>	8	5

FOTOGRAFÍA

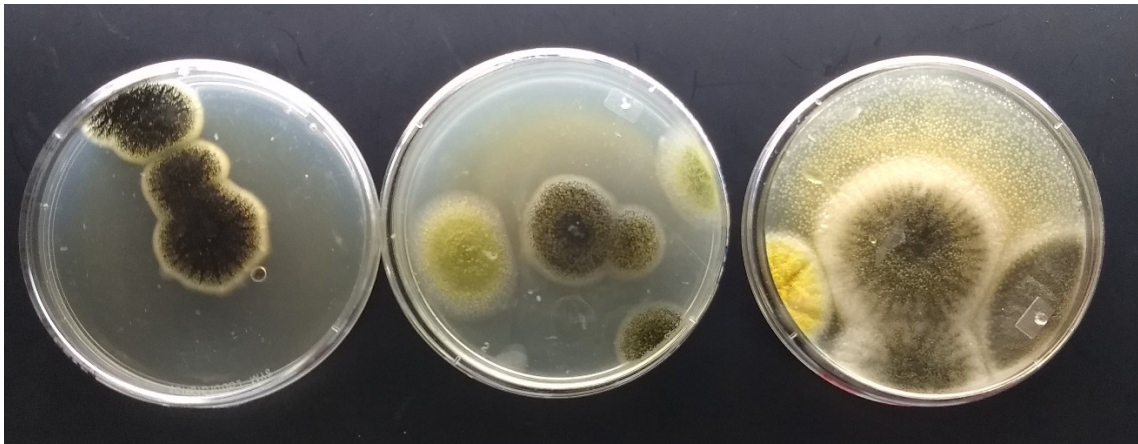


Figura 45: Colonias de *Aspergillus carbonarius*, aisladas del grano de cacao, cultivadas en medios PDA, MEA y CYA (De izquierda a derecha, muestra 8).

Claves taxonómicas: Colonias en PDA a 25 °C a 7 días de incubación con 3.8 cm de diámetro y conidios negros con bordes blancos. Cabezas conidiales negras, globosas a los primeros días y compactadas después del día 4. En MEA, las colonias fueron blancas con codinias negras y umbilicada al centro. En CYA, las colonias fueron blancas septadas, con conidios verdes militar.

No. CONTROL	CEPA IDENTIFICADA	MUESTRA DE AISLAMIENTO	% del PITH en el grano
SAM003	<i>Aspergillus carbonarius</i>	30	10

FOTOGRAFÍA

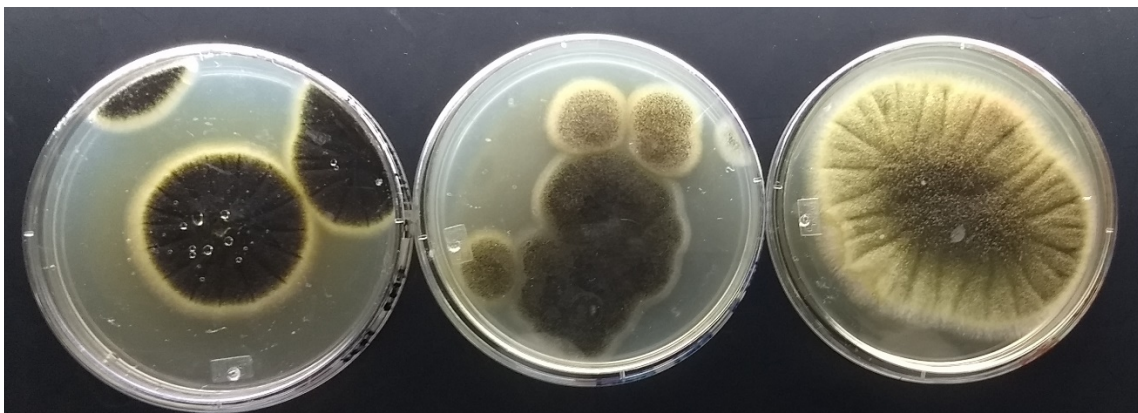


Figura 46: Colonias de *Aspergillus carbonarius*, aisladas del grano de cacao, cultivadas en medios PDA, MEA y CYA (De izquierda a derecha, muestra 30).

No. CONTROL	CEPA IDENTIFICADA	MUESTRA DE AISLAMIENTO	% del PITH en el grano
SAM004	<i>Aspergillus carbonarius</i>	42	30

FOTOGRAFÍA

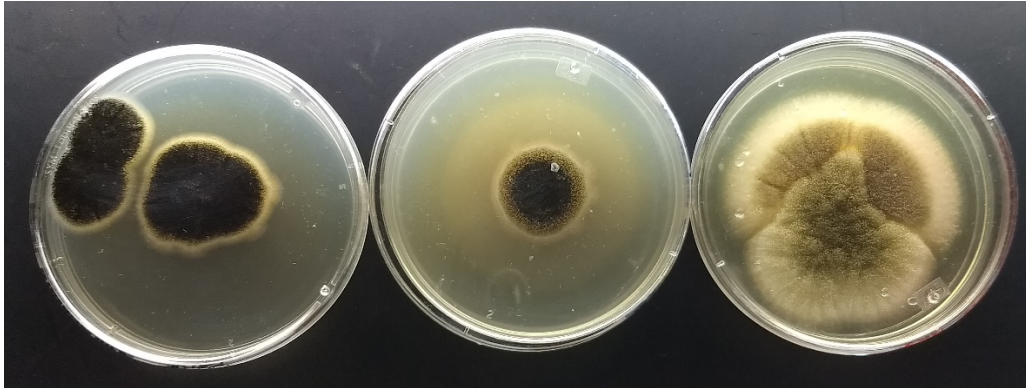
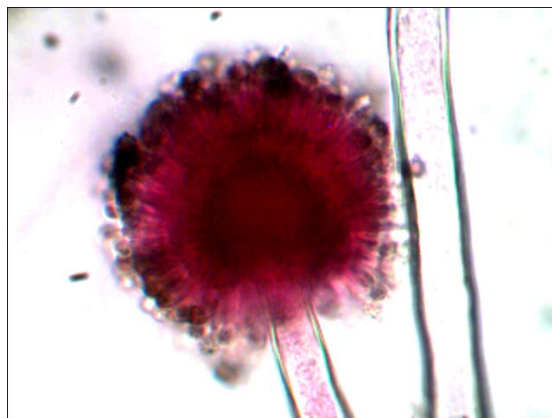
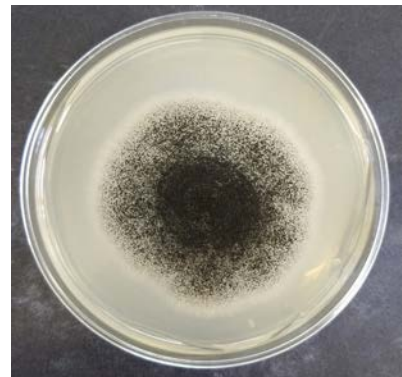


Figura 47: Colonias de *Aspergillus carbonarius*, aisladas del grano de cacao, cultivadas en medios PDA, MEA y CYA (De izquierda a derecha, muestra 42).



Aspergillus niger

No. CONTROL	CEPA IDENTIFICADA	MUESTRA DE AISLAMIENTO	% del PITH en el grano
SAM005	<i>Aspergillus niger</i>	6	5

FOTOGRAFÍA

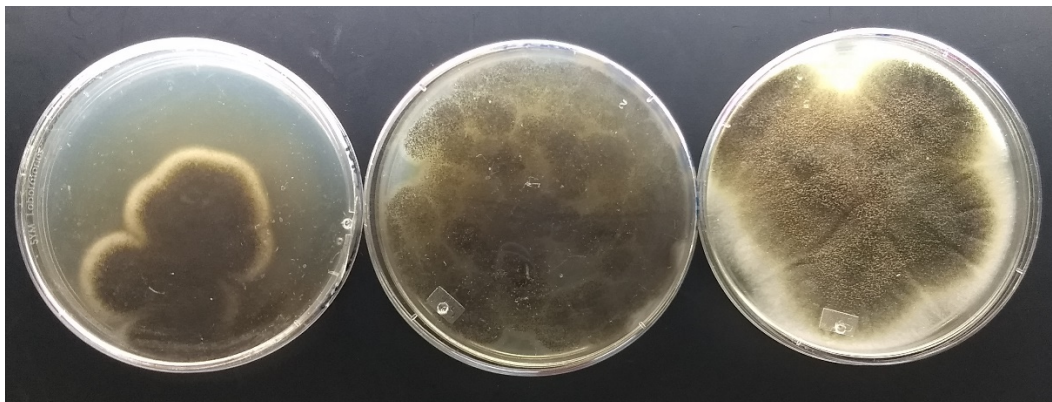


Figura 48: Colonias de *Aspergillus niger*, aisladas del grano de cacao, cultivadas en medios PDA, MEA y CYA (De izquierda a derecha, muestra 6).

Claves taxonómicas: Colonias en PDA a 25 °C a 7 días de incubación con 4 – 5 cm de diámetro y conidios negros con bordes blancos. Cabezas conidiales negras, globosas a los primeros días y compactadas polvorientas después del día 4. En MEA, las colonias fueron blancas con codinias negras y planas. En CYA, las colonias fueron blancas planas con conidios negro – verde militar.

No. CONTROL	CEPA IDENTIFICADA	MUESTRA DE AISLAMIENTO	% del PITH en el grano
SAM006	<i>Aspergillus niger</i>	21	10

FOTOGRAFÍA

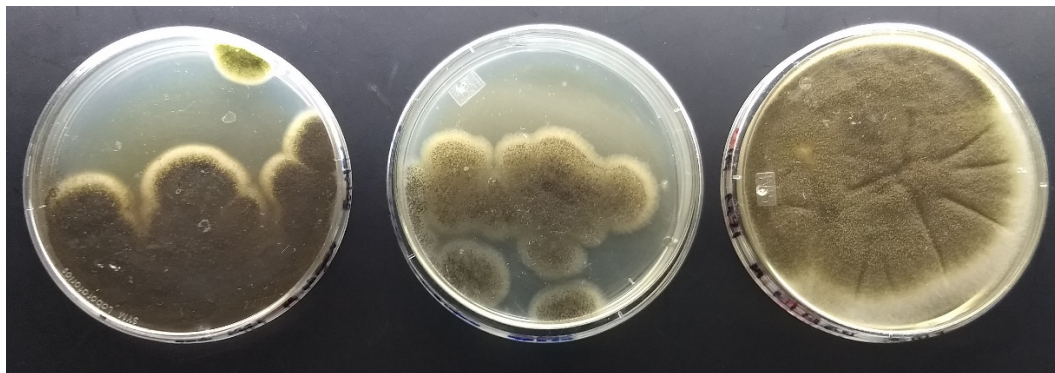
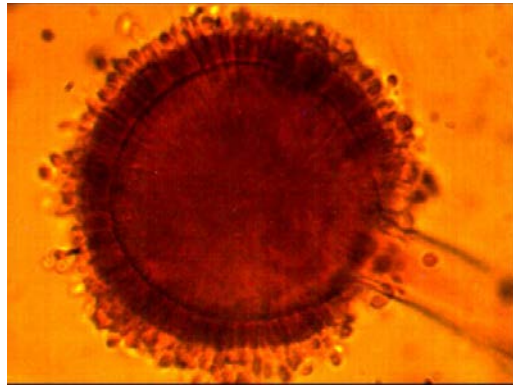
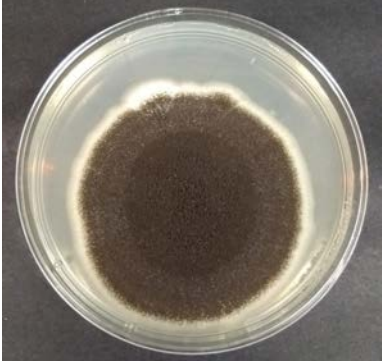


Figura 49: Colonias de *Aspergillus niger*, aisladas del grano de cacao, cultivadas en medios PDA, MEA y CYA (De izquierda a derecha, muestra 21).



1.3 Aislamiento e identificación de especies de hongos aflatoxigénicos del grano de cacao

La Aflatoxina B1 (AFB1) es una micotoxina ampliamente distribuida en el grano de cacao con muy elevada toxicidad frente a humanos y animales, ya que se encuentra clasificada en el grupo 1 de la IARC.

Después de la realización de las técnicas para la determinación del PITH y las de claves taxonómicas, se identificaron especies productoras de Aflatoxina B1 que están reportadas en la literatura, y que a continuación se enlistan.

No. CONTROL	CEPA IDENTIFICADA	SECCIÓN	MUESTRA DE AISLAMIENTO	ETAPA Y MODALIDAD
CAFLA – 001	<i>Aspergillus parasiticus</i>	Flavi	5	Secado – Zarandas protegidas
CAFLA – 002	<i>Aspergillus parasiticus</i>	Flavi	6	Secado – Zarandas protegidas
CAFLA – 003	<i>Aspergillus parasiticus</i>	Flavi	7	Secado – Zarandas protegidas
CAFLA – 004	<i>Aspergillus parasiticus</i>	Flavi	8	Almacenamiento – Saco de yute
CAFLA – 005	<i>Aspergillus flavus</i>	Flavi	9	Almacenamiento – Saco de yute
CAFLA – 006	<i>Aspergillus flavus</i>	Flavi	14	Secado – Samoas
CAFLA – 007	<i>Aspergillus flavus</i>	Flavi	20	Almacenamiento – Saco de yute
CAFLA – 008	<i>Aspergillus flavus</i>	Flavi	25	
CAFLA – 009	<i>Aspergillus flavus</i>	Flavi	30	

Tabla 11: Cepas de hongos aflatoxigénicos aislados del grano de cacao

1.3.1 Hongos aflatoxigénicos aislados del grano de cacao, pertenecientes a la sección Flavi

Dentro del género *Aspergillus*, en la sección Flavi, se encuentran importantes especies aflatoxígenas como *A. flavus*, *A. parasiticus* y *A. nomius*, algunas de las cuales habían sido poco estudiadas hasta el momento debido a su reciente descripción. En las muestras del grano de cacao de este estudio, solo se

encontraron 7 cepas pertenecientes a esta sección, y que a continuación se detallan sus características, morfología colonial y claves taxonómicas.

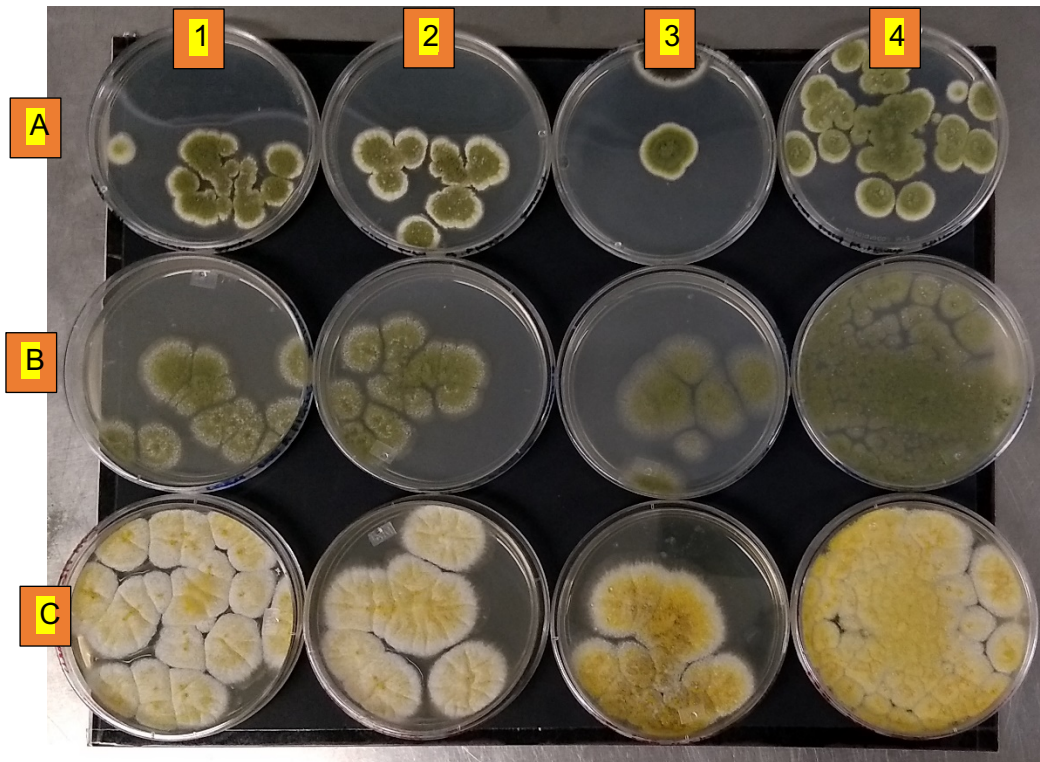


Figura 50: Cepas de hongos aflatoxigénicos pertenecientes a la sección *Flavi*

Descripción: De izquierda a derecha, 1. *A. flavus*, muestra 6; 2. *A. flavus*, muestra 7; 3. *A. flavus*, muestra 8; 4. *A. flavus*, muestra 14. Horizontalmente: A, cepas cultivadas en PDA; B, cepas cultivadas en MEA; C, cepas cultivadas en CYA.

Claves taxonómicas: Colonias en PDA a 25 °C a 7 días de incubación con 2.8 cm de diámetro y conidios amarillos. Cabezas conidiales amarillas, globosas a los primeros días y compactadas después del día 5. Presenta esclerocios muy rara vez de color blanco. En MEA, las colonias fueron blancas con destellos amarillos. En CYA, las colonias fueron blancas.

No. CONTROL	CEPA IDENTIFICADA	MUESTRA DE AISLAMIENTO	% del PITH en el grano
CAFLA - 006	<i>Aspergillus flavus</i>	14	90

FOTOGRAFÍA

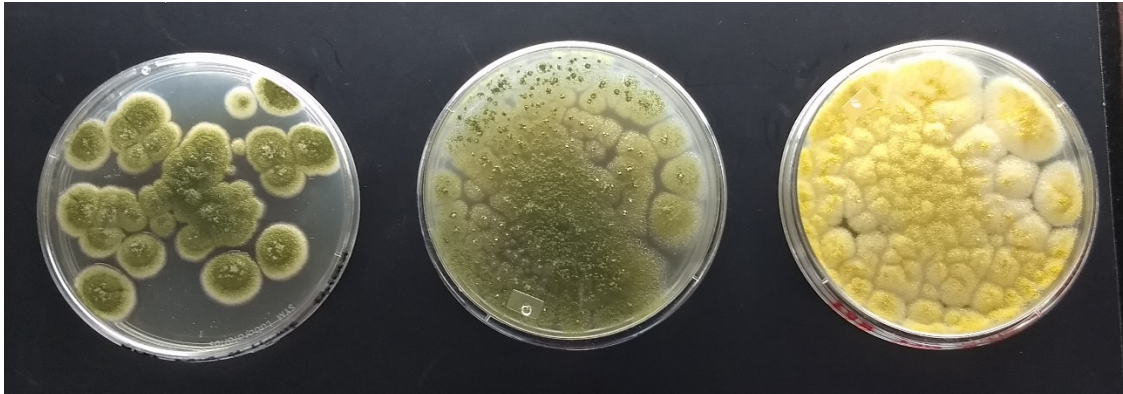
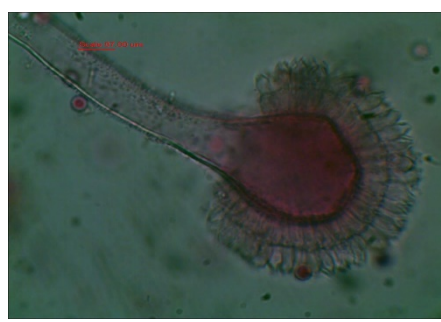
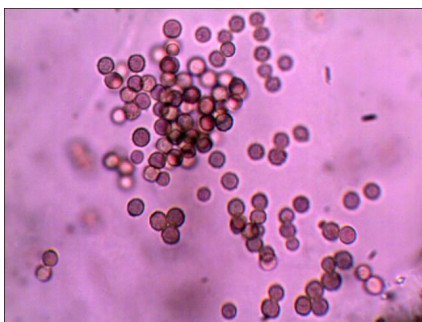
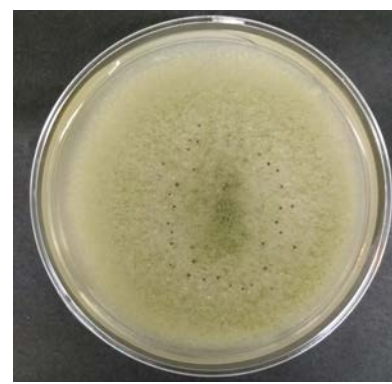
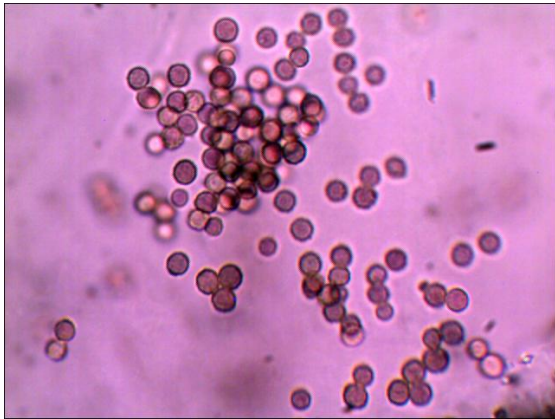
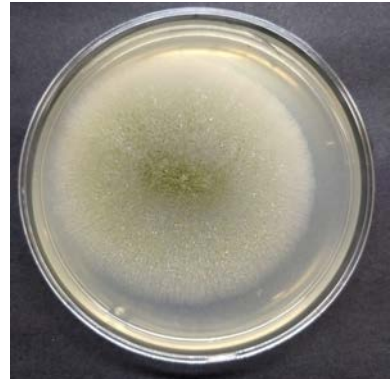
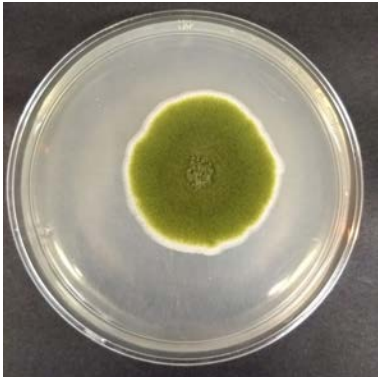


Figura 51: Figura 53: Colonias de *Aspergillus flavus*, aisladas del grano de cacao, cultivadas en medios PDA, MEA y CYA (De izquierda a derecha, muestra 14).



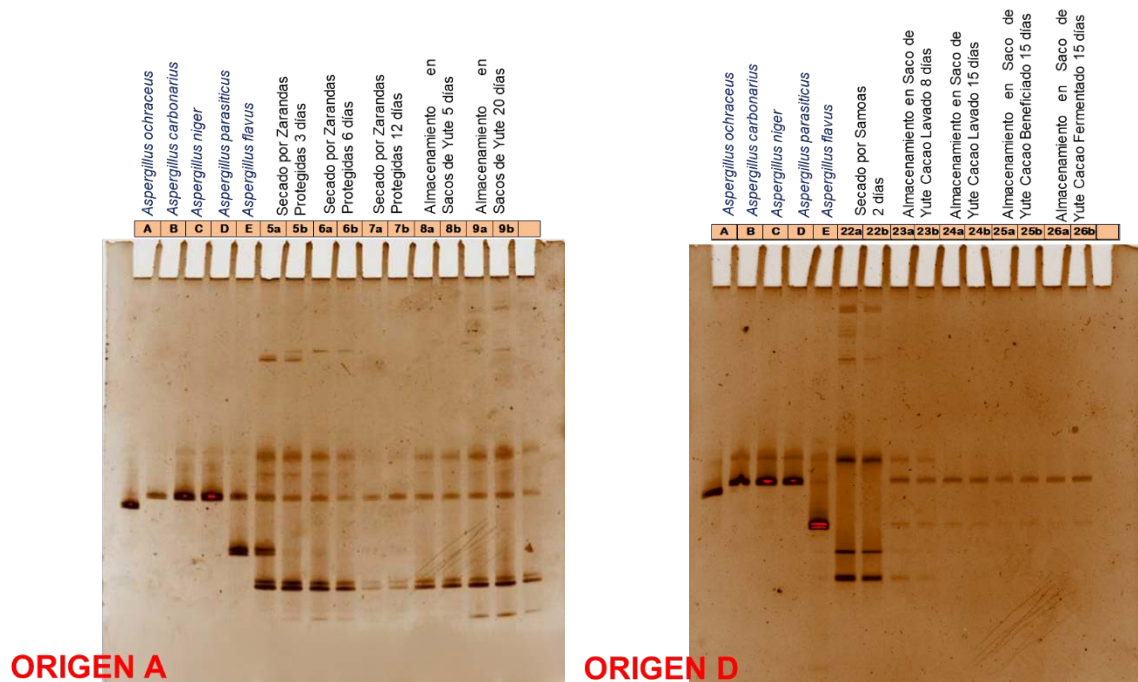


2. Presencia Fúngica del género *Aspergillus* mediante PCR – DGGE

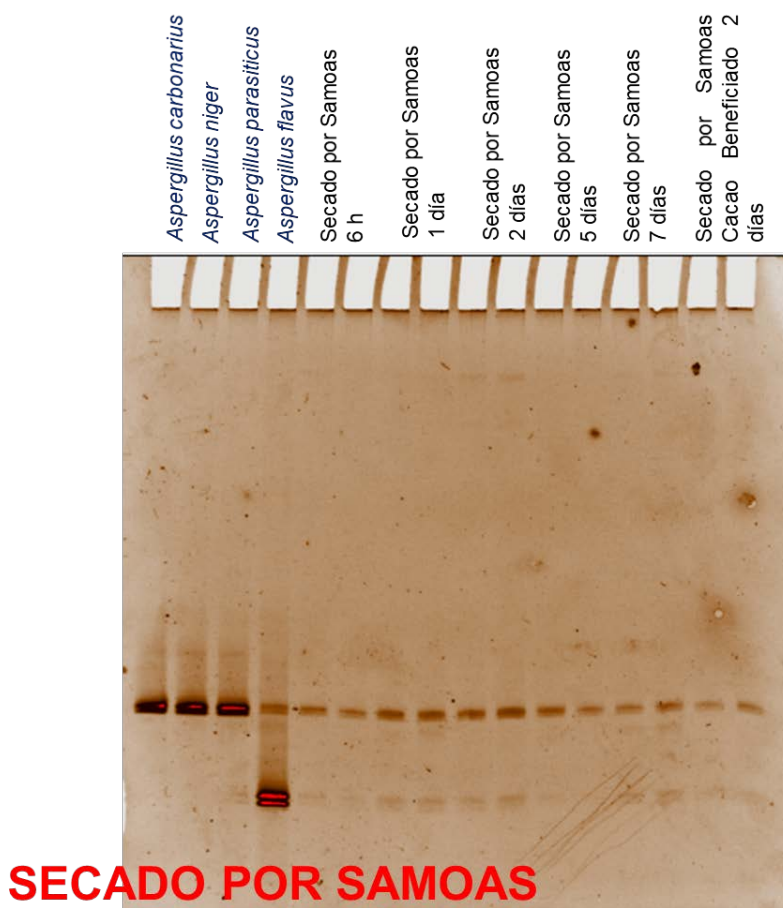
2.1. Perfiles DGGE

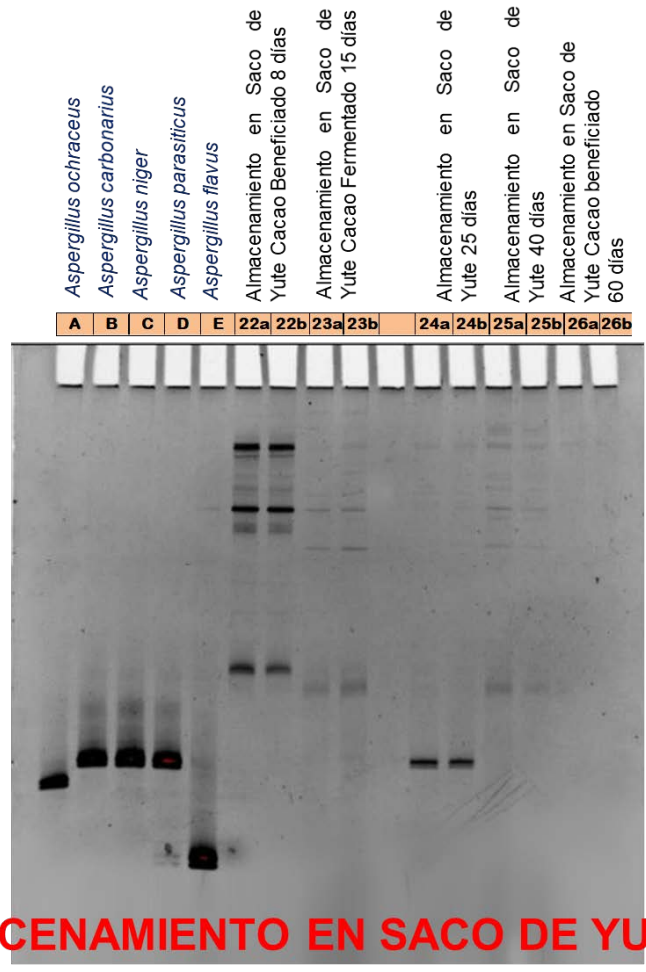
La presencia de hongos filamentosos toxigénicos en las diferentes vías de procesamiento postcosecha del grano de cacao fue estudiada mediante perfiles PCR – DGGE, estos se obtuvieron a partir de las diferentes etapas postcosecha y utilizando las cepas caracterizadas microbiológicamente como marcadores. Cada vertical representó una muestra de cacao con su respectivo duplicado y cada banda representó la presencia de la especie fúngica. En los primeros 5 carriles se colocó el ADN amplificado de las cepas marcadoras de interés: *A. ochraceus*, *A. carbonarius*, *A. niger*, *A. parasiticus*, *A. flavus*, esto permitió observar y relacionar la presencia de especies ocratoxigénicas y aflatoxigénicas en las etapas de secado y almacenamiento.

La presencia de hongos filamentosos toxigénicos solo fue detectado en muestras de grano de cacao correspondientes a las etapas de proceso de secado y almacenamiento, destacando los orígenes A y D, como los que tuvieron la mayor incidencia de estos.



Además las muestras restantes, correspondientes a las etapas de secado por Samoas y almacenamiento en Sacos de Yute, que fueron las variantes que presentaron alta incidencia de contaminación por hongos toxigénicos y la presencia de las micotoxinas, se analizaron en otros perfiles DGGE, obteniendo así, un panorama más amplio con respecto a que, los materiales y la manera en como realizan el proceso es lo que agrega dicha contaminación.





ALMACENAMIENTO EN SACO DE YUTE

3. Cuantificación de OTA y AFB1 en grano de cacao y los hongos asociados a su producción

3.1 Determinación de la humedad del grano de cacao

Las 42 muestras de cacao fueron sometidas a la determinación de humedad mediante pérdida de peso, basado en la NMX – FF – 103 – SCFI – 2003. A continuación, se presenta la tabla de los resultados:

CLASIFICACIÓN DE LA MUESTRA					
NÚMERO	ORIGEN	ETAPA	MODALIDAD	TIEMPO (DÍAS)	% HUMEDAD
1	A	F	CE	2.5	50.86
2	A	F	CE	3.5	51.23
3	A	F	CE	4.5	49.85
4	A	F	CE	5.5	54.20
5	A	S	ZP	3	36.78
6	A	S	ZP	6	11.56
7	A	S	DS	11.5	5.73
8	A	A	SY	5	5.93
9	A	A	SY	20	5.65
<hr/>					
10	B	F	CR	1	59.64
11	B	F	CR	3	56.89
12	B	F	CR	5	54.06
13	B	F	CR	7	52.06
14	B	S	SM	5	6.21
15	B	S	SM	7	6.50
16	B	Sb	SM	7	5.83
<hr/>					
17	C	Af	SP	1	6.28
18	C	A	SP	30	7.29
19	C	A	SP	60	7.59

20	C	A	SY	25	7.18
21	C	A	SY	40	7.26
22	D	Sb	SM	2	33.51
23	D	Al	SY	8	6.81
24	D	Al	SY	15	6.65
25	D	Ab	SY	15	6.83
26	D	Af	SY	15	7.48
27	E	F	CE	1	58.86
28	E	F	CE	4	57.49
29	E	F	CE	5	54.55
30	E	S	SM	6h	24.87
31	E	Af	SP	2	6.80
32	E	Ab	SY	8	5.45
33	E	Af	SY	15	5.29
34	F	F	T R	1	63.82
35	F	F	TR	5	62.89
36	F	F	TR	7	52.55
37	F	S	SM	1	12.44
38	F	S	SM	2	9.99
39	G	F	CE	1	59.98
40	H	S	DS	1	53.87
41	H	S	DS	2	28.34
42	X	Al	SY	40	9.96

Tabla 12: Humedades de las muestras de cacao de las etapas de fermentación, secado y almacenamiento



Figura 52: Determinación de humedad por pérdida de peso de las muestras de cacao

3.2 Cuántificación de toxinas en cepas ocratoxigénicas y grano de cacao

ORIGEN	ETAPA Y MODALIDAD	CEPA IDENTIFICADA	Producción de OTA ng/ g medio	Incidencia de OTA en grano de cacao µg/kg
A	Secado – Zarandas protegidas	Aspergillus ochraceus	40.88	21.56
A	Almacenamiento – Saco de yute	Aspergillus carbonarius	9.3	13.83
E	Secado – Samoas	Aspergillus carbonarius	9.2	25.8
H	Almacenamiento – Saco yute	Aspergillus carbonarius	7.8	23.03
A	Secado – Zarandas protegidas	Aspergillus niger	8.9	21.2
C	Almacenamiento – Saco de yute	Aspergillus niger	11.1	39.0

3.3 Cuántificación de toxinas en cepas aflatoxigénicas y grano de cacao

ORIGEN	ETAPA Y MODALIDAD	CEPA IDENTIFICADA	Producción de AFLA ng/ g medio	Incidencia de AFLA en grano de cacao µg/kg
A	Secado – Zarandas protegidas	<i>Aspergillus parasiticus</i>	171.25	5.5
A	Secado – Zarandas protegidas	<i>Aspergillus parasiticus</i>	164.75	4.3
A	Secado – Zarandas protegidas	<i>Aspergillus parasiticus</i>	160.05	8.6
A	Almacenamiento – Saco de yute	<i>Aspergillus parasiticus</i>	147.40	4.7
A	Almacenamiento – Saco de yute	<i>Aspergillus flavus</i>	162.80	8.3
B	Secado – Samoas	<i>Aspergillus flavus</i>	166.20	9.3
D	Almacenamiento – Saco de yute	<i>Aspergillus flavus</i>	144.05	9.4
D	Almacenamiento – Saco de yute	<i>Aspergillus flavus</i>	163.90	6.1
E	Secado – Samoas	<i>Aspergillus flavus</i>	154.35	4.5

CONCLUSIONES

Este estudio permitió observar que si existe relación significativa entre las variables de proceso y materiales usados en cada una de las etapas del tratamiento postcosecha, y que existe mayor contaminación por Aflatoxinas que por OTA.

El análisis de los perfiles DGGE permitieron poner de manifiesto la presencia de cepas toxigénicas a lo largo del secado y almacenamiento del grano de cacao, mismos que se comprueban con las técnicas microbiológicas realizadas.

Aspergillus carbonarius fue la principal cepa ocratoxigénica aislada del grano de cacao de las etapas de Secado por Samoas y en el Almacenamiento por Saco de yute. ***Aspergillus parasiticus*** como ***Aspergillus flavus***, tuvieron presencia en las etapas de Secado por Zarandas Protegidas y el Almacenamiento en Saco de yute.

Con respecto a la fermentación del grano de cacao, de las 3 modalidades ninguna presentó incidencia por hongos toxigénicos del género *Aspergillus*, no obstante, hubo mucha presencia de hongos del género *Penicillium*.

En el secado por Zarandas Protegidas (ZP) y en Samoas (SM) se pudo visualizar y comprobar la presencia de cepas toxigénicas. Al comparar ZP y SM, se encontró que ZP presenta contaminación por hongos tanto como Ocratoxigénicos como Aflatoxigénicos, por lo cual, no se recomienda.

Finalmente, se encontró que los grano almacenados en Sacos de Yute son los que presentaron la contaminación por hongos toxigénicos con respecto a aquellos almacenados en Sacos de Polipropileno, por lo tanto, se recomienda hacer uso de estos. El tiempo de almacenamiento, así como las condiciones ambientales como temperatura y porcentajes de humedad altos, influyen directamente sobre esta contaminación.

BIBLIOGRAFÍA

- Barel, M. (2009). *Du Cacao au Chocolat, l'épopée d'une gourmandise*. Francia: Éditions Quae.
- Champion Martínez, E. I. (2016). *Estudio de la dinámica de microorganismos (Bacterias, levaduras y hongos filamentosos) que influyen en la contaminación del grano de cacao (Theobroma cacao L.) con Ocratoxina A (OTA) utilizando PCR - DGEE*. Veracruz, Ver.: UNIDA, Instituto Tecnológico de Veracruz.
- México, C. (01 de enero de 2016). *Cacao México*. Recuperado el 12 de septiembre de 2016, de Cacao México: <http://www.cacaomexico.org/>
- Ogata, N. (mayo de 2007). <http://www.biodiversidad.gob.mx/>. *El Cacao*. CONABIO. *BioDiversitas*, 72:1-5. Obtenido de <http://www.biodiversidad.gob.mx/Biodiversitas/Articulos/biodiv72art1.pdf>
- Saltini. (2012).

REFERENCIAS

- Abreu, A. R., Armendáriz, C. R., Fernández, A. J. G., Hardisson, A., & Torre, D. (2011). La ocratoxina A en alimentos de consumo humano : revisión, 26(6), 1215–1226. <http://doi.org/10.3305/nh.2011.26.6.5381>
- Arroyo-manzanares, N., Huertas-pérez, J. F., Gámiz-gracia, L., & García-campaña, A. N. A. M. (2014). Control de micotoxinas en alimentos.
- Bohnert, M., Wackler, B., & Hoffmeister, D. (2010). Spotlights on advances in mycotoxin research, 1–7. <http://doi.org/10.1007/s00253-010-2565-8>
- Carvajal, M. (2013). *Afb 1 -adn*, 16(2), 109–120.
- Castrillo, M. L., & Horianski, M. A. (2013). REVISTA ARGENTINA DE comercializada en Posadas (Misiones , Argentina) y evaluación de su. *Revista Argentina de Micrología*, 45(2), 110–113. [http://doi.org/10.1016/S0325-7541\(13\)70009-9](http://doi.org/10.1016/S0325-7541(13)70009-9)
- Company, N. (2004). Occurrence of Ochratoxin A in Cocoa Products and Chocolate.
- Copetti, M. V., Pereira, J. L., Iamanaka, B. T., Pitt, J. I., & Taniwaki, M. H. (2010). Ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in cocoa during farm processing. *International Journal of Food Microbiology*, 143(1–2), 67–70. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.07.031>

- Copetti, M. V., Iamanaka, B. T., Nester, M. A., Efraim, P., & Taniwaki, M. H. (2013). Occurrence of ochratoxin A in cocoa by-products and determination of its reduction during chocolate manufacture. *Food Chemistry*, 136(1), 100–104. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.07.093>
- Dano, S. D., Manda, P., Dembélé, A., Abla, A. M. J. K., Bibaud, J. H., Gouet, J. Z., & Sika, C. B. Z. M. (2013). Influence of fermentation and drying materials on the contamination of cocoa beans by Ochratoxin A. *Toxins*. <http://doi.org/10.3390/toxins5122310>
- Durand, N., Galindo, S., Guyot, B., & Guyot, B. (2012). SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC par Dynamique des populations microbiennes au cours du traitement post récolte du café et relations interspécifiques entre souches ochratoxinogènes Florence Mathieu Amaury Martinez Angélique Fontana Dynamique des popula.
- Edem, J., Hinnéh, M., Walle, D. Van De, Ohene, E., Boeckx, P., & Dewettinck, K. (2016). Factors influencing quality variation in cocoa (Theobroma cacao) bean flavour profile — A review. *FRIN*, 82, 44–52. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.01.012>
- Elika. (2013). Aflatoxina B1, 1–6.
- Fernández, R., & Le, S. (1987). DGGE : electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante, 149–174.
- Lambert, S. (n.d.). FERMENTACIÓN DEL CACAO – ASPECTOS GENERALES.
- Manikandan, P., Samson, R. A., Anita, R., Miha, T., & Narendran, V. (2009). Mycotic Keratitis Due to *Aspergillus nomius* □, 47(10), 3382–3385. <http://doi.org/10.1128/JCM.01051-09>
- Ogata, N., & Aztecas, L. (2007). Citar como: Nisao Ogata 2007. El cacao. CONABIO. *Biodiversitas* 72:1-5, 1–5.
- PELCZAR, M.J. et al. Microbiologia, conceitos e aplicações. São Paulo: Makron Books, 1997.
- Su, M. L. (n.d.). Biotransformación de sustancias tóxicas Importancia de las reacciones.
- Taylor, P., Amézqueta, S., Murillo, M., & Cerain, A. L. De. (2014). Validation of a high-performance liquid chromatography analytical method for ochratoxin A quantification in cocoa beans Validation of a high-performance liquid chromatography analytical method for ochratoxin A quantification in cocoa beans, (November 2013), 37–41. <http://doi.org/10.1080/02652030400019422>

Uribe-yunda, D. F. (2012). Mecanismos moleculares involucrados en la mutagenicidad inducida por aflatoxina B 1, *10*(3), 403–419.

Wen, J., Mu, P., & Deng, Y. (2016). Mycotoxins: cytotoxicity and biotransformation in animal cells, 377–387. <http://doi.org/10.1039/c5tx00293a>