

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**

**Colegio de Posgrados**

**Detección y cuantificación de Aflatoxinas y Ocratoxina A en productos de  
cacao de la zona tropical de América del Sur**

**Proyecto de investigación y desarrollo**

**Samantha Beatriz Esparza Naranjo**

**Lucía Ramírez, Ph.D.  
Directora del Trabajo de Titulación  
Sonia Zapata, Ph.D.  
Directora del Trabajo de Titulación**

Trabajo de titulación de posgrado presentado como requisito  
para la obtención del título de Máster en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Quito, 15 de diciembre de 2022

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**  
**COLEGIO DE POSGRADOS**

**HOJA DE APROBACIÓN DE TRABAJO DE TITULACIÓN**

**Detección y cuantificación de Aflatoxinas y Ocratoxina A en productos de cacao de la zona tropical de América del Sur**

**Samantha Beatriz Esparza Naranjo**

Nombre del Director del Programa: Lucía Ramírez Cárdenas  
Título académico: Ph.D.  
Director del programa de: Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Nombre del Decano del colegio Académico: Eduardo Alba Cabrera  
Título académico: Ph.D.  
Decano del Colegio: Ciencias e Ingenierías

Nombre del Decano del Colegio de Posgrados: Hugo Burgos Yáñez  
Título académico: Ph.D.

**Quito, 15 de diciembre de 2022**

## © DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en la Ley Orgánica de Educación Superior del Ecuador.

Nombre del estudiante: Samantha Beatriz Esparza Naranjo

Código de estudiante: 00324245

C.I.: 1724451263

Lugar y fecha: Quito, 15 de diciembre de 2022.

## ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN

**Nota:** El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETheses>.

## UNPUBLISHED DOCUMENT

**Note:** The following graduation project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETheses>.

## **DEDICATORIA**

A mi mamá, Lucy, por toda su dedicación y entrega en toda mi formación educativa, así como el apoyo de mi papá, Angelito.

A mis ñaños Anita y Paúl, por su cuidado, orientación y porque me impulsaron a comenzar esta desafiante meta.

A mis cuñados, Denyse y Christian por su ayuda siempre que la necesité.

A mi amada sobrina Juli por ser un rayito de sol.

A Andrés por siempre estar dispuesto a apoyarme incondicionalmente.

También a mis queridos tíos y primos que siempre me han dado una voz de aliento.

A mi perrito Toby por ser mi compañero de maestría a tiempo completo y por alegrarme la vida a pesar de las dificultades.

El primer master en la USFQ es nuestro y que privilegio haber sido la protagonista.

## AGRADECIMIENTOS

Me gustaría comenzar agradeciendo a Dios por el amor, sabiduría y cuidado, así como a mis abuelitos y tíos, que son los angelitos que me protegen desde el cielo. Agradezco mis ancestros por todo el camino que recorrieron para que yo pudiera estar donde estoy.

De manera especial a Lucy y Soñita por sabiduría, orientación y paciencia para la realización de esta tesis. Gracias a ustedes me siento una mejor investigadora y profesional.

A los productores de cacao y fabricantes de derivados por haberme facilitado las muestras.

Al personal del Laboratorio de Ingeniería Ambiental y del Instituto de Microbiología, que permitieron llevar a cabo la ejecución de los ensayos.

Al personal docente, administrativo y de servicio la USFQ por su valioso trabajo.

A Eri, Sofi, Carlita, Mica, Karlita, y Ricki por su compañía, amistad y apoyo durante esta aventura.

A Cris por su trabajo oportuno, por inspirarme profesionalmente y por haber construido una linda amistad.

## RESUMEN

La preferencia y gusto universal por el chocolate y otros derivados del cacao, así como la demanda por alimentos funcionales, específicamente con mayores contenidos de cacao, hace probable la ingesta de micotoxinas, que pueden contaminar el grano durante su procesamiento primario e industrial con posibles efectos en la salud humana. En esta investigación, se cuantificaron aflatoxinas totales (AF) y ocratoxina A (OTA) en productos de cacao de la región tropical de América del Sur mediante el Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA) y se evaluó su inocuidad con base en la legislación brasileña. Al analizar la concentración de micotoxinas de 12 orígenes utilizando un diseño completamente al azar, ocho localidades superaron el límite máximo tolerable (LMT) de AF y una el LMT de OTA. Se determinaron los mayores contenidos promedio de AF ( $202.75 \mu\text{g Kg}^{-1}$ ) según la literatura. Por otro lado, se aplicó un diseño en bloques completamente al azar con arreglo factorial 3 x 2 (tipo de producto y origen), con 12 unidades experimentales. Se tuvo mayor concentración de OTA en granos y nibs ( $p < 0.05$ ) de una localidad. Los granos de un sitio y los nibs de los dos lugares excedieron el LMT de ambas micotoxinas. Además, existió coocurrencia de los dos tipos de micotoxinas en granos, nibs y cascarilla de todos los orígenes. Este es el primer reporte que emplea tostado ligero ( $132 \text{ }^\circ\text{C}$  por 10 min) en la obtención de nibs de cacao y su concentración de OTA está dentro de la ingesta diaria y semanal tolerable. Para minimizar la generación de micotoxinas en los granos de cacao se debe evitar el almacenamiento de la mazorca de cacao antes de la apertura, utilizar frutos en buenas condiciones sanitarias, voltear la masa fermentativa, realizar el secado rápido ( $< 7$  días), mantener baja humedad relativa ( $< 80\%$ ) y humedad en los granos ( $< 8\%$ ) durante el almacenamiento y garantizar óptimas condiciones higiénicas durante el procesamiento.

Palabras clave: micotoxinas, ELISA, granos de cacao, nibs, cascarilla.

## ABSTRACT

The worldwide preference and taste for chocolate and other cocoa derivatives, as well as the demand for functional foods, specifically with higher cocoa content, makes the ingestion of mycotoxins likely. Mycotoxins can contaminate the cocoa bean during its primary and industrial processing and cause severe effects on humans and animals. In this research, total aflatoxins (AF) and ochratoxin A (OTA) were quantified in cocoa products from the tropical region of South America by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Their safety was evaluated based on Brazilian law. A completely randomized design was used to analyze the concentration of mycotoxins from 12 origins. Eight locations exceeded the maximum tolerable limit (MTL) of AF and one the MTL of OTA. According to the literature, the highest average AF contents ( $202.75 \mu\text{g Kg}^{-1}$ ) were found. Besides that, a completely randomized block design was applied with a 3 x 2 factorial arrangement (type of product and origin), achieving 12 experimental units. There was a higher concentration of OTA in grains and nibs ( $p < 0.05$ ) from one location. Beans from one site and nibs from both places surpassed the MTL for both mycotoxins. In addition, there was a co-occurrence of the two types of mycotoxins in grains, nibs, and shells of all origins. This report uses mild roasting ( $132 \text{ }^\circ\text{C}$  for 10 min) to produce cocoa nibs for the first time. Its OTA concentration is within the tolerable daily intake. To minimize the generation of mycotoxins in cocoa beans, it is necessary to avoid the storage of the cocoa pod before opening, use fruits in good sanitary conditions, turn the fermentative mass, carry out fast drying ( $< 7$  days), maintain low relative humidity ( $< 80 \%$ ) and moisture in grains ( $< 8\%$ ) during storage, and assure optimal hygienic conditions during processing.

**Key words:** mycotoxins, ELISA, cocoa beans, nibs, shell.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>14</b>
<b>Antecedentes .....</b>	<b>14</b>
<b>Justificación .....</b>	<b>16</b>
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>18</b>
Objetivo general.....	18
Objetivos específicos.....	18
<b>HIPÓTESIS .....</b>	<b>18</b>
<b>MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>19</b>
<b>Cacao .....</b>	<b>19</b>
<b>Calidad e inocuidad del cacao .....</b>	<b>19</b>
<b>Procesamiento del cacao .....</b>	<b>20</b>
Procesamiento primario.....	20
Procesamiento industrial.....	25
<b>Hongos y producción de micotoxinas .....</b>	<b>27</b>
Aflatoxinas (AF). .....	28
Ocratoxina A (OTA).....	29
Detección de micotoxinas.....	30
<b>METODOLOGÍA Y DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN .....</b>	<b>31</b>
<b>Muestreo de productos de cacao .....</b>	<b>31</b>
Efecto del origen del cacao en la concentración de micotoxinas.....	31
Efecto del origen y tipos de productos en la concentración de micotoxinas.....	32
<b>Cuantificación de Micotoxinas .....</b>	<b>32</b>
Ocratoxina A.....	32
Aflatoxinas Totales.....	33
Implicaciones del ensayo.....	34
<b>Análisis estadísticos .....</b>	<b>34</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>36</b>
<b>Efecto del origen del cacao en la concentración de micotoxinas.....</b>	<b>36</b>
<b>Efecto del origen y tipos de productos en la concentración de micotoxinas .....</b>	<b>39</b>
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>44</b>

**CONCLUSIÓN..... 60**

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Análisis de varianza (ANOVA) de la concentración de OTA ( $\mu\text{g Kg}^{-1}$ ) de los tratamientos. ....	37
<b>Tabla 2:</b> Análisis de varianza (ANOVA) de la concentración de AF ( $\mu\text{g Kg}^{-1}$ ) de los tratamientos. ....	37
<b>Tabla 3:</b> Concentración de OTA en granos de cacao de 12 orígenes (tratamientos). ....	38
<b>Tabla 4:</b> Concentración de AF en granos de cacao de 12 orígenes (tratamientos). ....	39
<b>Tabla 5:</b> Análisis de varianza (ANOVA) de la concentración de OTA ( $\mu\text{g Kg}^{-1}$ ) de los tratamientos. ....	41
<b>Tabla 6:</b> Análisis de varianza (ANOVA) de la concentración de AF ( $\mu\text{g Kg}^{-1}$ ) de los tratamientos. ....	41

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Modelo de producción del grano de cacao seco.....	21
<b>Figura 2:</b> Esquema de la sucesión microbiana durante la fermentación del grano de cacao...	22
<b>Figura 3:</b> Procesamiento industrial de los granos de cacao y principales etapas donde se produce la reducción de micotoxinas. ....	26
<b>Figura 4:</b> Gráficas de residuos para concentración de OTA en función del origen ( $\mu\text{g Kg}^{-1}$ ).	36
<b>Figura 5:</b> Gráficas de residuos para concentración de AF en función del origen ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )...	37
<b>Figura 6:</b> Gráficas de residuos para concentración de OTA en función del origen y tipo de producto ( $\mu\text{gKg}^{-1}$ ).....	40
<b>Figura 7:</b> Gráficas de residuos para concentración de AF en función del origen y tipo de producto ( $\mu\text{g Kg}^{-1}$ ).....	41
<b>Figura 8:</b> Interacción del origen y tipo de producto en la concentración de OTA.....	42

## INTRODUCCIÓN

### Antecedentes

La inocuidad alimentaria garantiza que un alimento, al ser procesado, almacenado y distribuido siguiendo prácticas adecuadas, no represente un riesgo a la salud de seres humanos o animales. Sin embargo, la condición de la materia prima constituye una de las principales amenazas para la inocuidad, por ejemplo, debido a la presencia de micotoxinas en granos de cacao, cereales, frutos secos y productos de origen animal. La preocupación por los efectos agudos y crónicos de las micotoxinas originó el establecimiento de límites máximos tolerables (LMT) en materias primas y productos elaborados (European Commission, 2006a). En los granos de cacao y derivados, los niveles de ocratoxina A (OTA) y aflatoxinas (AF) detectados son generalmente bajos, por lo que no contribuyen de forma relevante a la exposición de micotoxinas en la dieta (European Commission, 2010). No obstante, la preferencia y gusto universal por derivados de cacao y la tendencia al consumo de alimentos más saludables (chocolate con mayor contenido de cacao) hacen probable la ingesta de mayores niveles de micotoxinas (Copetti et al., 2012a).

La calidad e inocuidad del cacao se puede comprometer por la contaminación y proliferación microbiana facilitada por la susceptibilidad genética de la variedad de la planta, las condiciones ambientales propicias (humedad relativa y temperatura) y por actividades de poscosecha inadecuadas. El clima tropical de las regiones productoras, caracterizado por temperaturas de 15 a 32 °C y lluvias a lo largo del año entre 1500 y 3000 mm (Delgado-Ospina et al., 2021), favorece la proliferación de hongos productores de micotoxinas, sobre todo en las temporadas con meses más húmedos y temperaturas cálidas (De Magalhães et al., 2011; Maciel et al., 2018). De hecho, el incremento de humedad y temperatura a consecuencia del cambio

climático puede favorecer el surgimiento de nuevos genotipos fúngicos termotolerantes capaces de generar toxinas (Delgado-Ospina et al., 2021). Durante la poscosecha, los hongos productores de micotoxinas pueden infestar las semillas de cacao en el proceso de fermentación y el secado por prácticas inapropiadas. Entre las principales especies aflatoxigénicas están *A. flavus*, *A. parasiticus* y *A. nomius*, mientras que entre las ocratoxigénicas destacan *A. ochraceus*, *A. carbonarius* y *A. niger* (Delgado-Ospina et al., 2021; Maciel et al., 2018). Por otro lado, las esporas fúngicas son capaces de germinar y generar micotoxinas en los granos de cacao sometidos a malas condiciones de almacenamiento por largos períodos, por ejemplo, cuando la humedad de los granos supera el 8% o la humedad relativa es mayor al 80% (Leandro-Muñoz et al., 2017).

Los productores de granos de cacao y los fabricantes de semielaborados y productos terminados deberían verificar que los procedimientos utilizados en la cadena de producción sean efectivos para generar alimentos inocuos, específicamente, con bajo contenido de micotoxinas. En su defecto, el establecimiento de sistemas de análisis de peligros y puntos críticos de control (HACCP) puede ayudar a prevenir el riesgo de altos niveles de contaminación por micotoxinas.

## **Justificación**

El cacao es un ingrediente importante en una serie de alimentos como chocolates, helados, confites, pasteles, bebidas y galletas (Sánchez-Hervás et al., 2008). En las últimas décadas, se ha reportado la presencia generalizada y baja de micotoxinas en el cacao y, debido a la naturaleza resistente de estas moléculas, en los productos derivados (Copetti et al., 2012a; Copetti et al, 2014; Pires et al., 2019). No obstante, dichas concentraciones son preocupantes por el amplio consumo de chocolates por infantes (Copetti et al., 2014) y por la tendencia de alimentación con productos más saludables, es decir, chocolates con mayor contenido de cacao, en detrimento de ingredientes lácteos y endulzantes/edulcorantes, que pueden presentar niveles más altos de los contaminantes (Copetti et al., 2012a). De hecho, el cacao y derivados pueden tener el potencial de usarse para la prevención de alergias, cáncer, inflamación, ansiedad, hiperglucemia, obesidad y resistencia a la insulina (Latif, 2013).

Por otro lado, la producción global de granos de cacao en el 2019-2020 fue de 4741000 toneladas con perspectivas de aumento en los años siguientes (ICCO, 2020). La comercialización de granos de cacao y productos elaborados representó en torno de 5.6 millones de dólares en el 2021 (ITC, 2022). La producción de cacao se da principalmente en los países tropicales. El líder mundial es Costa de Marfil con 2.2 millones de toneladas en el 2020, seguido de Ghana, Indonesia, Nigeria, Ecuador, Camerún, Brasil, Sierra Leona y Perú. Los principales importadores son Países Bajos, Alemania, Malasia, Estados Unidos, Bélgica, Indonesia, Francia, Turquía, Inglaterra y Canadá (FAO, 2022).

A pesar de la importancia comercial y de consumo de los granos de cacao y derivados, no existe una regulación internacional sobre los LMT de AF y OTA en estos productos, que impide el resguardo y control de su elaboración y comercialización (European Commission,

2006b; FAO & WHO, 2013; FDA, 2000). Sin embargo, es necesario adoptar lineamientos de procesamiento primario e industrial adecuados para asegurar niveles residuales tan bajos como sea posible. De manera excepcional, Brasil tuvo la iniciativa de establecer el LMT de  $10 \mu\text{g Kg}^{-1}$  de micotoxinas (OTA y AF) en granos secos y  $5 \mu\text{g Kg}^{-1}$  en productos elaborados (ANVISA, 2011). Una posible regulación futura en la Unión Europea puede causar graves consecuencias económicas a los países exportadores y a los pequeños productores, debido al rechazo de la materia prima por niveles elevados de micotoxinas (Kedjebo et al., 2015).

Si se considera que las condiciones climáticas del trópico favorecen el desarrollo de microorganismos, se debe evitar la contaminación de las semillas de cacao con hongos potencialmente toxigénicos y la generación de micotoxinas durante el tratamiento primario. Copetti et al. (2011a) señalan que el mayor porcentaje de hongos toxigénicos fue aislado durante el secado y almacenamiento. El grano seco es la materia prima que se procesa en pasta, manteca, polvo de cacao, chocolate, etc. La primera etapa de procesamiento del grano de cacao seco involucra el proceso de tostado y el descascarado, donde la remoción de la cáscara es clave para la reducción de micotoxinas (Copetti et al., 2013). Consecuentemente, los nibs, granos sin cáscara y partidos, deberían presentar concentraciones remanentes bajas de micotoxinas.

Los objetivos del desarrollo sostenible (ODS) de la ONU orientan a la industria agroalimentaria a asegurar la inocuidad alimentaria, por ejemplo, al seleccionar insumos con ausentes o bajos niveles de micotoxinas para evitar su presencia en productos elaborados. Por tanto, aún son necesarios esfuerzos investigativos que evalúen la presencia y concentración de aflatoxinas y ocratoxina A en los granos de cacao secos producidos en ambientes tropicales, así como la influencia del procedimiento de tostado y descascarado en el contenido de estos contaminantes.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general.**

Evaluar la ocurrencia y concentración de aflatoxinas totales y ocratoxina A en granos de cacao, nibs y cascarilla de muestras cuyo origen es desconocido.

### **Objetivos específicos.**

- Cuantificar las aflatoxinas y ocratoxina A en granos de cacao seco, nibs y cascarilla mediante el Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA).
- Evaluar la inocuidad de los granos de cacao seco y nibs considerando estándares internacionales.

## **HIPÓTESIS**

Los granos de cacao de zonas tropicales pueden presentar micotoxinas como las aflatoxinas y ocratoxina A debido principalmente a las condiciones ambientales, no obstante, estos contaminantes pueden ser reducidos por el procesamiento industrial.

## MARCO TEÓRICO

### Cacao

El cacao, *Theobroma cacao* L., es una planta nativa de la cuenca del Alto Amazonas (Ecuador, Colombia, Perú y Brasil) que actualmente se cultiva en 40 países localizados en la región tropical de América, África y Asia (Delgado-Ospina et al., 2021; Ríos et al., 2017). Las tres principales variedades de cacao son: Forastero, Criollo y Trinitario. La variedad Forastero es la más cultivada en el mundo por su intenso sabor a cocoa y por su superior desempeño productivo en comparación a la variedad Criollo. El chocolate elaborado a partir de la variedad Criollo presenta un característico sabor a nuez y caramelo. El cruzamiento de plantas de tipo Forastero y Criollo originó el tipo Trinitario, que es considerado como cacao fino y es denominado CCN51 en el Ecuador (Ríos et al., 2017).

El cacao ordinario se obtiene de la variedad Forastero, mientras el cacao fino o de aroma se cosecha principalmente de los árboles tipo Criollo y Trinitario (ICCO, 2016). Sin embargo, existen excepciones, ya que en Ecuador los árboles de tipo Forastero son considerados como cacao fino y denominados cacao “Arriba”, así como el cacao de Camerún obtenido de árboles de la variedad Trinitario se designan como cacao ordinario. El cacao fino es apreciado por sus características organolépticas de aroma y sabor. Por un lado, distinguen notas frutales, de nuez y caramelo y, por otra parte, los sabores florales, herbales y a chocolate equilibrado y agradable (Ríos et al., 2017).

### Calidad e inocuidad del cacao

La calidad del grano está asociada la presencia de determinados atributos para alcanzar un grado de adecuación para usos específicos (El Salous et al., 2020; INEN, 2021). Según la ISO (1977), en los requisitos microbiológicos del cacao solo se controla el porcentaje máximo

de granos mohosos, sin especificar límites máximos tolerables de micotoxinas. La Unión Europea y la FDA tampoco regulan los LMT en los granos de cacao y derivados (European Commission, 2006a; FDA, 2000). No obstante, al reconocer el peligro de contaminación del cacao por OTA, el Codex Alimentarius estableció el Código de Prácticas para Prevenir y Reducir la Contaminación del Cacao (FAO & WHO, 2013). Sin embargo, la Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria de Brasil (ANVISA) estableció un LMT de  $10 \mu\text{g kg}^{-1}$  para aflatoxina total y OTA en granos de cacao y  $5 \mu\text{g kg}^{-1}$  para ambas micotoxinas en semielaborados y productos terminados (ANVISA, 2011).

## **Procesamiento del cacao**

### **Procesamiento primario.**

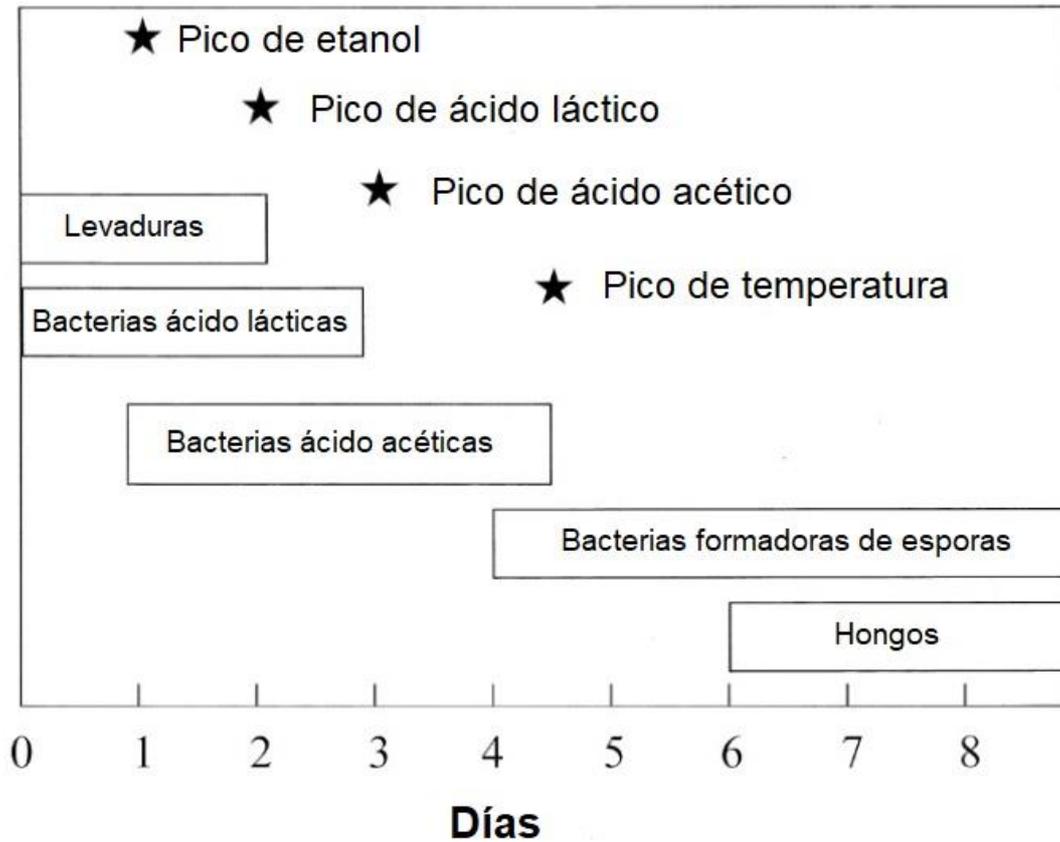
La obtención del cacao en grano se observa en la Figura 1. En el tratamiento poscosecha tradicional del cacao, las mazorcas se almacenan y después se abren para extraer las semillas con mucílago (pulpa). La fermentación sucede de manera natural al colocar los granos con pulpa en hojas de plátano, cajas de madera o lonas/recipientes de plástico (tarpaulin) por 6 días, volteando las semillas varias veces al día (Dano et al., 2013; De Magalhães et al., 2011). Esta etapa es seguida del secado en lonas plásticas, pisos/camas de concreto, tarimas de madera o estructuras con bases tamizadas por un período de 6 hasta 14 días según las condiciones meteorológicas, para finalmente almacenar los granos secos con humedad entre 6 - 8% (Kedjebo et al., 2016).



**Figura 1:** Modelo de producción del grano de cacao seco.

Fuente: Ahoa et al., 2020.

Las semillas de cacao rodeadas de pulpa son estériles dentro de mazorcas sanas y su apertura facilita la colonización de una serie de microorganismos del ambiente (Copetti et al., 2014). Es bien conocido el patrón de sucesión microbiana durante la fermentación espontánea que se detalla a continuación (Schwan & Wheals, 2004) (Figura 3). Los factores ambientales (disponibilidad de oxígeno, pH y temperatura) y los productos del metabolismo microbiano permiten la proliferación secuencial de levaduras, bacterias ácido-lácticas, bacterias ácido-acéticas, bacterias aeróbicas formadoras de esporas y hongos filamentosos (Copetti et al., 2014).



**Figura 2:** Esquema de la sucesión microbiana durante la fermentación del grano de cacao.

Los recuadros abiertos indican los períodos durante las fermentaciones cuando un grupo microbiano en particular es más abundante y/o importante. Las estrellas indican el momento de los picos de metabolitos y temperatura.

Fuente: Schwan & Wheals, 2004.

En las primeras horas de fermentación, el mucílago (pH 3.6) es invadido por levaduras anaerobias facultativas que convierten los azúcares (sacarosa, glucosa y fructosa) a etanol, mientras que las enzimas pectinolíticas degradan su estructura para permitir el ingreso de aire. Se han identificado organismos de los géneros *Candida*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Kloeckera*, *Kluyveromyces*, *Torulopsis*, *Hansenula*, *Hanseniaspora*, *Eremothecium*, *Wallemia*, etc. (Salazar & Lizarazo-Medina, 2021).

Las bacterias ácido-lácticas microaerófilas continúan la sucesión, específicamente las homolácticas son capaces de pueden descomponer azúcares en ambientes ácidos. Se ha

encontrado varias especies del género *Lactobacillus*, entre las más representativas *Lb. fermentum* y *Lb. plantarum*, así como *Leuconostoc mesenteroides* y *Lactococcus lactis*, entre otros (Ostovar & Keeney, 1973). Debido a que soportan altas concentraciones de etanol, las bacterias de ácido-acéticas aerobias, generalmente de los géneros *Acetobacter* y *Gluconobacter* (principalmente *G. oxydans*), se desarrollan en condiciones de mayor aireación (facilitada por la degradación de la pulpa) y temperaturas entre los 37 y 45 °C. Las bacterias producen ácido acético a partir de azúcares y pueden transformar el etanol a ácido acético y después metabolizarlo a CO<sub>2</sub> y agua. La disminución de etanol y ácido láctico y el aumento de ácido acético es característico de esta etapa. Las altas temperaturas derivadas de las reacciones exotérmicas, que pueden ser superiores a 50 °C, y el bajo pH ocasionan la muerte de embrión y se originan los precursores del aroma, sabor y color de chocolate (Copetti et al., 2014; Dano et al., 2013; Nielsen et al., 2013). El crecimiento de bacterias aeróbicas formadoras de esporas del género *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. cereus*, *B. coagulans*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. stearothermophilus*, etc) es sobresaliente cuando se eleva la tensión de oxígeno, la temperatura (45 °C) y el pH (3.5 a 5.0) de la masa de fermentación (Ostovar & Keeney, 1973).

En los últimos días de la fermentación, un bajo número de hongos filamentosos proliferan en la superficie más aireada y fría. Los géneros comúnmente aislados son *Fusarium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Rhizopus*, *Cladosporium*, *Moniliophthora* (Salazar & Lizarazo-Medina, 2021; Copetti et al., 2014). A pesar de que el rol de los hongos no es bien comprendido, algunos pueden hidrolizar la pulpa mediante enzimas extracelulares, generar ácidos y ocasionar sabores desagradables. En semillas originarias de Brasil, según Copetti et al. (2011a) las especies fúngicas predominantes durante la fermentación fueron *Absidia corymbifera*, *Geotrichum candidum*, *Monascus ruber*, *Penicillium paneum* y levaduras.

Se han reportado también *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. niger* y *A. carbonarius* (Copetti et al., 2014).

Durante el secado, la radiación solar o equipos de secado disminuyen gradualmente la humedad aproximada del 55% hasta el 6 a 8% y la actividad de agua (aw) de 0.99 hasta 0.49, que limita la sobrevivencia de la microbiota existente y favorece la germinación y crecimiento de hongos (Copetti et al., 2011b; De Magalhães, 2011). Estas condiciones favorecen el desarrollo de hongos tolerantes a humedades intermedias y xerófila. Se han reportado organismos de las especies *Abs. corymbifera*, *P. paneum*, *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. candidus*, *A. niger*, *A. ochraceus* y *Eurotium chevalieri* (Copetti et al., 2011a; Nielsen et al., 2013; Schawn & Wheals, 2005).

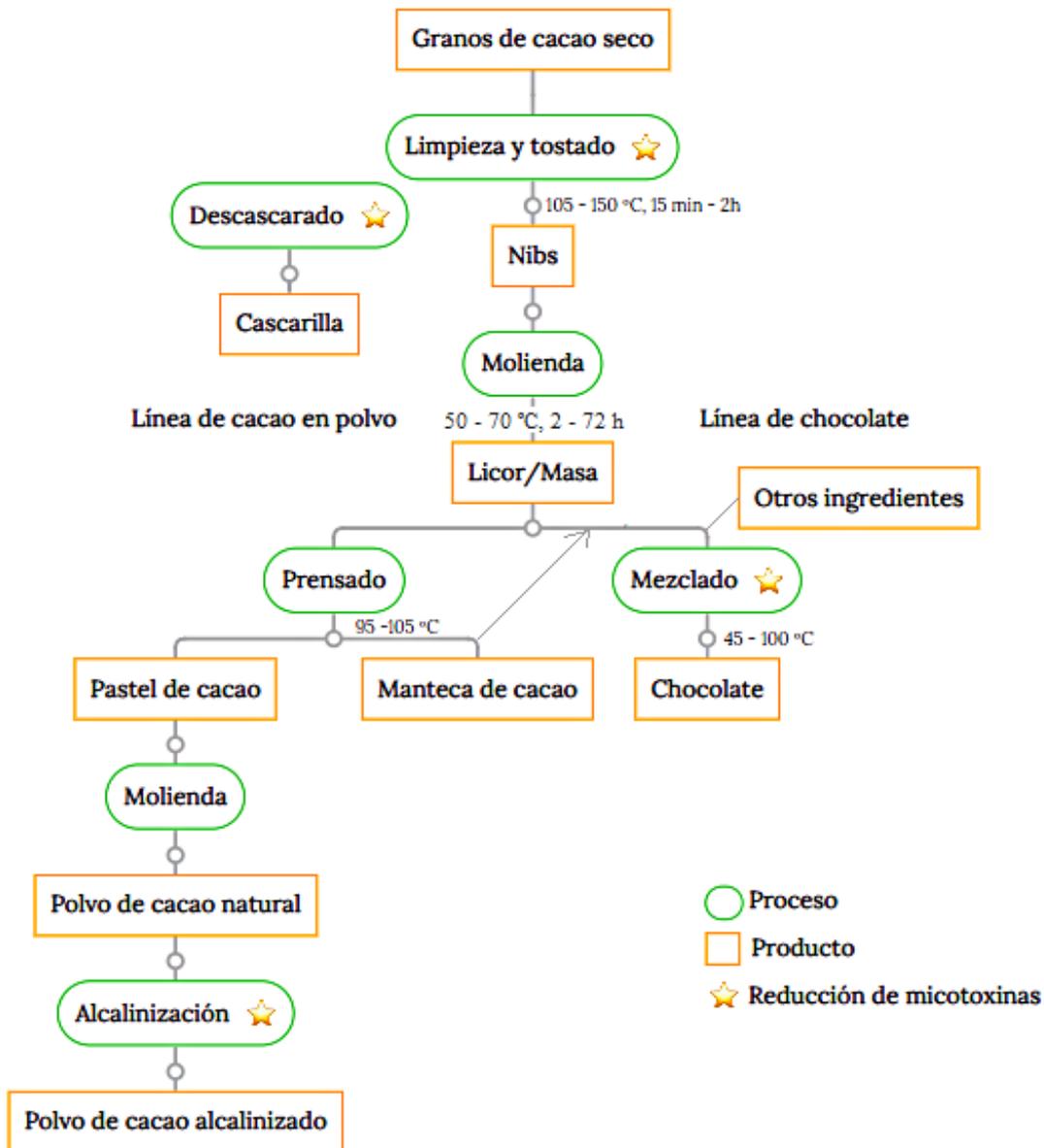
El secado reduce la astringencia, el amargor y la acidez de los granos de cacao y puede promover reacciones que originan compuestos precursores del color distintivo del chocolate (Deus et al., 2018). Los granos secos son higroscópicos, es decir, pueden absorber agua del ambiente durante el almacenamiento y transporte. Condiciones de 8% de humedad o 0.67 de aw en el grano, así como humedad relativa del ambiente inferior al 80%, evitan que los hongos latentes activen su metabolismo y puedan producir micotoxinas (Copetti et al., 2011b; Leandro-Muñoz et al., 2017).

En los granos almacenados, en comparación con los del secado, se ha encontrado mayor cantidad de especies xerófilas del género *Eurotium* y predominan *A. flavus* y *A. niger* (Copetti et al., 2011a). Entre los hongos encontrados por Mounjouenpou et al. (2008) durante la fermentación y secado de granos de cacao originarios de Camerún se destacan *A. fumigatus*, *A. tamarii*, *A. versicolor*, *A. carbonarius*, *A. niger*, *Penicillium sclerotiorum*, *P. paneum*, *P. crustosum*, *Mucor racemosus*, *Rhizopus* spp., *Fusarium* spp. y *Trichoderma* spp. Debido a su

rápido crecimiento las especies de los géneros *Mucor* y *Rhizopus* colonizan los granos antes que las de los géneros *Penicillium* y *Aspergillus*.

### **Procesamiento industrial.**

En el procesamiento tecnológico convencional del cacao (Figura 2), el tostado alcanza temperaturas de 105 a 150 °C durante un tiempo variable de 15 min a 2 h. Este paso asegura la inocuidad del grano al eliminar los microorganismos y producir reacciones químicas para desarrollo del aroma del chocolate (Copetti et al., 2014). El descascarado de la semilla puede ser manual o mecánico por aventado, que es seguido por la fragmentación del cotiledón para originar los nibs. Para obtener licor o pasta de cacao, se muelen los nibs por un período de 2 a 72h entre 50 y 70°C (Copetti et al., 2013). El licor se procesa para fabricar cacao en polvo o chocolate. El chocolate se obtiene mezclando licor y manteca de cacao con lácteos, azúcar/edulcorantes y otros aditivos (FAO & WHO, 2003). El proceso térmico de la homogenización implica condiciones de 45 - 100 °C, mediante el cual se reduce la acidez y humedad y se potencializa la reacción de Maillard (Copetti et al., 2013).



**Figura 3:** Procesamiento industrial de los granos de cacao y principales etapas donde se produce la reducción de micotoxinas.

Fuente: Copetti et al., 2014, con modificaciones.

Durante el tratamiento industrial, el mayor contenido de micotoxinas se elimina principalmente con el descascarado y también aportan los procesos de tostado, alcalinizado y homogenización (Serra, 2004). De la concentración original de OTA en el grano, el descascarado manual puede eliminar del 65 al 100% (Amézqueta et al., 2005) o alcanzar el 50% al hacerlo mecánicamente (Gilmour & Lindblom, 2008).

## Hongos y producción de micotoxinas

Las micotoxinas pueden ser producidas por hongos filamentosos en los cultivos durante las etapas de pre y poscosecha. Se ha descrito una serie de factores que intervienen en la germinación, el crecimiento de los hongos y la producción de micotoxinas. Entre ellos se encuentran factores nutricionales (carbohidratos, aminoácidos, lípidos, nitrógeno y algunos oligoelementos, etc.), factores medioambientales (actividad de agua, temperatura, humedad relativa, pH, luz, gases atmosféricos, etc.) y factores biológicos (tipo de cepa fúngica, otras plantas, insectos, etc.) (Kumar et al., 2021; Mannaa & Kim, 2017; Rustom, 1997). Es importante reconocer que la generación de hongos en alimentos no implica la producción de micotoxinas necesariamente, así como la producción óptima de micotoxinas puede suceder cuando el crecimiento del micelio no es el máximo (Pardo et al, 2006).

La temperatura y actividad de agua son los principales factores ambientales implicados en la germinación, crecimiento y producción de micotoxinas por los hongos (Mannaa & Kim, 2017). En la etapa de secado, los granos poseen una  $a_w$  promedio de 0.81, con variaciones de 0.99 a 0.49, y en el almacenamiento la media es de 0.65, con rango de 0.85 a 0.40 (Copetti et al., 2011b), siendo que 0.75 a 0.85 de  $a_w$  equivale a una humedad aproximada de 6 a 8% (De Magalhães et al., 2011) y granos con humedad de  $6.51 \pm 0.05\%$  presentan  $a_w$  de  $0.62 \pm 0.01$  (Sandoval et al., 2019).

Los principales productores de micotoxinas pertenecen a los géneros *Aspergillus* y *Penicilium*. *Aspergillus* tienen una distribución mundial y causan el deterioro de alimentos y piensos, mientras que *P. verrucosum* es la especie usualmente asociada a la generación de OTA en alimentos en climas templados (Magnoli et al., 2007). En los granos de cacao, *A. flavus*, *A. parasiticus* y *A. nomius* originan las aflatoxinas de los tipos B1, B2, G1 y G2, mientras que

las principales especies asociadas a la producción de OTA son *A. ochraceus* y *Aspergillus* de la sección *Nigri*, incluyendo *A. carbonarius* y *A. niger* (Delgado-Ospina et al., 2021; Maciel et al., 2018). En varios estudios, todos los aislados de *A. carbonarius* fueron capaces de producir OTA, mientras que del 5 al 70% de los aislados de *A. niger* mostraron tal capacidad, aunque con mayores niveles de generación (Copetti et al., 2010; Mounjouenpou et al., 2008; Sánchez-Hervás et al., 2008). Con respecto a los productores de aflatoxinas, el 64% de los aislados de *A. flavus* elaboró aflatoxinas B1 y B2, mientras que un menor porcentaje de los aislados de *A. parasiticus* originó aflatoxinas de los tipos B1, B2, G1 y G2 (Copetti et al., 2010).

El término micotoxinas deriva etimológicamente del vocablo griego mukos o mykes que significa “hongo” y del vocablo latino toxicum que quiere decir “veneno” (Ingle et al., 2020). Estos compuestos son de diversa naturaleza química y se sintetizan por vías metabólicas comunes para la producción de metabolitos secundarios en los hongos (Stroka & Gonçalves, 2018). Su principal función es jugar un papel defensivo contra otros microorganismos, nemátodos, animales y el ser humano (Daou et al., 2021). El contenido de aflatoxinas en alimentos representa un riesgo de salud pública especialmente en naciones en vías de desarrollo (Williams et al., 2004). Según datos de la Unión Europea (2021), las micotoxinas corresponden a la segunda categoría de peligros en los alimentos y piensos importados en el 2020. En el 2016, fueron causantes de 1/3 de rechazos de productos en los puertos de entrada (European Union, 2017). Estos rechazos fueron superiores a los originados por presencia de patógenos, metales pesados y residuos de pesticidas.

### **Aflatoxinas (AF).**

Las aflatoxinas son el tipo de micotoxinas más ampliamente encontrado en los alimentos y son consideradas hepatotóxicas, teratogénicas, mutagénicas y cancerígenas para humanos y

animales (o del grupo 1); siendo que el tipo B1 y la mezcla de aflatoxinas de ocurrencia natural están asociadas al cáncer de hígado (IARC, 2002). El Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) (2007) no instauró la ingesta diaria tolerable (IDT) ni la ingesta semanal tolerable (IST) para aflatoxinas, en espera de que sean los más bajos como sea razonablemente posible.

Las aflatoxinas del tipo B presentan un anillo de ciclopentanona mientras que las del tipo G tienen un anillo de 3 lactona y producen fluorescencia azul (aflatoxinas B1 y B2) o verde (aflatoxinas G1 y G2) al estar bajo el efecto de la luz ultravioleta (IARC, 2002; Maciel et al., 2018). Se conoce de su existencia en los granos de cacao además de maíz, maní, arroz, café, leche y productos lácteos, frutos secos, oleaginosas, huevos, comida de animales, entre otros (Altunay et al., 2020). Generalmente los granos de cacao secos presentan contaminación por aflatoxinas, pero en bajas concentraciones ( $0 - 0.14 \mu\text{g Kg}^{-1}$ ) y porcentajes (5% de las muestras) (Copetti et al., 2011b).

### **Ocratoxina A (OTA).**

La ocratoxina es estructuralmente considerada como un resto de adihidrocumarina unido a L-fenilalanina a través de un enlace amida (Wang et al., 2016). La OTA es un posible carcinógeno humano (o del grupo 2B), debido esencialmente a sus propiedades nefrotóxicas, al haber establecido una clara relación entre la exposición a OTA y la nefropatía porcina en estudios experimentales (IARC, 1993). Según la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) (2006), la IDT de OTA es de aproximadamente 18 ng/kg de peso corporal/día y la IST es de 120 ng/kg de peso corporal.

La ocurrencia natural de OTA es facilitada en climas templados y está asociada a productos como cereales, cacao, café, derivados de la uva, frutos secos, especias, cerveza y

alimentos de origen animal (Magnoli et al., 2007). Durante el procesamiento industrial del cacao, la OTA muestra relativa estabilidad, siendo que su detección en derivados de cacao, como el chocolate, ha aumentado a partir de los años 2000 (Maciel et al., 2018).

Tradicionalmente se ha considerado a la OTA como la micotoxina más prevalente, aunque con niveles bajos, en granos y derivados de cacao obtenidos por procesos convencionales de fermentación y secado (Copetti et al., 2014; Dano et al., 2013). Copetti et al. (2010) encontraron en el 52% de las muestras estudiadas una concentración de micotoxina promedio de  $0.10 \mu\text{g Kg}^{-1}$ , con rango entre  $<0,01$  y  $4,64 \mu\text{g Kg}^{-1}$ . De manera similar, Pires et al. (2019) detectaron OTA en el 22.8% de las muestras analizadas, con un promedio de  $1.2 \mu\text{g Kg}^{-1}$ , con rango entre  $0,25$  y  $7,2 \mu\text{g Kg}^{-1}$ .

#### **Detección de micotoxinas.**

Entre las técnicas más comunes de detección y cuantificación de micotoxinas en alimentos están: prueba de tira reactiva, cromatografía de capa fina (TLC), ELISA, inmunoensayos de polarización de fluorescencia (FPIA), cromatografía líquida de alta resolución con detección de fluorescencia (HPLC-FLD), cromatografía líquida de alta resolución acoplada a detector UV (HPLC-UV) y cromatografía líquida con espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) (Iqbal, 2021). En esta investigación, se utilizó un ELISA competitivo, cuya absorbancia es indirectamente proporcional a la concentración de micotoxinas (Anexo A y Anexo B).

## METODOLOGÍA Y DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

### Muestreo de productos de cacao

Se siguió las directrices de la Unión Europea (European Commission, 2006b) sobre los métodos de muestreo y análisis para el control de los niveles de micotoxinas en alimentos, con modificaciones. Se preparó una muestra compuesta de 1 kg a partir de 3 submuestras, de aproximadamente 350 g cada una. Después de mezclar, se obtuvo una muestra final de 100 g de granos de cacao, nibs y cascarilla, según fue necesario. En este estudio, se recolectaron en total 40 muestras de granos secos de cacao, 4 de nibs y 4 de cascarilla para los dos diseños experimentales.

### Diseños experimentales

#### **Efecto del origen del cacao en la concentración de micotoxinas.**

Se aplicó un diseño completamente aleatorizado (DCA) para evaluar el efecto del origen del cacao (variable de entrada) en la concentración de Aflatoxinas y Ocratoxina A (variables de salida). Se cuantificaron estas micotoxinas presentes en 12 localidades (tratamientos) de la región tropical de América del Sur. Los LMT de AF y OTA establecidos por la legislación brasileña son de  $10 \mu\text{g Kg}^{-1}$  en granos de cacao secos (ANVISA, 2011).

Se obtuvieron 3 muestras de 100 g de granos secos de cacao de 12 orígenes, y se obtuvo 36 unidades experimentales. Después de mezclar cada muestra, una alícuota de 30 g fue molida finamente a máxima velocidad en una licuadora (Oster, México, 004655-013-000) durante 3 minutos. El polvo ( $< 500 \mu\text{m}$ ) se envasó al vacío en fundas de polipropileno de alta densidad ( $80 \mu\text{m}$ ) y se almacenó a  $-18 \text{ }^\circ\text{C}$  hasta ejecutar los análisis. La molienda de las muestras y su

almacenamiento se llevó a cabo en la Planta Piloto de la Universidad San Francisco de Quito (USFQ), Quito-Ecuador.

### **Efecto del origen y tipos de productos en la concentración de micotoxinas.**

Se utilizó un diseño en bloques completamente al azar con arreglo factorial 3x2 (Anexo D) correspondiente a la combinación de tipo de productos (granos, nibs y cascarilla) y origen (localidades 9 y 10) para evaluar el efecto en la concentración de micotoxinas durante los meses de marzo y abril (bloques) considerados como parte de la estación lluviosa (Portilla, 2018). Además del LMT de 10  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  de AF y OTA en granos de cacao, la legislación brasileña estipuló el LMT de micotoxinas para derivados de cacao, como los nibs, de 5  $\mu\text{g Kg}^{-1}$ . En total se colectaron 12 muestras (100g) de granos, nibs y cascarilla siendo 4 muestras de cada tipo de producto (2 por cada mes y por cada localidad). Se tomó una alícuota de 30 g de cada muestra, que fue molida y almacenada como se describió anteriormente.

### **Cuantificación de Micotoxinas**

La ocratoxina A y las aflatoxinas totales se cuantificaron utilizando el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas - ELISA (R-Biopharm AG, Darmstadt, Alemania, art. no. R5402 y R9002, respectivamente). La preparación de las muestras se efectuó en el Laboratorio de Ingeniería Ambiental y los ELISA en el Instituto de Microbiología de la USFQ.

#### **Ocratoxina A.**

Para extraer la Ocratoxina A de cada muestra de granos, nibs o cascarilla, se diluyó 10 g del producto molido con 50 mL de tampón de extracción ECO, se mezcló en el vortex durante 10 s, se agitó por 5 min a 420 rpm y se centrifugó por 5 min a 3500 g. Se preparó la solución de análisis de micotoxinas juntando 1 mL del sobrenadante obtenido de la centrifugación y 1

mL del tampón de muestra. Se utilizaron el vortex BV1000 de Benchmark Scientific Inc., NJ, EE. UU., el agitador MaxQ 4000 de Thermo Scientific, OH, EE. UU. y la centrifugadora Sorvall ST16 de Thermo Fisher, Osterode am Harz, Alemania.

En cada pocillo de la placa de microtitulación se colocaron uno de los estándares provistos o la muestra preparada (50  $\mu$ L) y el conjugado (50  $\mu$ L). Después de 5 min de incubación a temperatura ambiente, se lavaron los pocillos y se añadió 100  $\mu$ L de sustrato/cromógeno. Se dejó reposar la placa durante 3 min a temperatura ambiente antes de agregar 100  $\mu$ L de solución de parada. La reacción colorimétrica se midió utilizando un espectrofotómetro (Bio Teck Instruments Inc., VT, EE. UU., ELx808IU) a 450 nm. La concentración de OTA en las muestras se obtuvo usando la curva estándar logit/log ( $R^2 > 95$  %) en el software Ridasoft Win.Net (R-Biopharm AG, Darmstadt, Alemania, art. no. Z9996FF). El límite de detección del ELISA fue 1.3  $\mu$ g Kg<sup>-1</sup> y la tasa de recuperación de 70-130% para alimentos como el maíz.

### **Aflatoxinas Totales.**

Para extraer las aflatoxinas de cada muestra colectada, se disolvió 5g del producto molido con 25 mL de metanol al 70%. El metanol (99.8% de pureza) se obtuvo de Pharmco – Greenfield Global, CT, EE. UU. y el agua ultrapura (0,047 us cm<sup>-1</sup>) del sistema de purificación de agua Elix Essential 3 (Molsheim, Francia). La mezcla se agitó por 5 minutos a 180 rpm y se separó la parte líquida usando el papel filtro Whatman No.1 (Cytiva, cat. no. 1001 - 125). La solución para cuantificar micotoxinas se preparó con 1 mL del filtrado obtenido y 1 mL de agua destilada.

En cada pocillo de la placa se colocaron 50  $\mu$ L del estándar o de la muestra, 50  $\mu$ L del conjugado y 50  $\mu$ L del anticuerpo. Después de 10 min de incubación a temperatura ambiente,

se lavaron los pocillos y se adicionó 100  $\mu\text{L}$  de cromógeno. La placa se mantuvo por 5 min a temperatura ambiente antes de agregar 100  $\mu\text{L}$  de solución de parada.

Se determinaron la absorbancia y la concentración de AF tal como se describió para OTA. La curva de calibración se construyó usando los valores de los estándares 2, 3, 4, 5, 6, y 7 provistos en el Certificado de Garantía de Calidad del kit. Las concentraciones de las muestras que superaron los 100  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  fueron calculadas en el software. El ensayo tuvo límite de detección de 1.5  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  y tasa de recuperación de 70-120% para alimentos como el maíz.

### **Implicaciones del ensayo.**

Para descontaminar el material de vidrio al final del lavado se utilizó el hipoclorito de sodio ( $\text{NaClO}$ ) al 10% durante toda la noche. No obstante, se observó que concentraciones traza de  $\text{NaClO}$  en el agua de enjuague pueden generar falsos positivos que indican alta concentración de micotoxinas, en comparación con el control (sin cloro), con generación de una baja absorbancia (coloración transparente), probablemente debido a la inactivación de la enzima conjugada HRP que reacciona con el cromógeno. A pesar de que la enzima se une a los anticuerpos en ausencia de micotoxinas, su función puede verse afectada por la presencia de ácido hipocloroso ( $\text{HClO}$ ), una sustancia altamente reactiva producida por la disociación del  $\text{NaClO}$  en agua (Ledford, 2008). El  $\text{HClO}$  causa daños en la estructura tridimensional de las proteínas y en su actividad enzimática, porque logra modificar la cadena lateral y fragmentar o agregar la estructura eje (Hawkins, 2020). Además, la reacción de cloraminación entre el cloro y el grupo amino (N-terminal) forma cloraminas y radicales derivados de proteínas centrados en nitrógeno que pueden fragmentar las proteínas (Estrela et al., 2002; Hawkins & Davies, 1998).

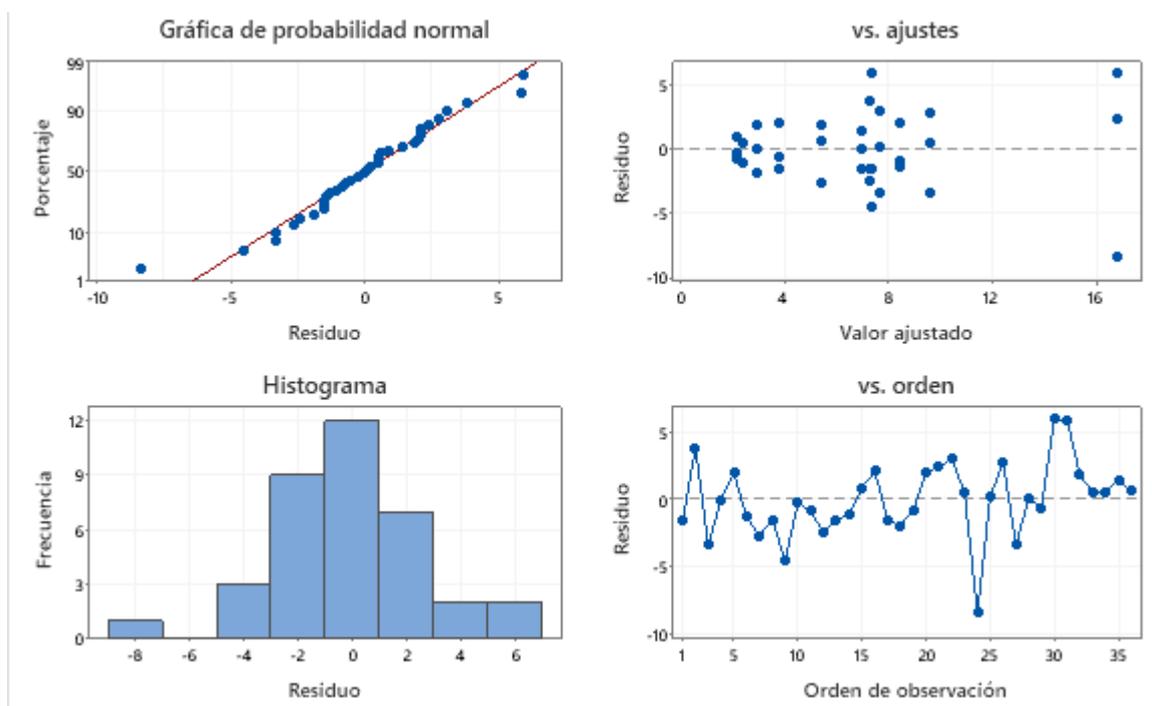
### **Análisis estadísticos**

En ambos diseños experimentales la variable de respuesta fue la concentración de OTA y AF totales ( $\mu\text{g Kg}^{-1}$ ). Los datos fueron evaluados por análisis de varianza (ANOVA) y prueba de separación de medias (Tukey), con nivel de significancia  $p < 0,05$  y con la utilización de Minitab 20.3. También se comprobaron los supuestos de ANOVA de igualdad de varianzas, normalidad y aleatoriedad de los datos. Se efectuó la prueba estadística formal de Levene para evaluar la igualdad de varianzas. Al determinar el efecto del origen, se extrajo la raíz cuadrada de los resultados de AF para alcanzar la homocedasticidad (igualdad de varianzas) (Montgomery, 2013).

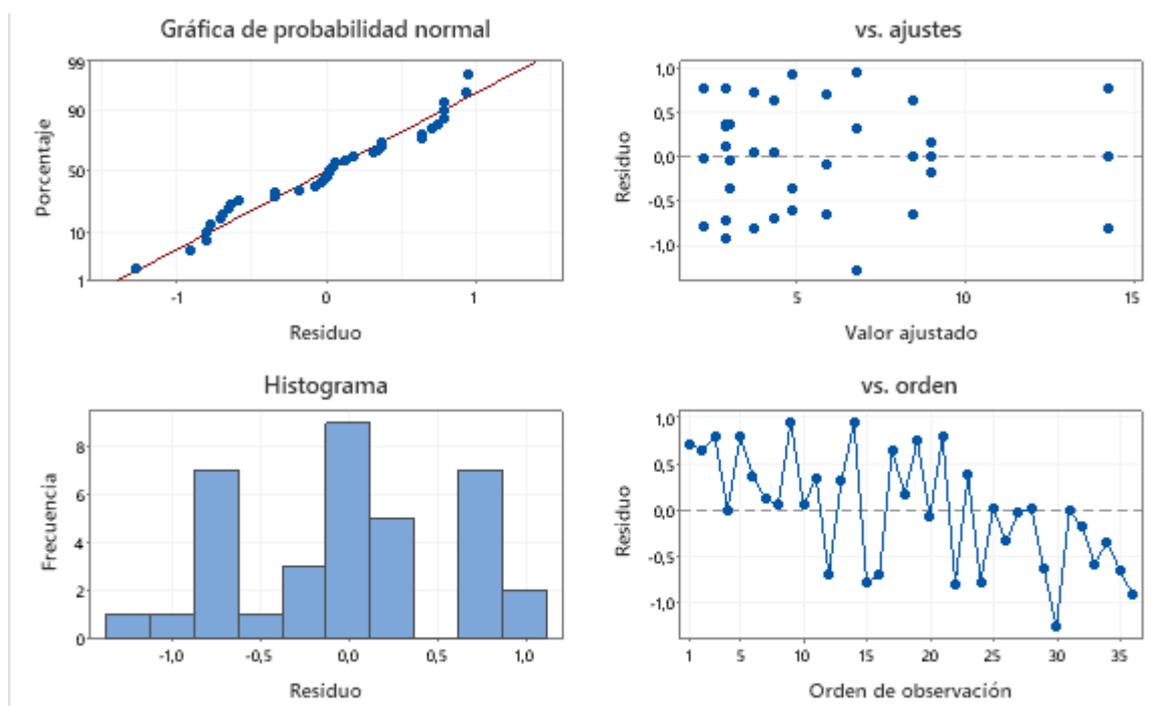
## RESULTADOS

### Efecto del origen del cacao en la concentración de micotoxinas

El contenido de micotoxinas de todos los tratamientos con sus réplicas está detallado en los anexos D y E. En el caso de AF, en el ANOVA y la prueba de Tukey se utilizaron los datos transformados. En las Figuras 5 y 6 se observa que los valores de OTA y AF, respectivamente, cumplieron con los supuestos de normalidad, igualdad de varianzas y aleatoriedad. Existió diferencia significativa en la concentración de OTA y AF de los tratamientos ( $p < 0,05$ ) (Tablas 1 y 2). El coeficiente de determinación ( $R^2$ ) fue 66,67 % para el contenido de OTA y 96,91 % para AF y corresponde a la variabilidad del factor respuesta explicada por el modelo matemático resultante del experimento.



**Figura 4:** Gráficas de residuos para concentración de OTA en función del origen ( $\mu\text{g Kg}^{-1}$ ).



**Figura 5:** Gráficas de residuos para concentración de AF en función del origen ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ).

**Tabla 1:** Análisis de varianza (ANOVA) de la concentración de OTA ( $\mu\text{g Kg}^{-1}$ ) de los tratamientos.

Fuente de Variación	GL	SC	CM	Valor P
Origen	11	514,40	49,21	0,001 <sup>1</sup>
Error	24	270,70	11,28	
Total	35	812,00		

<sup>1</sup>Significativamente diferente (valor  $p < 0,05$ ).

**Tabla 2:** Análisis de varianza (ANOVA) de la concentración de AF ( $\mu\text{g Kg}^{-1}$ ) de los tratamientos.

Fuente de Variación	GL	SC	CM	Valor P
Origen	11	401,38	36,49	0,000 <sup>1</sup>
Error	24	12,80	0,53	
Total	35	414,18		

<sup>1</sup>Significativamente diferente (valor  $p < 0,05$ ).

Como se observa en la Tabla 3, hubo diferencia significativa en la concentración de OTA entre las localidades 12 y 1, 9, 8, 5, 2, 6 que no fueron diferentes significativamente entre

si. En la Tabla 4 se muestran los datos obtenidos y ajustados (al aplicar raíz cuadrada) de la concentración de AF. La mayor producción de AF se observó en el origen 3 con media ajustada de  $14.22 \mu\text{g Kg}^{-1}$  que difirió significativamente del resto de tratamientos ( $p < 0,05$ ). En los granos de cacao de todos los orígenes se encontró OTA y AF, con medias más elevadas de AF en varios de estos (Tablas 3 y 4).

**Tabla 3:** Concentración de OTA en granos de cacao de 12 orígenes (tratamientos).

Origen <sup>1</sup>	Concentración ( $\mu\text{g Kg}^{-1}$ ) <sup>2,3</sup>
12	<b><math>16.86 \pm 7.43</math> a</b>
11	$9.65 \pm 3.10$ ab
10	$8.45 \pm 1.84$ ab
3	$7.69 \pm 3.19$ ab
4	$7.40 \pm 5.39$ ab
7	$7.30 \pm 3.38$ ab
1	$6.94 \pm 1.48$ b
9	$5.41 \pm 2.39$ b
8	$3.81 \pm 1.88$ b
5	$2.95 \pm 1.88$ b
2	$2.36 \pm 0.92$ b
6	$2.15 \pm 0.84$ b

<sup>1</sup> Humedad del grano seco de 2 a 3% en las localidades 9, 10, 11 y 12 y humedad de aproximadamente 8% en las otras localidades.

<sup>2</sup> Media  $\pm$  desviación estándar

<sup>3</sup> Medias que comparten al menos una letra son significativamente iguales ( $p < 0.05$ ) por la prueba de Tukey.

**Negrita:** Muestras que superan el LMT de  $10 \mu\text{g Kg}^{-1}$ .

**Tabla 4:** Concentración de AF en granos de cacao de 12 orígenes (tratamientos).

Origen <sup>1</sup>	Concentración ( $\mu\text{g Kg}^{-1}$ ) <sup>2</sup>	Concentración ajustada ( $\mu\text{g Kg}^{-1}$ ) <sup>2,3</sup>
3	<b>202.75 ± 31.93</b>	14.22 ± 1.12 a
5	<b>81.31 ± 4.50</b>	9.02 ± 0.25 b
1	<b>72.28 ± 15.39</b>	8.48 ± 0.91 bc
4	<b>47.13 ± 15.06</b>	6.80 ± 1.14 cd
8	<b>35.32 ± 8.08</b>	5.92 ± 0.68 de
2	<b>23.99 ± 8.30</b>	4.85 ± 0.82 def
7	<b>18.82 ± 5.71</b>	4.30 ± 0.67 efg
6	<b>14.43 ± 8.09</b>	3.72 ± 1.09 fg
11	9.15 ± 2.17	3.01 ± 0.36 fg
9	8.94 ± 4.84	2.91 ± 0.86 fg
10	8.65 ± 3.34	2.90 ± 0.61 fg
12	5.57 ± 3.59	2.27 ± 0.78 g

<sup>1</sup> Humedad del grano seco de 2 a 3% en las localidades 9, 10, 11 y 12 y humedad de aproximadamente 8% en las otras localidades.

<sup>2</sup> Media ± desviación estándar

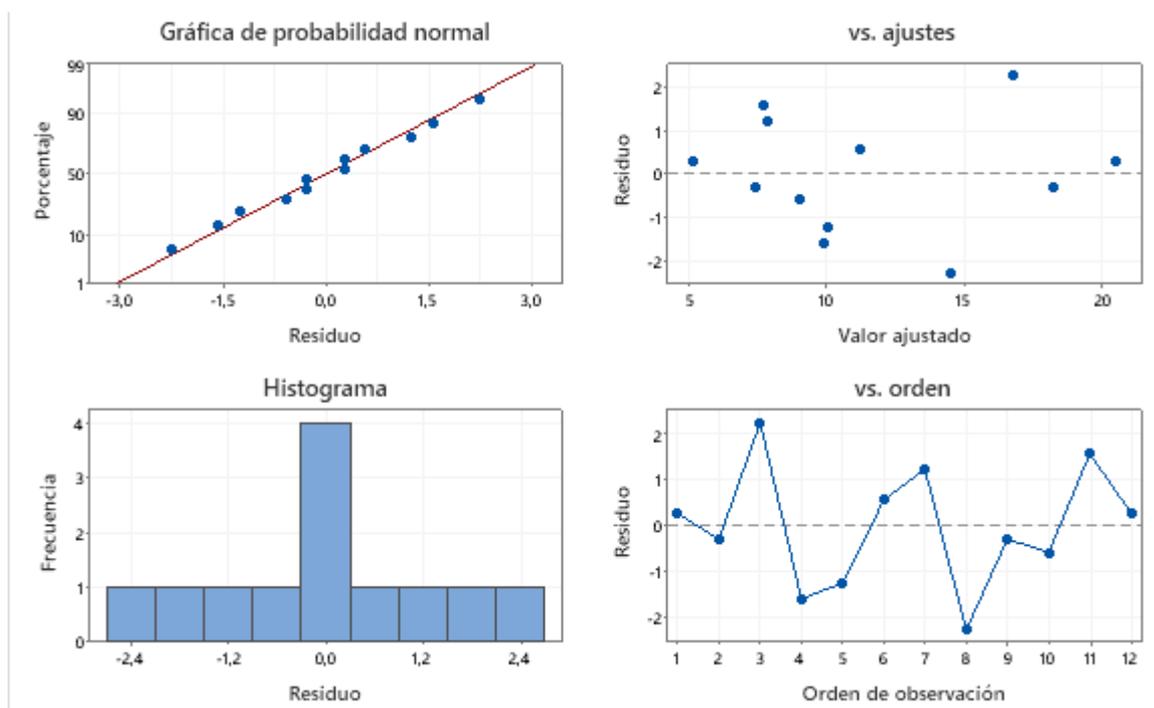
<sup>3</sup> Medias que comparten al menos una letra son significativamente iguales ( $p < 0.05$ ) por la prueba de Tukey.

**Negrita:** Muestras que superan el LMT de  $10 \mu\text{g Kg}^{-1}$ .

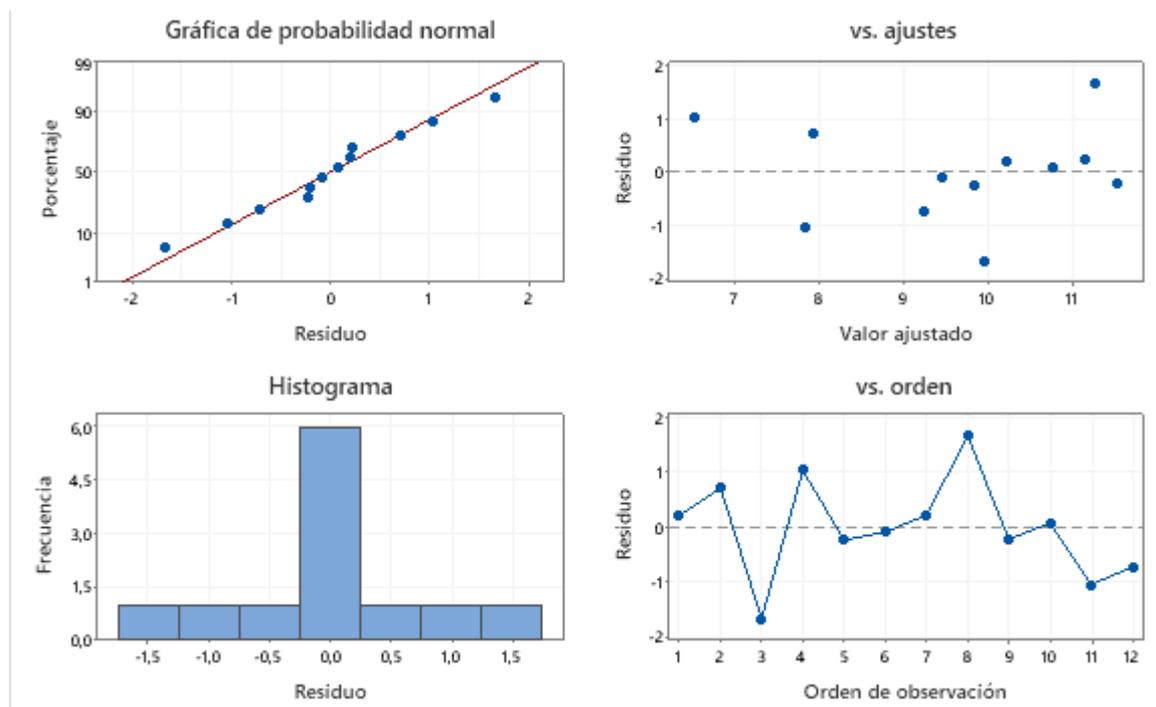
Según la Unión Europea (European Commission, 2006b) es necesario determinar la concentración de micotoxinas en muestras de al menos 1 kg o del valor promedio de varias submuestras que alcancen dicho peso, para aceptar o rechazar un lote de alimentos, como en el caso de los frutos secos y frutos con cáscara (maní, pistachos, nueces, etc.). En el presente estudio (Tabla 3) todas las muestras presentaron niveles de OTA inferiores al LMT especificado, excepto la localidad 12 ( $16,86 \mu\text{g Kg}^{-1}$ ). Por otro lado, únicamente los lugares 9, 10, 11 y 12 exhibieron contenidos inferiores al LMT de AF, entre  $5,57$  y  $9,15 \mu\text{g Kg}^{-1}$  (Tabla 4). En el origen 12 se cuantificó una de las más altas concentraciones de OTA y una de las menores de AF con  $16,86$  y  $5,57 \mu\text{g Kg}^{-1}$ , respectivamente (Tablas 3 y 4).

#### **Efecto del origen y tipos de productos en la concentración de micotoxinas**

Los supuestos de normalidad, igualdad de varianzas y aleatoriedad en la concentración de OTA y AF se muestran en las Figuras 7 y 8. De acuerdo al análisis de varianza (Tablas 5 y 6), el  $R^2$  de OTA fue 93,14% y de 74,62% para AF que corresponde a la variabilidad de la variable de salida explicada por el modelo matemático derivado del experimento. Los modelos matemáticos de los análisis de varianza (ANOVA), compuestos por uno o dos factores de entrada dependiendo del diseño experimental, explican la variabilidad de la concentración de las micotoxinas de forma aceptable al ser superiores al 50% y con mayor exactitud al estar cerca del 100% (Montgomery, 2013). Este hecho es positivo para una comprensión acertada de la influencia del origen y tipo de productos en el contenido de OTA y AF. Por otro lado, el bloqueo fue efectivo ( $p > 0,05$ ), es decir, no existió efecto de los bloques en la concentración de micotoxinas (Montgomery, 2013).



**Figura 6:** Gráficas de residuos para concentración de OTA en función del origen y tipo de producto ( $\mu\text{gKg}^{-1}$ ).



**Figura 7:** Gráficas de residuos para concentración de AF en función del origen y tipo de producto ( $\mu\text{g Kg}^{-1}$ ).

**Tabla 5:** Análisis de varianza (ANOVA) de la concentración de OTA ( $\mu\text{g Kg}^{-1}$ ) de los tratamientos.

Fuente de Variación	GL	SC	CM	Valor P
Producto	2	43,45	21,723	0,052 <sup>n.s.</sup>
Origen	1	149,74	149,743	0,002 <sup>1</sup>
Producto*Origen	2	52,68	26,338	0,037 <sup>1</sup>
Bloque	1	14,9	14,896	0,106 <sup>n.s.</sup>
Error	5	19,21	3,843	
Total	11	279,97		

<sup>1</sup>Significativamente diferente ( $p < 0,05$ ).

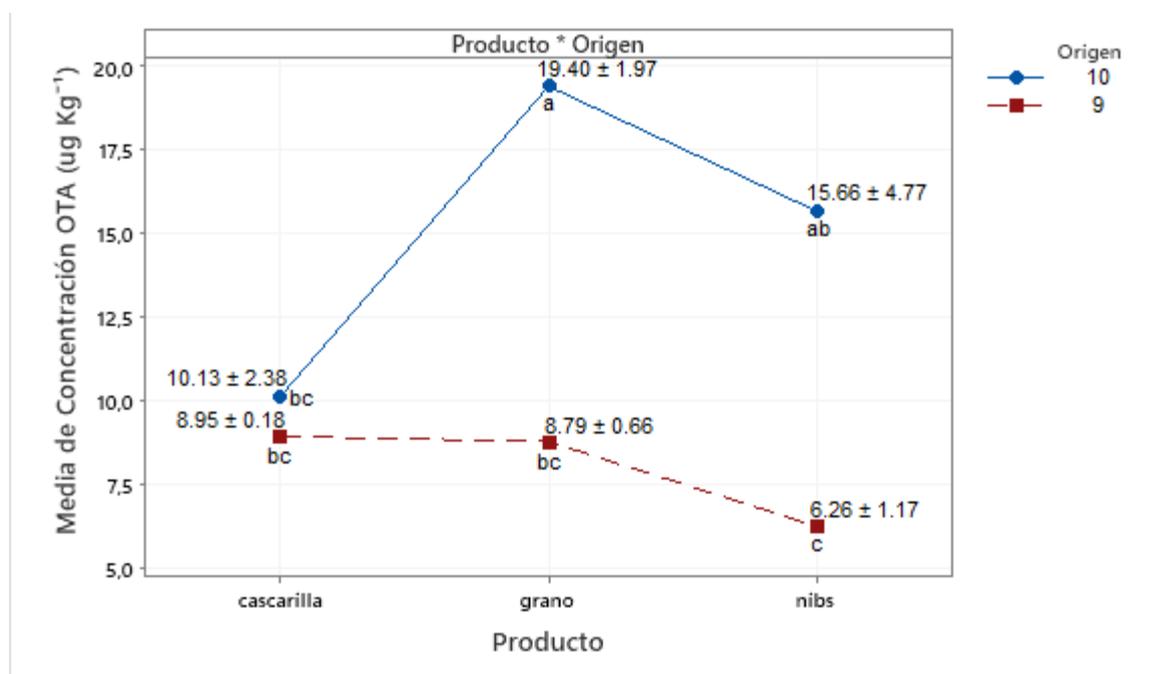
<sup>n.s.</sup> no significativo ( $p > 0,05$ ).

**Tabla 6:** Análisis de varianza (ANOVA) de la concentración de AF ( $\mu\text{g Kg}^{-1}$ ) de los tratamientos.

Fuente de Variación	GL	SC	CM	Valor P
Producto	2	3,247	1,623	0,462 <sup>n.s.</sup>
Origen	1	9,594	9,594	0,069 <sup>n.s.</sup>
Producto*Origen	2	8,398	4,199	0,192 <sup>n.s.</sup>
Bloque	1	5,188	5,188	0,150 <sup>n.s.</sup>
Error	5	8,986	1,797	
Total	11	35,413		

<sup>n.s.</sup> no significativo ( $p > 0,05$ ).

Se evidenció la interacción significativa de los factores Producto\*Origen ( $p < 0.05$ ) en la concentración de OTA (Tabla 5). Al considerar el mismo tipo de producto en ambos sitios, se observa en la Figura 9 menor concentración de esta micotoxina en los granos y nibs de la localidad 9 con respecto a la 10 ( $p < 0.05$ ). No obstante, no hubo diferencia significativa en el contenido de OTA en la cascarilla de ambos lugares, con medias de  $8.95$  y  $10.13 \mu\text{g Kg}^{-1}$  ( $p > 0.05$ ). Además, en el origen 10 se determinó una mayor presencia en granos ( $19.40 \mu\text{g Kg}^{-1}$ ) que en la cascarilla ( $10.13 \mu\text{g Kg}^{-1}$ ), mientras que no existió diferencia significativa entre los 3 tipos de productos del sitio 9.



**Figura 8:** Interacción del origen y tipo de producto en la concentración de OTA.

Medias que comparten al menos una letra son significativamente iguales ( $p < 0.05$ ) por la prueba de Tukey.

Por otra parte, no hubo diferencia significativa de la concentración de AF en los granos, nibs y cascarilla de ambas localidades (Tabla 6). La interacción Producto\*Origen ni el efecto de cada factor de forma independiente influyeron en la concentración de la micotoxina ( $p > 0.05$ ) (Tabla 6).

Los granos del origen 9 estuvieron debajo del límite especificado de  $10 \mu\text{g Kg}^{-1}$  de OTA y AF, con  $8.79$  y  $7.19 \mu\text{g Kg}^{-1}$  respectivamente (Figura 9, Tabla 7), mientras que en el sitio 10 presentaron valores superiores al LMT de ambas micotoxinas, con  $10.89$  y  $19.40 \mu\text{g Kg}^{-1}$  de AF y OTA, respectivamente. Por otro lado, las concentraciones de OTA y AF en nibs de ambas localidades fueron superiores al nivel máximo de  $5 \mu\text{g Kg}^{-1}$  (entre  $6.26$  y  $15.66 \mu\text{g Kg}^{-1}$ ).

**Tabla 7:** Concentración de AF totales en granos, nibs y cascarilla.

Producto*Origen	Concentración ( $\mu\text{g Kg}^{-1}$ ) <sup>1</sup>
Granos, 10	<b><math>10.89 \pm 0.63</math></b>
Nibs, 10	<b><math>10.64 \pm 4.77</math></b>
Cascarilla, 10	$10.12 \pm 2.38$
Cascarilla, 9	$10.50 \pm 0.18$
Granos, 9	$7.19 \pm 0.66$
Nibs, 9	<b><math>8.60 \pm 1.17</math></b>

<sup>1</sup> Media  $\pm$  desviación estándar

**Negrita:** Muestras que superan el LMT de  $10 \mu\text{g Kg}^{-1}$ .

**Rojo:** Muestras que superan el LMT de  $5 \mu\text{g Kg}^{-1}$ .

## DISCUSIÓN

Al considerar el efecto de la procedencia del cacao, todas las muestras exhibieron OTA y las mayores concentraciones de  $7.30 \mu\text{g Kg}^{-1}$  hasta  $16.86 \mu\text{g Kg}^{-1}$  se identificaron en 3, 4, 7, 10, 11 y 12 (Tabla 3). Kedjebo et al. (2015) también reportaron OTA en 71% de las muestras de granos de cacao secos de Costa de Marfil, con contenidos máximos de  $39.2 \mu\text{g Kg}^{-1}$  (en menos del 10% de los ejemplares). Esto sucedió cuando el retraso en la apertura de la mazorca fue prolongado (7 días), los frutos tuvieron un estado sanitario deficiente y no se ejecutó el proceso de mezclado durante la fermentación realizada en cajas de plástico. De igual manera, De Magalhães et al. (2011) encontraron alta ocurrencia de esta micotoxina en el 70.3% de granos de cacao de Brasil obtenidos en los meses húmedos de temperaturas suaves ( $30 \text{ }^\circ\text{C}$ ), no obstante, solo el 7.4% tuvo un nivel superior a  $2 \mu\text{g Kg}^{-1}$ . En esta investigación, de todas las localidades, el 8.3% (origen 12) excedió el límite de  $10 \mu\text{g Kg}^{-1}$  establecido por la ANVISA. Del mismo modo, Maciel et al. (2018) hallaron contenidos superiores al LMT en el 12% de las muestras de granos de cacao de origen brasileño (16 de 131), con medias de hasta  $78.28 \mu\text{g Kg}^{-1}$  y detección máxima de  $274,9 \mu\text{g Kg}^{-1}$ .

Por otro lado, se detectaron aflatoxinas en todas las muestras con promedios entre 5.57 y  $202.75 \mu\text{g Kg}^{-1}$  y en 8 localidades (67%) se sobrepasó el LMT recomendado por la ANVISA (Tabla 4). La concentración, el porcentaje de ocurrencia y el porcentaje de localidades que sobrepasaron el LMT son atípicos según la literatura. Pires et al. (2019) reportaron AF totales en 16.3% de las muestras de granos de cacao producidos en Brasil, con media de  $5,7 \mu\text{g Kg}^{-1}$  y rango entre 0,35 y  $30 \mu\text{g Kg}^{-1}$ . Maciel et al. (2018) encontraron estas micotoxinas en 38% de las muestras analizadas con rango entre  $<0.13$  y  $17.80 \mu\text{g Kg}^{-1}$ . Además, tanto Pires et al. (2019)

como Maciel et al. (2018) cuantificaron valores superiores a  $10 \mu\text{g Kg}^{-1}$  únicamente en el 3% de las muestras analizadas.

Los granos se secaron hasta el 2 a 3% de humedad en las localidades (9, 10, 11 y 12) que tuvieron algunas de las menores concentraciones de AF y no superaron el LMT estipulado por la ANVISA, mientras que en los demás sitios el nivel adecuado de secado se determinó empíricamente en función del color y textura característicos de la semilla seca con 8% de humedad, tal como se realiza cotidianamente en las fincas (Copetti et al., 2010). A pesar de ser una práctica común, con base en los resultados se infiere que es necesaria la adopción de sistemas de control que permitan asegurar el secado del cacao entre 6 y 8% de humedad para evitar la aparición de hongos y producción de AF en etapas posteriores. Aunque generalmente el almacenamiento de granos secos no se realiza en silos (con condiciones controladas de temperatura y humedad relativa) sino en sacos limpios apilados encima de tarimas, no se espera una alta ocurrencia de micotoxinas si se mantienen baja humedad relativa y temperatura (Copetti et al., 2011a; Dano et al., 2013). Así, la alta humedad relativa aumenta la probabilidad de la germinación de esporas, crecimiento de hongos y producción de micotoxinas (Copetti et al., 2011a). En el maní, *Aspergillus parasiticus* se desarrolló a temperatura óptima de 25-35 °C y humedad relativa del 82%, siendo capaz de soportar humedad del grano mínima del 8 al 10% y la generación de AF fue óptima entre 28 y 30 °C y humedad del alimento del 15 al 35% (Rustom, 1997).

Además de la humedad, las condiciones de procesamiento primario pueden haber influenciado en la concentración de aflatoxinas e incluso en la coocurrencia natural de AF y OTA. Maciel et al. (2018) reportaron de  $<0.13$  a  $17.80 \mu\text{g Kg}^{-1}$  de aflatoxinas en granos de cacao producidos en Brasil al seguir métodos tradicionales de tratamiento primario (solo el 3%

de las muestras sobrepasaron los  $10 \mu\text{g Kg}^{-1}$ ), como se presume que fue realizado en los centros de acopio de las localidades 6, 7, 9, 10, 11 y 12, donde se encontraron contenidos entre 5.57 y  $18.82 \mu\text{g Kg}^{-1}$  (Tabla 4). Los autores describen que las semillas obtenidas inmediatamente después de la cosecha fueron fermentadas por 5 días en cajas de madera y secadas naturalmente en plataformas del mismo material por 7 días, mezclándolas 2 veces al día hasta alcanzar una humedad aproximada del 6% y se encontró coocurrencia de AF y OTA en el 5% de las muestras. Sin embargo, son cuestionables las prácticas poscosecha aplicadas en los granos de los orígenes 1, 2, 3, 4, 5 y 8, que correspondieron a centros de acopio de grano seco (después de la fermentación y secado realizados probablemente de forma casera), aunque todos los orígenes analizados (100%) presentaron ambas micotoxinas.

Al considerar la fermentación, el crecimiento de hongos es inhibido por las altas concentraciones de alcohol y bajo pH, altas temperaturas y condiciones microaerófilas, sin embargo, existen factores que pueden favorecer el desarrollo fúngico y posteriormente la generación de AF y OTA (Delgado-Ospina et al., 2021). Las bajas temperaturas ( $< 40 \text{ }^\circ\text{C}$ ) en los dos primeros días (condición anaerobia) no logran evitar el crecimiento de hongos debido a que el calor se disipa fácilmente en pequeños lotes de procesamiento ( $< 50 \text{ Kg}$ ). Otra causa es la falta de anaerobiosis asociada a la entrada de aire en la cámara de fermentación o a la deshidratación de los granos provenientes de mazorcas almacenadas por largos periodos. Igualmente sucede cuando existe disminución de la humedad relativa en las capas superiores de la masa fermentativa a partir del tercer día (condición aerobia). A pesar de que se han reportado hongos toxigénicos en menos del 5% de muestras de granos de cacao fermentados, estos son el inóculo para la proliferación microbiana y producción de micotoxinas en etapas subsecuentes. Se han detectado concentraciones de  $0.02 \mu\text{g Kg}^{-1}$  de AF y  $0.05 \mu\text{g Kg}^{-1}$  de OTA (Copetti et al., 2011b; Copetti et al., 2014; Gilmour & Lindblom, 2008).

Entre los principales factores que pueden originar a altos niveles de micotoxinas durante el tratamiento primario están la integridad de la mazorca, el tiempo de almacenamiento antes de la apertura, la mezcla de granos durante la fermentación, el tiempo de secado, la humedad en el almacenamiento y las condiciones sanitarias de las herramientas o equipos (cuchillos, machetes, cestas e incluso manos de los trabajadores) utilizados (Dano et al., 2013; Kedjebo et al., 2015). Cuando Kedjebo et al. (2015) fermentaron y secaron granos de cacao provenientes de mazorcas dañadas o deterioradas, la concentración promedio de OTA fue  $4.6 \mu\text{g Kg}^{-1}$ , con valores máximos de  $39.2 \mu\text{g Kg}^{-1}$ , en comparación a las semillas de frutos sanos (en buen estado sanitario) que tuvieron una media de  $1.2 \mu\text{g Kg}^{-1}$  y un contenido máximo de  $11.2 \mu\text{g Kg}^{-1}$ . Mounjouenpou et al. (2008) observaron que cuando la apertura de la mazorca de cacao sana se hizo después de 10 días favoreció el crecimiento de especies con potencial toxigénico, como *Aspergillus carbonarius* y *A. niger*, con mayor predominancia de la última. Además, cuando los frutos cosechados, se abrieron parcialmente y después de 10 días se extrajeron los granos, existió alta proliferación de *A. carbonarius*, *A. niger* y especies del género *Fusarium*. Bajo estas circunstancias se aislaron la mayoría de las cepas de *A. carbonarius* y se reportó la contaminación más alta de OTA ( $48.8 \text{ ng g}^{-1}$ ). También Copetti et al. (2010) encontraron *A. carbonarius* en granos de mazorcas que fueron lastimadas al ser recogidas.

Al evaluar el efecto de los frutos en mal estado y el mezclado de los granos en la fermentación, Kedjebo et al. (2015) observaron que al no mover la masa de granos se cuantificaron mayores concentraciones de OTA ( $6 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) con respecto a la volteada a las 48 y 96 h del proceso ( $3.3 \mu\text{g kg}^{-1}$ ). Por otro lado, al determinar la influencia del retraso de 7 días en la apertura de la mazorca de cacao y el volteado de las semillas en el proceso fermentativo, se obtuvo un contenido de OTA menor cuando se mezcló ( $4.2 \mu\text{g Kg}^{-1}$ ) en comparación a cuando no se realizó este procedimiento ( $7.8 \mu\text{g Kg}^{-1}$ ). Al aumentar la frecuencia del mezclado

se evita la proliferación de hongos en la capa más interna y el desarrollo de especies productoras de micotoxinas (Maciel et al., 2018; Nielsen et al., 2013).

Es importante notar que el secado y almacenamiento son las etapas en las cuales se han aislado hongos toxigénicos con mayor frecuencia, con niveles de OTA y AF de aproximadamente  $0.13 \mu\text{g Kg}^{-1}$  (Copetti et al., 2011a; Copetti et al., 2010). A pesar de la reducción de la actividad de agua en los granos en el secado, pueden predominar hongos xerófilos con potencial toxigénico y a medida que se prolonga el secado ( $> 7$  días), mayor es la probabilidad de que se contamine con microorganismos provenientes de agentes como insectos, pájaros, roedores y otros animales, al ser un proceso que se realiza al aire libre (Delgado-Ospina et al., 2021). La práctica del secado de los granos en las carreteras de asfalto en América Latina ocasiona que estos sean más susceptibles al contacto con materiales indeseables (FAO & WHO, 2013; Sánchez et al., 2019). Además, el piso de madera utilizado en el secado es susceptible a malas condiciones higiénicas que pueden favorecer la alta carga hongos y micotoxinas, por ejemplo, Copetti et al. (2010) y Copetti et al. (2013) detectaron cepas de *A. niger*, *A. carbonarius* y, en menor medida, *A. melleus*, *A. ochraceus* y *A. westerdijkiae*, con concentración máxima de  $5.54 \mu\text{g kg}^{-1}$  de OTA. Durante el almacenamiento, la actividad metabólica de algunos hongos puede originar micotoxinas debido a un insuficiente secado o inadecuadas condiciones de almacenamiento que provoquen alta humedad en los granos ( $>8\%$ ), como, por ejemplo, contacto de los granos con agua y humedad relativa superior a 80% por largo tiempo (Delgado-Ospina et al., 2021; Nielsen et al., 2013; Schwan & Wheals, 2004). Debido al bajo contenido de sólidos solubles, el incremento de la actividad de agua es rápido en los granos de cacao y beneficia el desarrollo de hongos durante el almacenamiento y transporte.

Los genes responsables por la producción de metabolitos secundarios generalmente están agrupados en clusters, incluyendo al menos un gen regulador de la transcripción (Gil-Serna et al., 2019). En *A. flavus* y *A. parasiticus*, la ruta biosintética de las aflatoxinas involucra el cluster 54 que contiene 30 genes y su activación es coordinada por aflR y aflS (Caceres et al., 2020). AflR es el principal regulador del clúster, mientras que el aflS potencia el control del proceso biosintético. La elaboración de aflatoxinas involucra mínimo 27 reacciones enzimáticas, pasando por los intermediarios ácido norsolórico, versicolorina A, esterigmatocistina y, finalmente, aflatoxina B1 (Caceres et al., 2020; Mohammed et al., 2021). En *A. westerdijkiae*, *A. niger*, *A. welwitschiae* y *A. carbonarius*, el cluster de genes implicado en la biosíntesis de OTA posee 4 genes estructurales, acoplados a el factor transcripcional bZIP que modula su expresión (Gil-Serna et al., 2019). Los genes codifican las enzimas policétido sintasa, péptido sintetasa no ribosomal, citocromo p450 monooxigenasa y halogenasa, siendo que el gen codificador de la esterasa está fuera del cluster.

La generación de micotoxinas también depende de genes involucrados en el metabolismo fúngico que responden a la influencia de estímulos ambientales y que pueden activar diversas rutas metabólicas para regular la expresión genética de los clusters (Caceres et al., 2020). Entre estos procesos se encuentran la señalización celular, la reproducción, el crecimiento y la respuesta al estrés oxidativo y al estrés osmótico. Por ejemplo, altos niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) activan genes que favorecen la síntesis de aflatoxinas y OTA (Roze et al., 2015). En el crecimiento fúngico intervienen factores ambientales asociados a alimentos como el pH, el tiempo de almacenamiento, la humedad, la exposición a la luz etc., siendo la actividad de agua y la temperatura pueden modular la expresión de varios genes, incluidos los reguladores aflR y aflS (Caceres et al., 2020; Gil-Serna et al., 2019). *A. parasiticus* no generó aflatoxinas en harina de trigo, mantenida a 30 °C y 15 % de humedad durante 11 días

(Akinola et al., 2021). Al evaluar el efecto de diferentes longitudes de onda, *A. carbonarius* redujo la producción de OTA ante la exposición a luz blanca, mientras que sucedió lo contrario en la presencia de luz roja (Cheong et al., 2016). Inhibir la expresión de aflR y aflS a través de productos naturales constituye una estrategia promisoriosa para obstaculizar la producción de aflatoxinas, sin afectar al funcionamiento celular, la diversidad microbiana y sin riesgo de desarrollar resistencia (Caceres et al., 2020).

Las concentraciones de AF presentan desviaciones estándar de 15 unidades en las localidades 1 y 4 y 32 unidades en el lugar 3. La amplia variación en estos datos puede ser el reflejo del crecimiento de los hongos en micropropágulos. Aunque Raters (2007) observó que la contaminación del grano por AF y OTA, provenientes de una solución de fermentación artificial, afectó a la unidad fermentativa como un todo (masa de granos de cacao) en lugar de a las semillas individuales, la proliferación de mohos y la producción de micotoxinas puede darse en hotspots (algunas zonas con mayor ocurrencia) durante el secado, que es la etapa crítica para el desarrollo de los hongos con potencial toxigénico (Copetti et al., 2011a). La germinación de esporas y crecimiento del micelio en microcolonias sucede con mayor frecuencia en semillas atacadas por insectos, mutiladas y podridas (Bastide et al., 2006). En los alimentos la distribución de micotoxinas no es homogénea, siendo que solamente el 0.1% de una muestra podría tener altos niveles de estos contaminantes (Iqbal, 2021).

En el segundo diseño experimental, los nibs de los orígenes 9 y 10 mostraron 6.26 y 15.66  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  de OTA, respectivamente, así como AF desde 8.60  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  (Figura 9, Tabla 7). Estos resultados sobrepasan los hallazgos de Copetti et al. (2013) y Copetti et al. (2012b) de  $0.10 \pm 0.12 \mu\text{g Kg}^{-1}$  de OTA y  $1.04 \pm 2.69 \text{ ng g}^{-1}$  de AF, respectivamente, en los nibs fabricados a partir de materia prima de origen brasileño, africano y asiático. Además, las concentraciones

de AF y OTA en granos y nibs de cada localidad fueron estadísticamente iguales, es decir, no fue evidente la disminución del contenido de micotoxinas en los nibs a causa de su retención en la cascarilla (entre 8 y 10  $\mu\text{g Kg}^{-1}$ ). De hecho, se han reportado menores cuantificaciones de  $1.13 \pm 1.28 \mu\text{g Kg}^{-1}$  de OTA y  $0.34 \pm 0.32 \text{ ng g}^{-1}$  de AF en este subproducto (Copetti et al., 2012b; Copetti et al., 2013).

Para Copetti et al. (2013) la reducción del 93.6% de OTA en el procesamiento industrial del chocolate fue atribuida a tres procedimientos: la destrucción de la molécula por el tratamiento térmico del tostado, su eliminación física de la cáscara y la adición de otros ingredientes no contaminados (efecto de dilución). Al aplicar 150 °C por 40 min se disminuyó la OTA de  $9.46 \mu\text{g Kg}^{-1}$  en los granos secos a  $1.36 \mu\text{g Kg}^{-1}$  en los nibs (16.6%), siendo que el 82.9% de la micotoxina remanente se detectó en la cáscara. Por otro lado, en el maní sometido a 150 °C por 30 min se desintegraron el 48% de aflatoxinas presentes naturalmente, con una concentración inicial de  $370 \mu\text{g Kg}^{-1}$  (Pluyer et al., 1987). Sin embargo, al aplicar el el tostado de los granos a 132 °C por 10 min puede no reducir las micotoxinas presentes. Son necesarias más investigaciones que evalúen el impacto de este método de elaboración en los niveles de AF y OTA antes y después de la exposición térmica.

En el procesamiento “raw” el chocolate que se produce con cacao seco sin o con mínima aplicación de procesos térmicos. El tueste ligero del cacao es una innovación tecnológica que responde a la demanda de alimentos funcionales, al minimizar la reducción de compuestos fenólicos, metilxantina y otras moléculas bioactivas (Deus et al., 2018). Los flavonoides del cacao, especialmente epicatequina, catequina y procianidinas, son responsables por sus efectos beneficiosos sobre la diabetes, obesidad, hipertensión, resistencia a la insulina, aterotrombosis, degeneración cerebral y carcinogénesis (Singh et al., 2022). Oracz & Nebesny (2015)

reportaron la disminución del potencial antioxidante en granos de cacao al aumentar el tratamiento térmico entre 110 y 150 °C, siendo que se preservó mejor la bioactividad de los granos tostados a temperaturas más bajas, no obstante, todos los tratamientos constituyeron una buena fuente de antioxidantes. Chaaban et al. (2016) observaron que, a pesar de las diferencias estructurales, la degradación de 6 flavonoides (eriodictiol, mesquitol, naringina, rutina, luteolina y luteolina 7-O glucósido) aumentó en diversas magnitudes con el incremento de la temperatura (de 25 a 130 °C) y la duración de la exposición (hasta 2h) e identificaron productos de degradación que presentaron remanente actividad antioxidante.

Las aflatoxinas y ocratoxina A son inestables a altas temperaturas, pH extremo, radiación UV, radiación gamma, etc. La desintegración de las AF deriva esencialmente de la apertura del anillo lactona y, en ocasiones, por la descarboxilación de la molécula. Las AF se descomponen con tratamientos térmicos entre 237°C y 306°C y pH extremo (<3 o >10) (IARC, 2002; Rustom, 1997). Por otro lado, son necesarias temperaturas superiores a 180 °C para degradar más del 10% de la concentración inicial de OTA, probablemente a causa de la isomerización de la molécula o la ruptura del enlace amida entre la L-fenilalanina y la ocratoxina alfa (Raters & Matissek, 2008). En condiciones alcalinas (pH 12), se forman derivados de OTA y se hidroliza su anillo lactona, condición que puede ser reversible en pH ácido (Cagnasso et al., 2019). Con respecto a la aflatoxina B1, la máxima absorbancia de luz UV se da a 362 nm y genera 12 tipos de subproductos, mientras que su destrucción total en forma pura sucede a 180 °C (Rustom, 1997; Raters & Matissek, 2008). Por otro lado, se deshicieron completamente 500 µg Kg<sup>-1</sup> de OTA al aplicar 3 h de radiación UV en piensos para aves (Ameer et al., 2016). Cuando las AF u OTA están en solución acuosa, los rayos gama (8 a 10 kGy) provocan la radiólisis del agua que origina radicales libres altamente reactivos, los cuales destrozan las micotoxinas (Calado et al., 2018). Estos radicales atacan a la AFB1 en el

anillo de furano terminal, mientras en que la OTA causan el fraccionamiento de dobles enlaces, especialmente en los anillos aromáticos (Calado et al., 2018; Rustom, 1997).

La destoxicación de micotoxinas por métodos biológicos representa una estrategia segura, específica, efectiva, económica y amigable con el medio ambiente (Afshar et al., 2020). Los microbios, especialmente los probióticos, pueden inhibir la formación, adsorber y degradar aflatoxinas (Guan et al., 2021). Los efectos antagónicos de los microorganismos benéficos sobre los hongos toxigénicos y su generación de micotoxinas sucede debido a la competencia por el espacio físico y los nutrientes disponibles, la producción de metabolitos antifúngicos, la defensa a través de la liberación de ROS, entre otros mecanismos. El cultivo de *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus* con *Salmonella* disminuyó la formación de esporas, el diámetro de crecimiento en un 20% y la cantidad de aflatoxinas totales originadas en al menos 73% (Von Hertwig et al., 2020). Por otro lado, la adsorción de aflatoxinas a estructuras especiales de la pared celular a través de fuerzas de Van der Waals evita efectos adversos en el tracto gastrointestinal, siendo que los compuestos formados son mayormente excretados. Los géneros *Lactobacillaceae* y *Saccharomyces* presentan excelentes capacidades de adsorción. Finalmente, la destrucción de aflatoxinas sucede al modificar y destruir su estructura molecular, por la hidrólisis de los anillos de lactona o furano a través de enzimas microbianas extra o intracelulares, como la aflatoxin oxidasa, peroxidasa, lactasa, etc. Los productos de degradación son nuevas sustancias con menor toxicidad o inocuos. *Bacillus velezensis* pudo desintegrar el 94.70 % de AFB1 en condiciones alcalinas (pH 8) a través de enzimas extracelulares, formando subproductos con reducida citotoxicidad (Shu et al., 2018).

Entre los probióticos se distinguen las bacterias de los géneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Propionibacterium* y *Pediococcus* y hongos y

levaduras de las especies *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces boulardii*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Candida* spp, etc (Afshar et al., 2020). Estos organismos provocan múltiples efectos como la adsorción y la transformación de la molécula en productos menos tóxicos, por lo que se evaden las lesiones causadas por AF esencialmente en el hígado (Guan et al., 2021). Los agentes probióticos y sus metabolitos se consideran compuestos antioxidantes exógenos, que pueden ayudar a prevenir la formación de ROS inducidas por las micotoxinas y hacen que la barrera del epitelio intestinal sea más resistente a las micotoxinas. El uso combinado de probióticos, agentes biológicos y enzimas degradadoras mejoran la capacidad de detoxificación y algunos microbios beneficiosos pueden estimular la destrucción de varias toxinas. Además, los daños causados por las AF en el cuerpo pueden ser atenuados. *Lactobacillus bulgaricus* o *Lactobacillus rhamnosus* previnieron la lesión hepática originada por AFB1 y al inhibir la vía de señalización de NF- $\kappa$ B se protegió contra los cambios histológicos y la inflamación (Chen et al., 2019).

Además de la posible ineffectividad del tostado, los altos niveles de AF y OTA pueden ser atribuidos a la contaminación cruzada de los nibs y cascarilla con las micotoxinas encontradas en diversas fuentes como materias primas, insumos, equipos, herramientas, materiales, vestimenta, zapatos, plagas (animales), basura y operarios (manos, saliva o cabello) (Di Stefano & Avellone, 2014; Copetti et al., 2011a). Por ejemplo, la migración de micotoxinas por corrientes de aire puede suceder cuando el área de recepción de materia prima y la de procesamiento no están completamente aisladas (Delgado-Ospina et al., 2021; Vaali et al., 2022). También se debe verificar la adecuada limpieza de los equipos utilizados para evitar la contaminación de un lote de alimento procesado con el siguiente (Daou et al., 2021; Karlovsky et al., 2016). Según Liu et al. (2016), solo el 3% de los molinos y trituradores de piensos son regularmente limpiados y desinfectados en comparación con el 40% de las máquinas que pasan

ocasionalmente por dichos procesos en China, lo que provoca la acumulación de alimentos en las paredes de los equipos y el amontonamiento de derrames y basuras (como la cascarilla) en el piso. Wan et al. (2020) constataron el incremento de deoxynivalenol (DON) en la cebada después del malteado debido al agua de remojo residual. La adopción de BPM, sobre todo medidas higiénicas adecuadas, previenen la contaminación de micotoxinas en alimentos elaborados (Liu et al, 2016).

Al evaluar la influencia del origen y el tipo de producto, también se observó mayores contenidos de OTA en los granos y nibs del origen 10 (con 19.40 y 15.66  $\mu\text{g Kg}^{-1}$ , respectivamente), a causa de las condiciones iniciales de la materia prima, lo que puede ser atribuido a un inadecuado tratamiento poscosecha como se detalló anteriormente. Por otro lado, a pesar de que los granos de origen 9 estuvieron debajo del límite de 10  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  de OTA y AF, los nibs superaron el nivel de 5  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  con 6.26 y 8.60  $\mu\text{g Kg}^{-1}$ , respectivamente, asociado a una posible contaminación cruzada.

Entre los efectos perjudiciales de las AF y OTA en la salud se han reconocido el riesgo de desarrollo de cáncer, la inmunosupresión y la interferencia en la nutrición y el desarrollo infantil (Williams et al., 2004). Estas micotoxinas son moléculas con potencial genotóxico y mutagénico que causan alteraciones epigenéticas y estructurales en el ADN e inducen la carcinogénesis debido a la activación transcripcional de oncogenes y/o la inhibición de los genes supresores de tumores (Ghazi et al., 2020; Wang & Groopman, 1999). En el mecanismo de acción directo, la AFB1 se transforma a aflatoxina-8,9-exo-epóxido por enzimas del citocromo p450 de las células hepáticas, esa molécula puede formar un aducto con el ADN, aflatoxina-N7-guanina, capaz de impedir la expresión del gen supresor de tumores p-53 (Ghazi et al., 2020; Stroka & Gonçalves, 2018). De manera semejante, la bioactivación de la OTA

sucede en los riñones y se genera un electrófilo de benzoquinona que se une al ADN a través de aductos (Pfohl-Leszkowicz, 2007). Por otro lado, de forma indirecta, provocan el daño oxidativo del ADN al catalizar la formación de ROS (Abdel-Daim et al., 2021; Pfohl-Leszkowicz, 2007).

Los efectos tóxicos conocidos de las AF y OTA sobre el sistema inmunológico representan un problema de salud importante en humanos y animales. Las micotoxinas deterioran la inmunidad mediada por células (CMI), la actividad fagocitaria, la función de las células asesinas naturales (NK), la producción de anticuerpos, etc. (Mohsenzadeh et al., 2016; Pfohl-Leszkowicz, 2007). Estudios *in vitro* y en animales permiten notar que la AFB1 y OTA afectan principalmente a la inmunidad mediada por células al inhibir la proliferación y comprometer el funcionamiento de los linfocitos T o B (Lea et al., 1989; Mohsenzadeh et al., 2016). Además, en el metabolismo de la AFB1, los aductos aflatoxina-N7-guanina reducen la síntesis de ADN y proteínas al perjudicar la actividad de la ARN polimerasa (dependiente de ADN), lo que, consecuentemente, puede suprimir la diferenciación de las células inmunitarias y la elaboración de citoquinas esenciales para la comunicación del sistema inmunitario (Dugyala & Sharma, 1996).

Por otro lado, las aflatoxinas son capaces de impedir la síntesis de proteínas en las células gastrointestinales, que provoca cambios físicos del intestino delgado con potencial desencadenamiento de deficiencia de zinc y alteraciones metabólicas que pueden conducir a la activación sistémica inmune. Ambos efectos contribuyen al retraso en el crecimiento y la emaciación (Lombard, 2014; Smith et al., 2012). Las AF también causan interferencia en el metabolismo de la glucosa, la síntesis de ácidos grasos/fosfolípidos y la absorción de micronutrientes (Smith et al., 2012).

La probable presencia de más de un tipo de micotoxina en alimentos, incluso en bajas concentraciones, representa un riesgo para la salud de seres humanos y animales por los efectos tóxicos sinérgicos o aditivos de las combinaciones de micotoxinas, es decir, cuando las consecuencias observadas son mayores o iguales a las esperadas por modelos matemáticos, respectivamente (Pires et al., 2019). Múltiples micotoxinas causan diferentes efectos en los componentes moleculares, originan reacciones metabólicas que afectan al funcionamiento celular y desencadenan complejas respuestas bioquímicas (Kifer et al., 2020). En pollos de engorde, Huff & Doerr (1981) notaron que la AFB1 y OTA de manera sinérgica ocasionaron nefropatía, disminuyeron la tasa de crecimiento y aumentaron la mortalidad. Además, en la exposición combinada, la OTA inhibió la acumulación de lípidos en el hígado normalmente inducida por la AF. Huang et al. (2018) evidenciaron que los resultados aislados o combinados de las micotoxinas AFB1, OTA y ZEN comprometieron en diversos grados la función inmunológica y el estado antioxidante de cabras lecheras lactantes. La mezcla de las tres micotoxinas produjo las mayores consecuencias adversas al reducir la actividad de la superóxido dismutasa, el trabajo de los peróxidos de glutatión, la capacidad antioxidante total, la concentración de inmunoglobulina A, entre otros efectos.

No obstante, las micotoxinas son un tipo de una serie de sustancias cancerígenas que pueden estar presentes los alimentos. A pesar de que el desencadenamiento o prevención del cáncer en poblaciones humanas debido a factores dietéticos no son concluyentes, se ha postulado como agentes nocivos al consumo de alcohol, la ingesta de carne carbonizada y la exposición a la acrilamida del humo del tabaco; por otro lado, se han descrito prácticas benéficas como el consumo de antioxidantes, verduras crucíferas, te, vitamina D y calcio (NCI, 2020). Además, el efecto nocivo de las micotoxinas está basado en el principio de dosis – respuesta. Las toxicosis crónicas, y en ocasiones agudas, en animales de criadero derivan de su

dieta mono-alimenticia, ya que los animales son constante y únicamente expuestos a las micotoxinas a través de los piensos de cereales (Pierron et al., 2016). Por otro lado, el chocolate y otros derivados del cacao se consideran como una fuente menor de AF y OTA en la dieta de los seres humanos, ya que pueden llegar a presentarse en bajas concentraciones, generalmente inferiores a  $1 \mu\text{g Kg}^{-1}$  en los productos terminados (Copetti et al., 2014; Serra, 2004).

La FAO & WHO (2013) elaboraron el Código de prácticas para prevenir y reducir la contaminación del cacao por Ocratoxina A. La mejor estrategia es evitar el crecimiento de hongos y la generación de OTA y AF en la materia prima, porque en la cadena productiva del chocolate y derivados de cacao no se logra eliminarlas totalmente (Copetti et al., 2011a). En este sentido, es clave la adopción de buenas prácticas agrícolas (BPA), buenas prácticas de almacenamiento (BPAL) y buenas prácticas de manufactura (BPM), además de la importancia de estrictas condiciones higiénicas durante todo el proceso de fabricación (herramientas, equipos, infraestructura y vehículos) (Tola & Kebede, 2016).

Se recomienda la selección de mazorcas sanas y evitar aquellas o parte de estas que estén mutiladas, podridas, momificadas o dañadas por insectos (Bastide et al., 2006; Maciel et al., 2018). La apertura de los frutos se debe hacer inmediatamente después de su cosecha y la fermentación de las semillas durante 7 días en cajas de madera u hojas de plátano que no estén en contacto con el piso, impedirían la entrada de agentes contaminantes (Kedjebo et al., 2016). Mezclar o voltear la masa de granos varias veces al día previene la germinación y crecimiento de hongos en las capas internas (Maciel et al., 2018). Al final de la fermentación, eliminar la materia orgánica por lavado con agua potable y desinfectar los granos de cacao con 200 ppm de hipoclorito de sodio (siendo admitidas concentraciones máximas de 2000 ppm) por al menos 2 minutos, seguido de varios enjuagues con agua potable para asegurar que los niveles

residuales no superen las 0.5 ppm (Copetti et al., 2011a; Maciel et al., 2018; McGlynn, 2004; Sun et al., 2012). Se sugiere secar los granos por 7 días, de preferencia en superficies elevadas, con pisos de concreto o plástico para una limpieza más fácil y efectiva (Copetti et al., 2013). Además, asegurar un contenido de humedad del grano menor al 8% antes del empacado y eliminar los granos mohosos, achatados, arrugados, negros, germinados, dañados por insectos y con otros defectos (FAO & WHO, 2013). En el periodo de almacenamiento es crucial mantener la humedad de los granos debajo del 8% y la humedad relativa del ambiente menor al 80% (Copetti et al., 2011AF; Leandro-Muñoz et al., 2017).

En el procesamiento industrial del cacao, es fundamental controlar la calidad e inocuidad de la materia prima al implementar sistemas que permitan confirmar bajos niveles de micotoxinas y brindar especial atención al proceso de descascarado debido a su importancia en la salida física de OTA (Serra, 2004). Especialmente, las plantas de producción deberían evaluar que los procesos de limpieza estén siendo efectivos en la remoción o destrucción de micotoxinas, en equipos e implementos utilizados por los operadores, para minimizar la probabilidad de la contaminación cruzada (Karlovsy et al., 2016).

## CONCLUSIÓN

Al considerar la influencia del origen, las mayores concentraciones de OTA ( $p < 0.05$ ), con media de hasta  $16.86 \mu\text{g Kg}^{-1}$ , estuvieron dentro de lo esperado, entretanto los niveles de AF, con la media más alta de  $202.75 \mu\text{g Kg}^{-1}$  ( $p < 0.05$ ), fueron muy elevados según la literatura. Además, los sitios 6, 7, 9, 10, 11, 12 estuvieron entre las menores concentraciones de AF ( $< 18.82 \mu\text{g Kg}^{-1}$ ) ( $p < 0.05$ ) e inferiores a  $16.86 \mu\text{g Kg}^{-1}$  en el caso de OTA. Mientras el 8.3% (lugar 12) excedió el LMT de  $10 \mu\text{g Kg}^{-1}$  de OTA establecido por la ANVISA, el 67% (8 sitios) sobrepasaron ese límite de AF. Es probable que la inocuidad del cacao se vea comprometida por altos niveles de humedad en los granos ( $> 8\%$ ) e inadecuadas prácticas poscosecha, como almacenar la mazorca antes de la apertura, utilizar mazorcas en malas condiciones, no voltear la masa fermentativa, realizar el secado por largos periodos ( $> 7$  días), tener alta humedad relativa ( $> 80\%$ ) durante el almacenamiento y manejar precarias condiciones higiénicas. Se percibe la necesidad de iniciativas gubernamentales políticas y económicas que se enfoquen en la capacitación a los pequeños productores y el establecimiento de asociaciones que realicen un adecuado tratamiento primario del cacao cosechado.

Al evaluar el efecto del origen y tipo de producto, la interacción de estos factores ocasionó concentraciones más altas de OTA en granos y nibs del sitio 10 ( $p < 0.05$ ), mientras que no afectaron significativamente el contenido de AF ( $p > 0.05$ ) entre los componentes de la localidad 9. Los granos del origen 9 estuvieron debajo del LMT de ambas micotoxinas ( $8.79 \mu\text{g Kg}^{-1}$  de OTA y  $7.19 \mu\text{g Kg}^{-1}$  de AF), pero sucedió lo contrario con los del sitio 10 ( $19.40 \mu\text{g Kg}^{-1}$  de OTA y  $10.89 \mu\text{g Kg}^{-1}$  de AF). No obstante, la ocurrencia de OTA ( $15.66 \mu\text{g Kg}^{-1}$ ) y AF ( $10.64 \mu\text{g Kg}^{-1}$ ) en nibs de ambos lugares sobrepasó el nivel máximo de  $5 \mu\text{g Kg}^{-1}$  y constituyen altos valores según la literatura. Se detectaron entre  $8.95$  y  $10.50 \mu\text{g Kg}^{-1}$  de micotoxinas en la

cascarilla de ambas localidades, sin diferir significativamente entre sí ( $p > 0.05$ ). Se presume que se debe verificar que los procesos de limpieza estén siendo efectivos en la eliminación de micotoxinas en instalaciones y equipos para evitar la contaminación cruzada. Este es el primer reporte sobre la influencia del tostado ligero ( $132\text{ °C}$  por 10 min) en la concentración de OTA y AF en los nibs de cacao. Los contenidos están dentro de la ingesta diaria tolerable (IDT) de OTA ( $1.08\text{ }\mu\text{g}$ ) de un adulto promedio (60 kg) que consume una barra de chocolate (30 g) con el 100% de cacao.

Por último, existió coocurrencia de AF y OTA en granos, nibs y cascarilla de todos los orígenes al tomar en cuenta los dos diseños experimentales. A pesar de ser necesarias más investigaciones, se sugiere controlar los LMT de micotoxinas en la materia prima para evitar altos niveles de contaminación en semielaborados y productos terminados. Además, se recomienda considerar a las AF y OTA como parte del HACCP.

## Referencias

- Abdel-Daim, M. M., Abdeen, A., Jalouli, M., Abdelkader, A., Megahed, A., Alkahtane, A., ... & Aleya, L. (2021). Fucoidan supplementation modulates hepato-renal oxidative stress and DNA damage induced by aflatoxin B1 intoxication in rats. *Science of The Total Environment*, 768, 144781.
- Ahoa, E., Kassahun, A., & Tekinerdogan, B. (2020). Business processes and information systems in the Ghana cocoa supply chain: A survey study. *NJAS-Wageningen Journal of Life Sciences*, 92, 100323.
- Akinola, S. A., Ateba, C. N., & Mwanza, M. (2021). Behaviour of *Aspergillus parasiticus* in aflatoxin production as influenced by storage parameters using response surface methodology approach. *International Journal of Food Microbiology*, 357, 109369.
- Altunay, N., Katin, K. P., Gürsoy, N., Elik, A., Şimşek, S., & Kaya, S. (2020). Spectrophotometric determination of aflatoxin B1 in food sample: Chemometric optimization and theoretical supports for reaction mechanisms and binding regions. *Journal of Food Composition and Analysis*, 94(103646), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2020.103646>
- Ameer Sumbal, G., Hussain Shar, Z., Hussain Sherazi, S. T., Nizamani, S. M., & Mahesar, S. A. (2016). Decontamination of poultry feed from ochratoxin A by UV and sunlight radiations. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(8), 2668-2673.
- Amézqueta, S., Gonzalez-Penas, E., Murillo, M., & Lopez de Cerain, A. (2005). Occurrence of ochratoxin A in cocoa beans: effect of shelling. *Food Additives and Contaminants*, 22(6), 590-596.
- ANVISA. (2011). Ministério da Saúde. Resolução RDC no 07, de 18 de fevereiro de 2011. *Regulamento técnico sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos*. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, seção 1, n. 46, p.66. Recuperado de [https://bvsm.sau.gov.br/bvs/sauolegis/anvisa/2011/res0007\\_18\\_02\\_2011\\_rep.html](https://bvsm.sau.gov.br/bvs/sauolegis/anvisa/2011/res0007_18_02_2011_rep.html), el 09 de febrero de 2022.
- Afshar, P., Shokrzadeh, M., Raeisi, S. N., Ghorbani-HasanSaraei, A., & Nasiraii, L. R. (2020). Aflatoxins biotransformation strategies based on probiotic bacteria. *Toxicon*, 178, 50-58.
- Bastide, P., Fourny, G., Durand, N., Petithuguenin, P., Guyot, B., Gilmour, M., & Lindblom, M. (2006). Identification of ochratoxin A sources during cocoa post-harvest processing: influence of harvest quality and climatic factors. Cocoa Producers' Alliance.
- Caceres, I., Al Khoury, A., El Khoury, R., Lorber, S., P. Oswald, I., El Khoury, A., ... & Bailly, J. D. (2020). Aflatoxin biosynthesis and genetic regulation: A review. *Toxins*, 12(3), 150.
- Cagnasso, I., Tonachini, G., Berto, S., Giacomino, A., Mandrile, L., Maranzana, A., & Durbiano, F. (2019). Comprehensive study on the degradation of ochratoxin A in water by spectroscopic techniques and DFT calculations. *RSC advances*, 9(34), 19844-19854.

- Calado, T., Fernández-Cruz, M. L., Verde, S. C., Venâncio, A., & Abrunhosa, L. (2018). Gamma irradiation effects on ochratoxin A: Degradation, cytotoxicity and application in food. *Food chemistry*, 240, 463-471.
- Chaaban, H., Ioannou, I., Chebil, L., Slimane, M., Gerardin, C., Paris, C., ... & Ghoul, M. (2017). Effect of heat processing on thermal stability and antioxidant activity of six flavonoids. *Journal of food processing and preservation*, 41(5), e13203.
- Chen, Y., Li, R., Chang, Q., Dong, Z., Yang, H., & Xu, C. (2019). *Lactobacillus bulgaricus* or *Lactobacillus rhamnosus* suppresses NF- $\kappa$ B signaling pathway and protects against AFB1-induced hepatitis: a novel potential preventive strategy for aflatoxicosis?. *Toxins*, 11(1), 17.
- Cheong, K. K., Strub, C., Montet, D., Durand, N., Alter, P., Meile, J. C., ... & Fontana, A. (2016). Effect of different light wavelengths on the growth and ochratoxin A production in *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus westerdijkiae*. *Fungal Biology*, 120(5), 745-751.
- Creative Diagnosis. (2021). Competitive ELISA. Recuperado de <https://www.creative-diagnostics.com/blog/index.php/competitive-elisa/>, el 05 de octubre del 2022.
- 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.
- Copetti, M. V., Iamanaka, B. T., Frisvad, J. C., Pereira, J. L., & Taniwaki, M. H. (2011a). Mycobiota of cocoa: from farm to chocolate. *Food microbiology*, 28(8), 1499-1504.
- Copetti, M. V., Iamanaka, B. T., Pereira, J. L., Fungaro, M. H., & Taniwaki, M. H. (2011b). Aflatoxigenic fungi and aflatoxin in cocoa. *International Journal of Food Microbiology*, 148(2), 141-144.
- Copetti, M. V., Iamanaka, B. T., Pereira, J. L., Lemes, D. P., Nakano, F., & Taniwaki, M. H. (2012a). Co-occurrence of ochratoxin A and aflatoxins in chocolate marketed in Brazil. *Food Control*, 26(1), 36-41.
- Copetti, M. V., Iamanaka, B. T., Pereira, J. L., Lemes, D. P., Nakano, F., & Taniwaki, M. H. (2012b). Determination of aflatoxins in by-products of industrial processing of cocoa beans. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 29(6), 972-978.
- 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.
- Copetti, M. V., Iamanaka, B. T., Pitt, J. I., & Taniwaki, M. H. (2014). Fungi and mycotoxins in cocoa: From farm to chocolate. *International journal of food microbiology*, 178, 13-20.
- Dano, S. D., Manda, P., Dembélé, A., Abila, 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*, 5(12), 2310-2323.

- Daou, R., Joubrane, K., Maroun, R. G., Khabbaz, L. R., Ismail, A., & El Khoury, A. (2021). Mycotoxins: Factors influencing production and control strategies. *AIMS Agriculture and Food*, 6(1), 416-447.
- Delgado-Ospina, J., Molina-Hernández, J. B., Chaves-López, C., Romanazzi, G., & Paparella, A. (2021). The role of fungi in the cocoa production chain and the challenge of climate change. *Journal of Fungi*, 7(202), 1–25. <https://doi.org/10.3390/jof7030202>
- Deus, V. L., Cerqueira E Silva, M. B. D., Maciel, L. F., Miranda, L. C. R., Hirooka, E. Y., Soares, S. E., ... & Bispo, E. D. S. (2018). Influence of drying methods on cocoa (*Theobroma cacao* L.): antioxidant activity and presence of ochratoxin A. *Food Science and Technology*, 38, 278-285.
- De Magalhães, J. T., Sodr e, G. A., Viscogliosi, H., & Grenier-Loustalot, M. F. (2011). Occurrence of Ochratoxin A in Brazilian cocoa beans. *Food Control*, 22(5), 744-748.
- Di Stefano, V., & Avellone, G. (2014). Food contaminants. *Journal of Food Studies*, 3(1), 88-103.
- Dugyala, R. R., & Sharma, R. P. (1996). The effect of aflatoxin B1 on cytokine mRNA and corresponding protein levels in peritoneal macrophages and splenic lymphocytes. *International journal of immunopharmacology*, 18(10), 599-608.
- El Salous, A., Martillo García, J., G omez Vargas, J., & Martínez Alcivar, F. (2020). Mejoramiento de la calidad del cultivo de cacao en Ecuador. *Revista Venezolana Gerencia*, v. 25, n. 3, p. 368-380. <https://produccioncientificaluz.org/index.php/rvg/article/view/33375>
- European Food Safety Authority (EFSA). (2006). Opinion of the Scientific Panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to ochratoxin A (OTA) in food. *EFSA Journal*, 365, 1-56.
- European Commission (2006a). *Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs (Text with EEA relevance)*. Official Journal of the European Union. p. 5-24. Recuperado de <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32006R1881&from=EN>, el 08 de febrero de 2022.
- European Commission (2006b). *Commission Regulation (EC) No 401/2006 of 23 February 2006 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuf*. Official Journal of the European Union. p. 12-34. Obtenido el 11 de septiembre de 2022 de <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32006R0401&from=EN>.
- European Commission (2010). *Commission Regulation (EU) No 105/2010 of 5 February 2010 amending Regulation (EC) No 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards ochratoxin A*. Official Journal of the European Union. p. 7-8. Obtenido el 03 de octubre de 2022 de <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32006R0401&from=EN>.

- European Union (2017). *The Rapid Alert System for Food and Feed, Annual Report 2016*. Publications Office. Recuperado de <https://data.europa.eu/doi/10.2875/022237>, el 05 de octubre de 2022.
- European Union (2021). *The Rapid Alert System for Food and Feed, Annual Report 2020*. Publications Office. Recuperado de [https://ec.europa.eu/food/system/files/2021-08/rasff\\_pub\\_annual-report\\_2020.pdf](https://ec.europa.eu/food/system/files/2021-08/rasff_pub_annual-report_2020.pdf), el 05 de octubre de 2022.
- Estrela, C., Estrela, C. R., Barbin, E. L., Spanó, J. C. E., Marchesan, M. A., & Pécora, J. D. (2002). Mechanism of action of sodium hypochlorite. *Brazilian Dental Journal*, 13, 113-117.
- FAO. (2022). FAOSTAT. Recuperado de [https://www.fao.org/faostat/en/#rankings/countries\\_by\\_commodity](https://www.fao.org/faostat/en/#rankings/countries_by_commodity), el 04 de octubre de 2022.
- FAO & WHO. (2013). *Code of Practice for the Prevention and Reduction of Ochratoxin A Contamination in Cocoa*. Codex Alimentarius, CXC 72-2013. Recuperado de <http://www.ico.org/documents/ed-2074e-ota.pdf>, el 10 de febrero de 2022.
- FAO & WHO. (2003). *Codex standard for chocolate and chocolate products*. Codex Alimentarius, Codex Stand 87-1981 Recuperado de [https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252Fstandards%252FCXS%2B87-1981%252FCXS\\_087e.pdf](https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252Fstandards%252FCXS%2B87-1981%252FCXS_087e.pdf), el 17 de febrero del 2022.
- FDA. (2000). *Guidance for Industry: Action Levels for Poisonous or Deleterious Substances in Human Food and Animal Feed*. Recuperado de <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/guidance-industry-action-levels-poisonous-or-deleterious-substances-human-food-and-animal-feed#afla>, el 08 de febrero de 2022.
- Ghazi, T., Arumugam, T., Foolchand, A., & Chuturgoon, A. A. (2020). The impact of natural dietary compounds and food-borne mycotoxins on DNA methylation and cancer. *Cells*, 9(9), 2004.
- Gil-Serna, J., Vázquez, C., & Patiño, B. (2020). Genetic regulation of aflatoxin, ochratoxin A, trichothecene, and fumonisin biosynthesis: A review. *International Microbiology*, 23(1), 89-96.
- Gilmour, M., & Lindblom, M. (2008). Management of ochratoxin A in the cocoa supply chain: a summary of work by the CAOBISCO/ECA/FCC working group on ochratoxin A. *Mycotoxins: Detection methods, management, public health and agricultural trade*, 231-243.
- Guan, Y., Chen, J., Nepovimova, E., Long, M., Wu, W., & Kuca, K. (2021). Aflatoxin detoxification using microorganisms and enzymes. *Toxins*, 13(1), 46.
- Hawkins, C. L. (2020). Hypochlorous acid-mediated modification of proteins and its consequences. *Essays in Biochemistry*, 64(1), 75-86.

- Hawkins, C. L., & Davies, M. J. (1998). Hypochlorite-induced damage to proteins: formation of nitrogen-centred radicals from lysine residues and their role in protein fragmentation. *Biochemical journal*, 332(3), 617-625.
- Huang, S., Zheng, N., Fan, C., Cheng, M., Wang, S., Jabar, A., ... & Cheng, J. (2018). Effects of aflatoxin B1 combined with ochratoxin A and/or zearalenone on metabolism, immune function, and antioxidant status in lactating dairy goats. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 31(4), 505.
- Huff, W. E., & Doerr, J. A. (1981). Synergism between aflatoxin and ochratoxin A in broiler chickens. *Poultry Science*, 60(3), 550-555.
- IARC. (1993). *Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: Some naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins*. v. 56, p. 599. Recuperado de <https://monographs.iarc.who.int/wp-content/uploads/2018/06/mono82.pdf>, el 10 de febrero de 2022.
- IARC. (2002). *Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene*. v. 82, p. 590. Recuperado de <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol83/mono83-1.pdf>, el 10 de febrero de 2022.
- ICCO. (2020). *Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics, Cocoa Year 2019/20*. Abidjan, Côte d'Ivoire, XLVI, 4.
- ICCO. (2016). Fine or Flavour Cocoa. Recuperado de <https://www.icco.org/fine-or-flavor-cocoa/>, el 04 de octubre de 2022.
- INEN. (2021). *Granos De Cacao. Requisitos*. NTE INEN 176, 2021-02. 6ta ed., p. 9. Recuperado de <https://inencloud.normalizacion.gob.ec/nextcloud/s/Zq5b9jzBw2wBeRK>, el 09 de febrero de 2022.
- Ingle, A. P., Gupta, I., Jogee, P., & Rai, M. (2020). *Role of nanotechnology in the detection of mycotoxins: A smart approach*. In *Nanomycotoxicology: Treating Mycotoxins in the Nano Way* (pp. 11–33). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817998-7.00002-1>
- ISO. (1977). *Cocoa beans - cut test (ISO 1114)*. Ginebra: Organización Internacional de Normalización.
- ITC. Trade Map—List of Exporters for the Selected Product in 2021. Product: 18 Cocoa and Cocoa Preparations. Recuperado de <https://www.trademap.org/Index.aspx>, el 04 de octubre de 2022.
- Iqbal, S. Z. (2021). Mycotoxins in food, recent development in food analysis and future challenges; a review. *Current Opinion in Food Science*, 42, 237-247.
- Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). Meeting, & World Health Organization. (2006). *Safety evaluation of certain contaminants in food* (Vol. 82). Food & Agriculture Org..

- Karlovsky, P., Suman, M., Berthiller, F., De Meester, J., Eisenbrand, G., Perrin, I., ... & Dussort, P. (2016). Impact of food processing and detoxification treatments on mycotoxin contamination. *Mycotoxin research*, 32(4), 179-205.
- Kedjebo, K. B. D., Guehi, T. S., Kouakou, B., Durand, N., Aguilar, P., Fontana, A., & Montet, D. (2015). Effect of post-harvest treatments on the occurrence of ochratoxin A in raw cocoa beans. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 33(1), 157-166.
- Kifer, D., Jakšić, D., & Šegvić Klarić, M. (2020). Assessing the effect of mycotoxin combinations: Which mathematical model is (the most) appropriate?. *Toxins*, 12(3), 153.
- Kumar, A., Pathak, H., Bhadauria, S., & Sudan, J. (2021). Aflatoxin contamination in food crops: causes, detection, and management: a review. *Food Production, Processing and Nutrition*, 3(1), 1-9.
- Latif, R. (2013). Health benefits of cocoa. *Current opinion in clinical nutrition & metabolic care*, 16(6), 669-674.
- Lea, T., Steien, K., & Størmer, F. C. (1989). Mechanism of ochratoxin A-induced immunosuppression. *Mycopathologia*, 107(2), 153-159.
- Leandro-Muñoz, M. E., Tixier, P., Germon, A., Rakotobe, V., Phillips-Mora, W., Maximova, S., & Avelino, J. (2017). Effects of microclimatic variables on the symptoms and signs onset of *Moniliophthora roreri*, causal agent of *Moniliophthora* pod rot in cacao. *PLoS ONE*, 12(10), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184638>
- Ledford, H. How does bleach bleach?. *Nature* (2008). <https://doi.org/10.1038/news.2008.1228>
- Liu, Z., Zhang, G., Zhang, Y., Jin, Q., Zhao, J., & Li, J. (2016). Factors controlling mycotoxin contamination in maize and food in the Hebei province, China. *Agronomy for Sustainable Development*, 36(2), 1-10.
- Lombard, M. J. (2014). Mycotoxin exposure and infant and young child growth in Africa: what do we know?. *Annals of nutrition and metabolism*, 64(Suppl. 2), 42-52.
- Maciel, L. F., Felício, A. L. D. S. M., Miranda, L. C. R., Pires, T. C., Bispo, E. D. S., & Hirooka, E. Y. (2018). Aflatoxins and ochratoxin A in different cocoa clones (*Theobroma cacao* L.) developed in the southern region of Bahia, Brazil. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 35(1), 134-143.
- Magnoli, C. E., Astoreca, A. L., Chiacchiera, S. M., & Dalcero, A. M. (2007). Occurrence of ochratoxin A and ochratoxigenic mycoflora in corn and corn based foods and feeds in some South American countries. *Mycopathologia*, 163, 249–260. <https://doi.org/10.1007/s11046-007-9005-z>
- Malhotra, B. D., Srivastava, S., Ali, M., & Singh, C. (2014). Nanomaterial-based biosensors for food toxin detection. *Applied biochemistry and biotechnology*, 174(3), 880-896.
- Mannaa, M., & Kim, K. D. (2017). Influence of temperature and water activity on deleterious fungi and mycotoxin production during grain storage. *Mycobiology*, 45(4), 240-254.

- McGlynn, W. (2004). *Guidelines for the use of chlorine bleach as a sanitizer in food processing operations*. Oklahoma Cooperative Extension Service.
- Mohammed, A., Faustinelli, P. C., Chala, A., Dejene, M., Fininsa, C., Ayalew, A., ... & Arias, R. S. (2021). Genetic fingerprinting and aflatoxin production of *Aspergillus section Flavi* associated with groundnut in eastern Ethiopia. *BMC microbiology*, 21(1), 1-12.
- Mohsenzadeh, M. S., Hedayati, N., Riahi-Zanjani, B., & Karimi, G. (2016). Immunosuppression following dietary aflatoxin B1 exposure: a review of the existing evidence. *Toxin Reviews*, 35(3-4), 121-127.
- Montgomery, D. C. (2013). *Design and analysis of experiments*. John Wiley & Sons.
- Mounjouenpou, P., Gueule, D., Fontana-Tachon, A., Guyot, B., Tondje, P. R., & Guiraud, J. P. (2008). Filamentous fungi producing ochratoxin a during cocoa processing in Cameroon. *International Journal of Food Microbiology*, 121(2), 234-241.
- National Cancer Institute. (NCI). (2020). Risk Factors for Cancer. Recuperado de <https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/risk>, el 07 de octubre de 2022.
- Nielsen, D. S., Crafacck, M., Jespersen, L., & Jakobsen, M. (2013). The microbiology of cocoa fermentation. In *Chocolate in health and nutrition* (pp. 39-60). Humana Press, Totowa, NJ.
- Ostovar, K., & Keeney, P. G. (1973). Isolation and characterization of microorganisms involved in the fermentation of Trinidad's cacao beans. *Journal of Food Science*, 38(4), 611-617.
- Oracz, J., & Nebesny, E. (2016). Antioxidant properties of cocoa beans (*Theobroma cacao* L.): Influence of cultivar and roasting conditions. *International journal of food properties*, 19(6), 1242-1258.
- Pardo, E., Marin, S., Ramos, A. J., & Sanchis, V. (2006). Ecophysiology of ochratoxigenic *Aspergillus ochraceus* and *Penicillium verrucosum* isolates. Predictive models for fungal spoilage prevention—a review. *Food additives and contaminants*, 23(4), 398-410.
- Pfohl-Leszkowicz, A., & Manderville, R. A. (2007). Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. *Molecular nutrition & food research*, 51(1), 61-99.
- Pierron, A., Alassane-Kpembé, I., & Oswald, I. P. (2016). Impact of two mycotoxins deoxynivalenol and fumonisin on pig intestinal health. *Porcine Health Management*, 2(1), 1-8.
- Pires, P. N., Vargas, E. A., Gomes, M. B., Vieira, C. B. M., Santos, E. A. D., Bicalho, A. A. C., ... & Trovatti Uetanabaro, A. P. (2019). Aflatoxins and ochratoxin A: occurrence

- and contamination levels in cocoa beans from Brazil. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 36(5), 815-824.
- Pluyer, H. R., Ahmed, E. M., & Wei, C. I. (1987). Destruction of aflatoxins on peanuts by oven- and microwave-roasting. *Journal of Food Protection*, 50(6), 504-508.
- Portilla F., P. (2018). *Agroclimatología del Ecuador*. Editorial Abya-Yala. Recuperado de <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/17047/1/Agroclimatologia%20del%20Ecuador.pdf>, el 17 de febrero del 2022.
- Raters, M., & Matissek, R. (2007). New examinations of mycotoxin carryover to cocoa beans. *Mycotoxin Research*, 23(1), 39-42.
- Raters, M., & Matissek, R. (2008). Thermal stability of aflatoxin B1 and ochratoxin A. *Mycotoxin research*, 24(3), 130-134.
- Roze, L. V., Laivenieks, M., Hong, S. Y., Wee, J., Wong, S. S., Vanos, B., ... & Linz, J. E. (2015). Aflatoxin biosynthesis is a novel source of reactive oxygen species—a potential redox signal to initiate resistance to oxidative stress?. *Toxins*, 7(5), 1411-1430.
- Ríos, F., Rehpani, C., Ruiz, A., & Lecaro, J. (2017). *Estrategias país para la oferta de cacao especiales - Políticas e iniciativas privadas exitosas en el Perú, Ecuador, Colombia y República Dominicana*. Swisscontact Colombia Foundation. (p. 140). Recuperado de [https://www.swisscontact.org/Resources/Persistent/b/7/9/0/b7909c63ce01d3c0333defd340188b15376359d7/Estrategias\\_pais\\_para\\_la\\_oferta\\_de\\_cacaos\\_especiales.pdf](https://www.swisscontact.org/Resources/Persistent/b/7/9/0/b7909c63ce01d3c0333defd340188b15376359d7/Estrategias_pais_para_la_oferta_de_cacaos_especiales.pdf), el 17 de febrero del 2022.
- Rustom, I. Y. (1997). Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation and inactivation by physical methods. *Food chemistry*, 59(1), 57-67.
- R-Biopharm (2020). RIDASCREEN FAST Aflatoxin SC R9002. Recuperado de [https://food.r-biopharm.com/wp-content/uploads/2012/06/r9002\\_ridascreen-fast-aflatoxin-sc\\_2020-09-04-3-1.pdf](https://food.r-biopharm.com/wp-content/uploads/2012/06/r9002_ridascreen-fast-aflatoxin-sc_2020-09-04-3-1.pdf), el 16 de septiembre de 2022.
- Salazar, M. M. M., & Lizarazo-Medina, P. X. (2021). Assessment of the fungal community associated with cocoa bean fermentation from two regions in Colombia. *Food Research International*, 149, 110670.
- Sandoval, A. J., Barreiro, J. A., De Sousa, A., Valera, D., López, J. V., & Müller, A. J. (2019). Composition and thermogravimetric characterization of components of Venezuelan fermented and dry Trinitario cocoa beans (*Theobroma cacao* L.): Whole beans, peeled beans and shells. *Revista Técnica de la Facultad de Ingeniería, Universidad del Zulia*, 42(1), 39-46.
- Sánchez-Hervás, M., Gil, J. V., Bisbal, F., Ramón, D., & Martínez-Culebras, P. V. (2008). Mycobiota and mycotoxin producing fungi from cocoa beans. *International Journal of Food Microbiology*, 125(3), 336–340. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.04.021>
- Sánchez A., V. H., Zambrano M., J. L., Iglesias, C. (2019). La cadena de valor del cacao en América Latina y el Caribe.

- Schwan, R. F., & Wheals, A. E. (2004). The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. *Critical reviews in food science and nutrition*, 44(4), 205-221.
- Serra Bonvehí, J. (2004). Occurrence of ochratoxin A in cocoa products and chocolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(20), 6347-6352.
- Shu, X., Wang, Y., Zhou, Q., Li, M., Hu, H., Ma, Y., ... & Wu, L. (2018). Biological degradation of aflatoxin B1 by cell-free extracts of *Bacillus velezensis* DY3108 with broad pH stability and excellent thermostability. *Toxins*, 10(8), 330.
- Singh, R., Singh, R. B., Mojto, V., Pella, D., Fedacko, J., Vargova, V., ... & Gvozdjaková, A. (2022). Cocoa and chocolate consumption and prevention of cardiovascular diseases and other chronic diseases. En *Functional Foods and Nutraceuticals in Metabolic and Non-Communicable Diseases* (pp. 279-299). Academic Press.
- Smith, L. E., Stoltzfus, R. J., & Prendergast, A. (2012). Food chain mycotoxin exposure, gut health, and impaired growth: a conceptual framework. *Advances in Nutrition*, 3(4), 526-531.
- Stroka, J., & Gonçalves, C. (2018). *Mycotoxins in food and feed: An overview*. In Encyclopedia of Food Chemistry (pp. 401–419). <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.21801-5>
- Sun, S. H., Kim, S. J., Kwak, S. J., & Yoon, K. S. (2012). Efficacy of sodium hypochlorite and acidified sodium chlorite in preventing browning and microbial growth on fresh-cut produce. *Preventive Nutrition and Food Science*, 17(3), 210.
- Thermo Fisher Scientific (2022). ELISA Enzyme Substrates. Recuperado de <https://www.thermofisher.com/ec/en/home/life-science/antibodies/immunoassays/elisa-kits/elisa-enzyme-substrates.html>, el 16 de septiembre de 2022.
- Tola, M., & Kebede, B. (2016). Occurrence, importance and control of mycotoxins: A review. *Cogent Food & Agriculture*, 2(1), 1191103.
- Vaali, K., Tuomela, M., Mannerström, M., Heinonen, T., & Tuuminen, T. (2022). Toxic Indoor Air Is a Potential Risk of Causing Immuno Suppression and Morbidity—A Pilot Study. *Journal of fungi*, 8(2), 104.
- Von Hertwig, A. M., Iamanaka, B. T., Neto, D. P. A., de Rezende, J. B., Martins, L. M., Taniwaki, M. H., & Nascimento, M. S. (2020). Interaction of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* with *Salmonella* spp. isolated from peanuts. *International Journal of Food Microbiology*, 328, 108666.
- Wang, J. S., & Groopman, J. D. (1999). DNA damage by mycotoxins. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 424(1-2), 167-181.
- Wang, Y., Wang, L., Liu, F., Wang, Q., Selvaraj, J. N., Xing, F., ... & Liu, Y. (2016). Ochratoxin A producing fungi, biosynthetic pathway and regulatory mechanisms. *Toxins*, 8(3), 83.

- Wan, J., Chen, B., & Rao, J. (2020). Occurrence and preventive strategies to control mycotoxins in cereal-based food. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(3), 928-953.
- Watzele, M.; Buchberger, B.; Kirr, Claudia. (2007). *U.S. Patent 8,735,083B2*. Indianápolis: US. Recuperado de <https://patents.google.com/patent/US8735083B2/en>, el 16 de septiembre de 2022.
- Williams, J. H., Phillips, T. D., Jolly, P. E., Stiles, J. K., Jolly, C. M., & Aggarwal, D. (2004). Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *The American journal of clinical nutrition*, 80(5), 1106-1122.

**ÍNDICE DE ANEXOS**

ANEXO A. ....	68.
ANEXO B. ....	69.
ANEXO C. ....	70.
ANEXO D. ....	71.
ANEXO E. ....	72.
ANEXO F. ....	73.

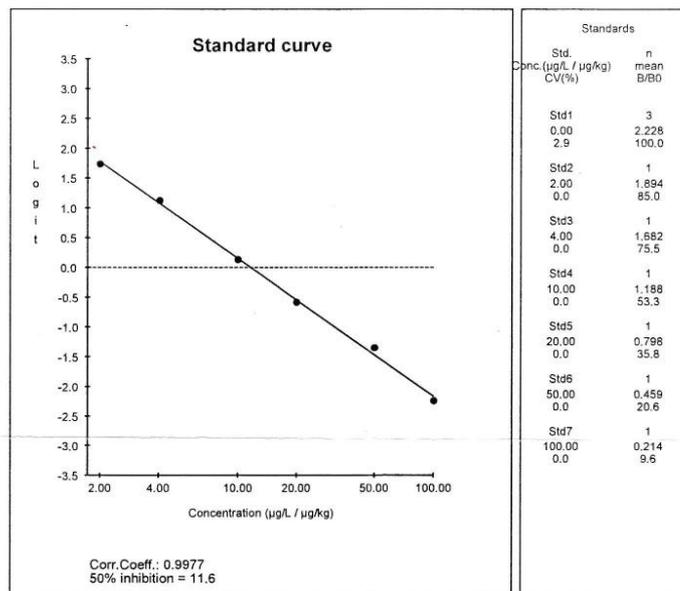
## Anexo A: Certificado de garantía de calidad del kit ELISA Ridascreen Fast Aflatoxin SC.

# Quality Assurance Certificate

## RIDASCREEN®FAST Aflatoxin SC

REF Art. No. R9002

LOT Lot 26390

 Expiry 2022-04


	Lot. No.	Expiry		Lot. No.	Expiry
Microtiter plate M	23140	2022-06	Stop solution	22131	2026-03
Standards	25360	2022-08			
Wash buffer salt Tween	13427	2022-09			
Conjugate	25340	2022-04			
Antibody	24360	2022-05			
Substrate/Chromogen (Red Chromogen Pro)	15279	2022-06			

IFU (and other accompanying documents where applicable)

We herewith certify that this batch has been approved by the Quality Control Department and has met the release criteria.

**Please note:** The absorbance for the standards may decrease during the shelf life of the kit. The general shape of the curve will remain similar, while the slope might change slightly. Furthermore refer to product leaflet section 8. Indication of instability or deterioration of reagents.

Quality Control Department

Date: 2021-09-07



Remark: This document is created electronically and therefore valid without a signature.  
R-Biopharm AG • An der neuen Bergstraße 17, 64297 Darmstadt, Germany • www.r-biopharm.com

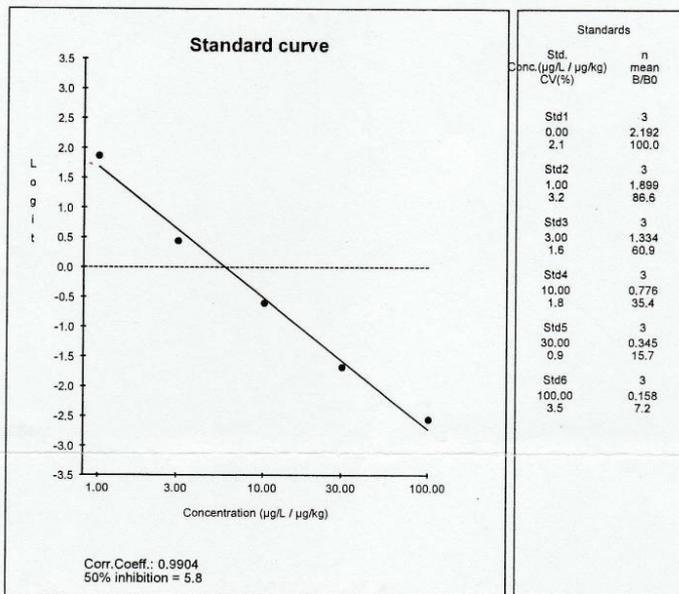


Anexo B: Certificado de garantía de calidad del kit ELISA Ridascreen Fast Ochratoxin A.

# Quality Assurance Certificate

## RIDASCREEN® FAST Ochratoxin A

<b>REF</b> Art. No.	R5402
<b>LOT</b> Lot	22391
<b>Expiry</b>	2022-09



	Lot. No.	Expiry		Lot. No.	Expiry
Microtiter plate	24281	2023-06	Stop solution	25331	2026-07
ECO extractor	26301	2022-12			
Standards	24371	2023-08			
Wash buffer salt Tween	13427	2022-09			
Conjugate	25371	2023-08			
Substrate/Chromogen (Red Chromogen Pro)	15518	2022-10			

IFU (and other accompanying documents where applicable)

We herewith certify that this batch has been approved by the Quality Control Department and has met the release criteria.

**Please note:** The absorbance for the standards may decrease during the shelf life of the kit. The general shape of the curve will remain similar, while the slope might change slightly. Furthermore refer to product leaflet section 8. Indication of instability or deterioration of reagents.

Quality Control Department

Date: 2021-09-28



Remark: This document is created electronically and therefore valid without a signature.  
 R-Biopharm AG • An der neuen Bergstraße 17, 64297 Darmstadt, Germany • www.r-biopharm.com



Anexo C: Diseño en bloques completamente al azar con arreglo factorial 3x2 de la concentración de OTA y AF.

<b>Bloque</b>	<b>Origen<sup>1</sup></b>	<b>Producto<sup>2</sup></b>
Marzo	9	grano
		nibs
		cascarilla
	10	grano
		nibs
		cascarilla
Abril	9	grano
		nibs
		cascarilla
	10	grano
		nibs
		cascarilla

<sup>1</sup> Factor 1.

<sup>2</sup> Factor 2.

Anexo D: Concentración de OTA en las muestras de granos de cacao de 12 orígenes (tratamientos).

Origen <sup>1</sup>	N	Concentración ( $\mu\text{g Kg}^{-1}$ )		
		Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
12	3	8.52	19.29	22.77
11	3	6.33	10.15	12.46
10	3	7.17	7.61	10.56
3	3	4.40	7.89	10.77
4	3	2.90	5.92	13.37
7	3	4.88	5.86	11.17
1	3	5.43	7.00	8.39
9	3	2.76	6.05	7.41
8	3	2.28	3.25	5.91
5	3	1.07	2.96	4.82
2	3	1.30	2.87	2.91
6	3	1.44	1.93	3.07

<sup>1</sup> Humedad del 2 al 3% en el grano seco en las localidades 9, 10, 11 y 12 y humedad de aproximadamente 8% en las otras localidades.

Anexo E: Concentración de AF en las muestras de granos de cacao de 12 orígenes (tratamientos).

Origen <sup>1</sup>	N	Concentración ( $\mu\text{g Kg}^{-1}$ )		
		Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
3	2	180.17	225.33	202.75
5	2	78.13	84.50	81.32
1	2	61.39	83.16	72.28
4	3	30.61	50.68	60.10
8	3	27.85	34.20	43.90
2	3	18.17	20.30	33.49
7	3	13.02	19.01	24.44
6	2	8.71	20.15	14.43
11	3	7.13	8.87	11.45
9	3	3.99	9.18	13.66
10	3	4.80	10.50	10.65
12	3	2.24	5.10	9.37

<sup>1</sup> Humedad del grano seco de 2 a 3% en las localidades 9, 10, 11 y 12 y humedad de aproximadamente 8% en las otras localidades.

Anexo F: Concentración de AF totales en granos, nibs y cascarilla.

Producto*Origen	N	Concentración ( $\mu\text{g Kg}^{-1}$ )	
		Réplica 1	Réplica 2
Nibs, 10	2	8.31	12.96
Cascarilla, 10	2	9.38	10.86
Cascarilla, 9	2	9.61	11.38
Granos, 9	2	6.8	7.57
Nibs, 9	2	8.53	8.66