

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**Identificación molecular de hongos productores de aflatoxina y
ocratoxina en desechos de cacao**

Alisson Nicole Largo Luna

Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito
para la obtención del título de
Ingeniera en Biotecnología

Quito, 20 de diciembre de 2023

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA

**Identificación molecular de hongos productores de aflatoxina y
ocratoxina en desechos de cacao**

Alisson Nicole Largo Luna

Nombre del profesor, Título académico

Sonia Zapata Mena, PhD

Quito, 20 de diciembre de 2023

© **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.

Nombres y apellidos: Alisson Nicole Largo Luna

Código: 212601

Cédula de identidad: 1722946082

Lugar y fecha: Quito, 20 de diciembre de 2023

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UNPUBLISHED DOCUMENT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 capstone 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>.

RESUMEN

Las aflatoxinas (AFs) y ocratoxinas (OTA) son metabolitos secundarios tóxicos que pueden ser producidos por hongos, pertenecientes a los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*. Debido a su estructura química son termoestables, persistentes en los alimentos y se pueden bioacumular lo que puede causar afectaciones severas a la salud humana y animal. Existen reportes que revelan niveles de AFs y OTA que superan la normativa establecida de 15µg/kg para cascarilla de cacao. Este estudio pretende identificar las especies de hongos presentes en 12 muestras de cascarillas de cacao provenientes de la costa y oriente ecuatorianos que previamente reportaron concentraciones entre 5.57 y 202.75 µg/kg para AFs y para OTA de 2.15 a 16.86 µg/kg. Para la identificación molecular, se extrajo ADN de 29 colonias de hongos aisladas, luego se amplificó y secuenció un fragmento de 600 a 800 pares de bases de la región espaciadora interna transcrita (ITS). Los resultados demostraron la presencia de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus wentii* y *Aspergillus fumigatus*, los cuales se han reportado como productores de aflatoxinas y ocratoxinas. No se encontró *Aspergillus ochraceus* y *Penicillium verrucosum* descritos como productores de ocratoxina. La presencia de estos hongos en la cascarilla de cacao podrían ser una medida indirecta de la presencia de micotoxinas en el producto final que es el chocolate, por lo que es importante establecer medidas preventivas y mejorar el proceso de la fermentación del cacao.

Palabras clave: *Aspergillus*, aflatoxina, ocratoxina, cascarilla de cacao.

ABSTRACT

Aflatoxins (AFs) and ochratoxins (OTA) are toxic secondary metabolites that can be produced by molds, belonging to the genera *Aspergillus* and *Penicillium*. Due to their chemical structure, they are thermostable, persistent in food and can bioaccumulate which can cause severe effects on human and animal health. There are reports that reveal levels of AFs and OTAs that exceed the established norm of 15 µg/kg for cocoa husk. This study aims to identify the mold species present in 12 samples of cocoa husks from the Ecuadorian coast and Amazonia that previously reported concentrations between 5.57 and 202.75 µg/kg for AFs and for OTA from 2.15 to 16.86 µg/kg. For molecular identification, DNA was extracted from 29 isolated mold colonies, then amplified and sequenced from 600 to 800 base pairs of the transcribed internal spacer region (ITS). The results showed the presence of *Aspergillus flavus*, *Aspergillus wentii* and *Aspergillus fumigatus*, which have been reported as producers of aflatoxins and ochratoxins. *Aspergillus ochraceus* and *Penicillium verrucosum* described as ochratoxin producers were not found. The presence of these fungi in the cocoa shell could be an indirect measure of the presence of mycotoxins in the final product, which is chocolate, so therefore it is important to establish preventive measures and improve the fermentation process of cocoa.

Keywords: *Aspergillus*, aflatoxin, ochratoxin, cocoa husk.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	10
MÉTODOS	14
1. Muestras de desecho de cacao (Cascarilla)	14
2. Cultivo de hongos	14
3. Identificación microscópica de hongos	14
4. Identificación molecular	15
RESULTADOS	17
DISCUSIÓN	19
CONCLUSIONES	23

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Descripción de las muestras, concentración micotoxinas y hongos identificados.....	24
--	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Características morfología de <i>Aspergillus</i> y <i>Penicillium</i>	28
Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa de la amplificación de la región ITS.....	28
Figura 3. Árbol filogenético por el método Neighbor – joining.....	29

INTRODUCCIÓN

Los hongos filamentosos, en particular los pertenecientes a los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*, se han identificado como productores de micotoxinas. Las micotoxinas son metabolitos tóxicos secundarios, los cuales presentan una estructura con anillos aromáticos que les permite ser termoestables y persistentes (Caceres et al., 2020; Raters & Matissek, 2008). Además, se conoce que los hongos pueden desarrollar estas toxinas como una estrategia de supervivencia en ambientes extremos (Adams, Moss, & McClure, 2016). Entre las micotoxinas más comunes, destacan las aflatoxinas (AF) y ocratoxinas (OTA). La aflatoxina de tipo B1 (AFB1) se asocia a *Aspergillus flavus*, mientras que la aflatoxina G1 (AFG1) puede ser producida por *Aspergillus parasiticus*; ambos hongos pertenecen a la familia *Aspergillaceae*. Por otro lado, la ocratoxina A es comúnmente producida por *Penicillium verrucosum* y *Aspergillus ochraceus* (Delgado-Ospina et al., 2022). Es importante señalar que no todas las especies del género *Aspergillus* son micotoxigénicas como por ejemplo *Aspergillus oryzae* o *Aspergillus sojae* (Mohammed et al., 2021).

La presencia de micotoxinas es de gran relevancia en la industria alimentaria, ya que se ha demostrado que su consumo diario en concentraciones que superen los límites máximos permitidos establecidos por organizaciones internacionales o autoridades gubernamentales puede tener graves implicaciones para la salud. Debido a que estos metabolitos secundarios se pueden acumular en el hígado y los riñones y tienen propiedades carcinogénicas que afectan al sistema inmunológico (Caceres et al., 2020; Guan et al., 2021). Las aflatoxinas han sido clasificadas como carcinogénicas por la Organización Mundial de la Salud (OMS), mientras que las ocratoxinas se consideran posiblemente carcinogénicas (Spaggiari, Morelli, Riani, & Cozzini, 2022).

Los hongos micotoxigénicos pueden proliferar en la materia prima agrícola y en los alimentos durante las etapas de cultivo, cosecha, almacenamiento y procesamiento, lo que puede comprometer la calidad e inocuidad de los productos (Delgado-Ospina et al., 2021). Esta problemática se intensifica en las zonas tropicales y subtropicales, donde las condiciones ambientales, como las altas temperaturas y la alta humedad, son propicias para el desarrollo de estos hongos (Caceres et al., 2020). Las micotoxinas se han detectado en alimentos susceptibles a la contaminación por hongos, como cereales, cacao, maíz, alimentos secos y piensos (Moura-Mendes et al., 2023). La exposición a las micotoxinas, especialmente las AFs, se estima que afecta alrededor de 4.5 millones de personas anualmente a través de la ingesta de alimentos (Chilaka, Obidiegwu, Chilaka, Atanda, & Mally, 2022). Por tanto, es importante establecer estrictos estándares de control en las condiciones de cultivo, almacenamiento y procesamiento de alimentos para prevenir el crecimiento de hongos y la producción de micotoxinas.

El cacao es un cultivo nativo de regiones tropicales como Ecuador, Colombia, Brasil, y es uno de los productos de exportación más importantes a nivel mundial. El Ecuador fue de los primeros productores de cacao en América cerca del siglo XIX y actualmente es el tercer país que exporta y produce cacao después de Costa de Marfil y Ghana (Anecacao, 2022). En el último año se llegó a exportar cerca de 360 mil toneladas de cacao, por lo que es una de las bases de la economía del Ecuador (Anecacao, 2022). Adicionalmente, por la ubicación del Ecuador permite el crecimiento de variedades de cacao como el cacao Arriba, el cual también es utilizado para la producción de chocolate. Dada su importancia a nivel global, la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) ha establecido regulaciones estrictas con respecto a la contaminación por micotoxinas. Cerca de 100 países han fijado límites de presencia de micotoxinas en alimentos y piensos (Alshannaq & Yu, 2017). Sin embargo, a pesar de estas

medidas, aproximadamente el 25% de los productos agrícolas se contaminan con micotoxinas cada año (Spaggiari et al., 2022).

Adicionalmente, la comisión del Codex Alimentarius y la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) han establecido límites máximos de micotoxinas en el chocolate y cascarilla de cacao. Estos límites son particularmente bajos dada la alta toxicidad de estas sustancias. Según la Codex para las AFs en la cascarilla de cacao su límite se encuentra entre 0.5 a 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y para OTA es de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, mientras que la FDA tiene como máximo 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para ambas (Wan, Chen, & Rao, 2020). Por otro lado, para el chocolate al ser un producto altamente consumido a nivel mundial el límite máximo permitido es de 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para AFs y OTA (Kabak, 2019). No obstante, cada país puede establecer los niveles máximos, como por ejemplo la Unión Europea estableció en 2006 una tolerancia de 2 a 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de OTA en el café, cacao y cereales (Taniwaki, Pitt, Copetti, Teixeira, & Iamanaka, 2019).

Hasta la fecha, los métodos de prevención y control de contaminación por micotoxinas son limitados y a menudo inaccesibles para los países en desarrollo. El método más utilizado es el tratamiento térmico en el tostado ya que se lleva a cabo a temperaturas bastante altas (140 – 145°C) donde los hongos pueden dejar de ser viables (Raters & Matissek, 2008). Por otra parte, investigaciones previas han demostrado que estrategias implementadas en cultivos de cacahuates han reducido la contaminación por aflatoxinas un 88% gracias al uso de productos como Afla-guard®. Un biofungicida que contiene cepas no toxigénicas competitivas de *A. flavus*. (NRRL 21882) y se emplea como una herramienta de gestión de riesgos (Mohammed et al., 2021). Además, se han explorado cepas nativas que no producen aflatoxinas, con resultados prometedores en el control y reducción de micotoxinas. (Mohammed et al., 2021). Aunque existen métodos químicos y físicos que pueden disminuir la biodisponibilidad de las micotoxinas, también pueden

generar residuos perjudiciales para el ser humano y alterar el sabor de los alimentos. Por otro lado, los métodos biológicos que se basa en el uso de microorganismos con propiedades desintoxicantes pueden ofrecer una desintoxicación más completa y específica (Guan et al., 2021).

Dada esta información el objetivo de esta investigación es identificar los hongos productores de micotoxinas en cascarilla de cacao que tiene niveles fuera del rango permitido. Además, evaluar de manera indirecta la calidad del chocolate ecuatoriano.

MÉTODOS

1. Muestras de desecho de cacao (Cascarilla)

Para este estudio, se emplearon 12 muestras de desecho de cacao (cascarilla) provenientes de diferentes zonas de la costa y oriente ecuatoriano, en las cuales previamente se cuantificó aflatoxina y ocratoxina mediante método inmunológico (ver tabla 1).

2. Cultivo de hongos

De cada muestra se preparó una dilución 1:2, para la cual, se pesó 20 g de cascarilla en una funda estéril y se agregó 40 ml de Agua Peptonada (0,1%). Se homogenizó por unos minutos y luego se colocó 1 ml de esta dilución en Agar Sabouraud con 0.05% de gentamicina fundido. Se homogenizó el inóculo en el medio de cultivo con la ayuda de un agitador, se dejó solidificar las cajas Petri a temperatura ambiente sobre un mesón y se incubaron a 25°C durante un período de 3 a 5 días.

3. Identificación microscópica de hongos

Para la identificación morfológica de los hongos se utilizó el método de cinta adhesiva, para esto se tocó con el lado adhesivo de la cinta una colonia de hongo y se colocó sobre una gota de azul de algodón de lactofenol en una placa portaobjetos y se observó bajo el microscopio con los objetivos 10X y 40X.

Se consideraron características tales como la morfología de las cabezas conidiales ya que *Aspergillus* tiene una vesícula terminal que puede ser biseriada o uniseriada (ver figura 1A). Mientras que *Penicillium* carece de una vesícula y solo tiene ramas y métulas (ver figura 1B). Adicionalmente se consideró la morfología de los conidios al ser características relevantes para determinar diferentes especies de *Aspergillus*. Los conidios pueden ser globosos con pared lisa o pared rugosa (ver figura 1A).

Todas las colonias identificadas como pertenecientes a los géneros: *Aspergillus* y *Penicillium*, (figura 1) se sembraron con ayuda de un asa de metal en tubos de agar Sabouraud con 0.05% gentamicina en pico de flauta y se incubó a 25°C por 5 días. Finalmente, las cepas se conservaron a temperatura ambiente, para su posterior identificación molecular.

4. Identificación molecular

En primer lugar, se procedió a la extracción de ADN siguiendo el protocolo del kit de extracción DNeasy® Power Pro Soil (QIAGEN). Para este protocolo se pesó 0.25g de muestra en los tubos PowerBead Pro que contiene el kit y se añadió 800 µl de la Solución CD1. Posteriormente, para la homogenización y lisis de las células se realizó vórtex horizontal de 30 – 40 minutos. Para obtener el sobrenadante se centrifugó a 15 000 rpm. Se añadió 200 µl de la Solución CD2 y se centrifugó nuevamente a la misma velocidad. Luego se transfirió 700 µl de sobrenadante a los tubos de microcentrífuga y se agregó 600 µl de la solución CD3. De la solución lisada obtenida se pasó 650 µl a la columna de centrifugación MB que se encuentra en el kit. A partir de este paso se centrifugó cada vez que se añadía una solución y se descartaba el flujo. Después se añadió 500 µl de la Solución EA, luego se agregó 500 µl de la Solución C5 y finalmente se añadió 50 – 100 µl de la Solución C6 (buffer de elución).

Tras la extracción de ADN, se cuantificó su concentración en ng/µl utilizando el espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific). Se evaluó la calidad del ADN mediante los índices 260/280 y 260/230 nm, utilizados como indicadores de pureza y contaminación.

Para la reacción en cadena de la polimerasa PCR de la región espaciadora interna transcrita, ITS por sus siglas en inglés (Internal Transcribed Spacer), la cual se encuentra entre los genes del 18S rRNA y 28S rRNA de una región de 600 a 800 pares de bases, se estableció un protocolo con un volumen de 30 µl por reacción, siguiendo las concentraciones de reactivos específicas: 1X de

Buffer sin color, 2 mM de MgCl₂, 2 mM de dNTPs, 0.21 mM de primer ITS 4, 0.21 mM de primer ITS 1, 0.25 U/μl de Taq Polimerasa y 6 μl de ADN. El programa del termociclador incluyó una denaturación inicial a 94°C durante 4 minutos, seguida de 30 ciclos de denaturación a 94°C durante 45 segundos, annealing a 60°C durante 30 segundos, una elongación a 72°C durante 45 segundos y una elongación final a 72°C durante 15 minutos.

Posteriormente, para visualizar la banda de aproximadamente 700 pb, se realizó la electroforesis en gel de agarosa al 1.5% y se añadió 0.05 μl de SYBR Safe. Tras cargar los amplicones en el gel, se corrió con un Ladder de 100pb y se llevó a cabo la electroforesis a 100 V durante 30 minutos. Se visualizó mediante luz UV en un foto documentador (figura 2).

Los productos de PCR se enviaron a Macrogen Inc. (Seoul, República de Corea) para su secuenciación. Las secuencias obtenidas se sometieron a un proceso de limpieza y se generó secuencias consenso. Para ello se utilizó el paquete Staden con PreGap y Gap4 (Standen, 1996). Luego se comparó con la base de datos del GenBank del NCBI. Las secuencias se alinearon con la ayuda de Bioedit (Hall, 1999). Se construyó un árbol filogenético con Mega con el fin de analizar las diferencias entre ellas (Tamura, Stecher, and Kumar., 2021).

RESULTADOS

De las 12 muestras analizadas se obtuvieron 29 colonias con coloración y morfología sugerente de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*. En su mayoría se observaron colonias con coloración verde (diferentes tonalidades), amarillo, azul, blancas o café; las mismas que presentaron diferentes texturas tales como: algodonosas, polvorientas y viscosas, ver tabla 1. Finalmente, se identificaron a nivel microscópico 22 colonias como *Aspergillus spp.* y 7 colonias como *Penicillium spp.*

Se obtuvieron las secuencias de 29 colonias y se compararon con 8 secuencias de referencia, con las cuales se construyó un árbol filogenético por el método de Neighbor Joining (NJ) (ver figura 3). En el cual, se puede ver que 13 muestras forman un clado con *Aspergillus flavus*, 2 se identificaron como *A. oryzae*, 1 con *A. wentii*, 3 con *A. fumigatus*, 2 con *A. rugulosus*, 5 con *Penicillium citrinum*, *A. tamaritii* se utilizó como grupo externo. Dos secuencias correspondieron a *Talaromyces purpureogenus* y *Paecilomyces variotii* lo que confirmó la inespecificidad de los métodos microscópicos para la identificación de hongos.

Posterior a la identificación molecular se identificó caracteres morfológicos comunes a las especies de hongos encontradas. En el caso de *Aspergillus flavus* se observó que las colonias presentan una textura algodonosa y polvorienta de colores verde oscuro y amarillo con bordes blancos. *Aspergillus fumigatus* tenía colonias polvorientas y algodonosas de colores azul y café verdoso con bordes blancos. *Aspergillus oryzae* presentó colonias algodonosas de color café. *Aspergillus wentii* tenía colonias algodonosas, verdes con cierto relieve. *Aspergillus rugulosus* se observó colonias rugosas, polvorientas de color café con bordes azules. Por último, *Penicillium citrinum* presentó colonias polvorientas de color verde degradado a café y blanco y una colonia azul verdosa no uniforme.

Como se observa en la tabla 1, las muestras que tienen concentraciones de aflatoxina entre 5.57 – 202.75 µg/kg se identificó *A. flavus* en 7 muestras, *A. fumigatus* en 3 muestras y *A. wentii* en 1 muestra. Por otro lado, la muestra que tienen concentraciones de ocratoxina de 2.15 – 16.86 µg/kg se identificó *P. citrinum*.

DISCUSIÓN

En este estudio se identificó *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. wentii*, *A. oryzae* y *P. citrinum* que se han reportado anteriormente en muestras de cacao durante el proceso de fermentación (Delgado-Ospina et al., 2021). De los cuales se ha reportado previamente a *A. flavus* como productor de aflatoxina, mientras que *A. fumigatus*, *A. wentii* son productores de ocratoxina (Rizzo, Eskola, & Atroshi, 2002). Los cuales se encuentran presentes en muestras que superan los límites máximos establecidos por el Codex Alimentarius de 15 y 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Copetti, 2009). Por otro lado, no se identificó a *A. parasiticus*, *P. verrucosum* y *A. ochraceus* que han sido reportados en cacao, esto puede deberse a factores que pueden inhibir su crecimiento tales como temperatura de incubación, medio de cultivo, competencia con otros hongos entre los más importantes (Delgado-Ospina et al., 2021). Se ha descrito que *A. ochraceus* y *P. verrucosum* crecen mejor en medios de cultivo con extracto de levadura o agar de maíz, mientras que *A. flavus* y *A. parasiticus* prefieren los sustratos ricos en nutrientes como el agar Sabouraud utilizado en este estudio o agar de papa – dextrosa (PDA) (Lund & Frisvad, 2003). Además, es importante destacar que la ausencia de hongos no asegura la ausencia de micotoxinas, ya que tanto la aflatoxina como la ocratoxina son compuestos químicos resistentes, capaces de persistir en alimentos durante períodos prolongados incluso cuando la especie fúngica ya no es viable (Copetti, 2009).

El origen de los hongos productores de AFs y OTA en la cascarilla de cacao es el suelo ya que están presentes de manera natural y son favorecidos por temperaturas cercanas a los 30°C (Arreguin-Perez, Miranda-Miranda, Folch-Mallol, & Cossío-Bayúgar, 2023; Guan et al., 2021). Entre las zonas más afectadas son los trópicos, esto se debe a que son las condiciones adecuadas para el crecimiento de hongos y la producción de micotoxinas (Akinola, Ateba, & Mwanza, 2021). Se ha considerado que la cosecha y el almacenamiento de los alimentos pueden ser puntos críticos

(Moura-Mendes et al., 2023), debido a que los granos pueden estar en el suelo por períodos prolongados ya que no son recolectados de manera inmediata (Taniwaki et al., 2019). Asimismo, se conoce que la contaminación de la cascarilla de cacao puede provenir de fuentes como insectos, suelo, polvo o por contaminación cruzada, es decir los implementos utilizados durante la cadena de producción (Delgado-Ospina et al., 2022).

Por otro lado, la presencia de *A. oryzae* y *A. rugulosus* también son importantes ya que se los ha clasificado como especies moderadamente tóxicas (Semeniuk, Harshfiel, Carlson, Hesseltine, & Kwolek, 1971). Debido a que producen ácido ciclopiazónico y esterigmatocistina (precursor de aflatoxina B1) respectivamente y ambos son metabolitos secundarios tóxicos que producen efectos adversos en la salud humana (Barkai-Golan, 2008).

Talaromyces y *Paecilomyces* no son productores de aflatoxina y ocratoxina; sin embargo, fueron identificados microscópicamente como *Penicillium* por su morfología similar lo cual confirma la necesidad de la utilización de método moleculares para su adecuada identificación.

Según Arreguin-Perez (2023) las características fenotípicas de las colonias pueden estar influenciadas por las condiciones ambientales en las que se desarrollan los hongos. Es decir, si existen factores de estrés como cambios en la temperatura, nutrientes, cantidad de oxígeno, humedad o actividad de agua; el color y textura de las colonias pueden variar. *Aspergillus spp.* se reportó que puede tener cambios en su pigmentación por exposiciones previas a fungicidas lo que provoca mutaciones en su fenotipo. Incluso existe la hipótesis que menciona que ciertos fungicidas pueden influenciar en la producción de melanina y asimismo aumentar la síntesis de micotoxinas (Masiello, Somma, Haidukowski, Logrieco, & Moretti, 2020).

Por lo tanto, la identificación molecular es sumamente importante debido a que a nivel macro y microscópico solo se puede identificar a nivel de géneros como *Aspergillus* y *Penicillium* y la producción de AFs y OTA está asociadas a ciertas especies definidas. Por lo que, la secuenciación del gen ITS conocido por tener una gran variabilidad y facilitar la diferenciación entre especies cercanas ayudó a la identificación a nivel de especie (Laut et al., 2023). Sin embargo, el gen ITS tiene ciertas limitaciones para resolver la relación entre *A. flavus* y *A. oryzae* ya que son especies con una alta similitud genética que pueden llegar a formar un solo clado y se sugiere que *A. oryzae* puede ser una variante morfológica de *A. flavus* (Chang & Ehrlich, 2010). A pesar de su similitud, *A. oryzae* no es productora de AFs debido a que con el tiempo se ha domesticado esta especie para su uso en la industria alimentaria y se perdió la región que contiene los genes que se encuentran relacionados con la producción de micotoxinas (Chang & Ehrlich, 2010). Debido a este problema se ha considerado que adicionalmente a la amplificación del gen ITS se considere amplificar otras regiones del genoma como el gen 18S y el gen de la calmodulina (CaM)(Arias, Orner, Martinez-Castillo, & Sobolev, 2021; Laut et al., 2023).

Dada esta información es fundamental garantizar la correcta y eficiente implementación de los procesos de producción durante la elaboración de subproductos del cacao, como es el caso del chocolate. Ya que la presencia de aflatoxinas tiene gran impacto en la salud por ser carcinogénicas, sobre todo las de tipo B1 (Arreguin-Perez et al., 2023). Además, las micotoxinas también pueden afectar a los estándares de calidad del chocolate (Delgado-Ospina et al., 2022). Por lo tanto, para eliminar la presencia de hongos productores de micotoxinas en el cacao se toman en cuenta ciertas estrategias. Por ejemplo, durante la producción de chocolate, los granos de cacao son sometidos a un proceso de tostado, el cual se lleva a cabo a una temperatura de 120 a 145°C. A esta temperatura se elimina la cascarilla de cacao y se elimina los hongos presentes (Delgado-Ospina et al., 2021).

Adicionalmente se reportó que hay una degradación completa de AFs y OTA cuando el tratamiento térmico se realiza a 180°C por un periodo de tiempo de 30 minutos (Raters & Matissek, 2008). Aunque el tratamiento térmico puede reducir las concentraciones de micotoxinas y hongos, la mejor manera de prevenir la contaminación es tomar medidas durante la producción y almacenamiento de los alimentos para evitar la proliferación de los hongos (Copetti, Iamanaka, Pitt, & Taniwaki, 2014). Se conoce que el almacenamiento en condiciones secas y frescas de entre 15 y 20°C, puede prevenir la proliferación de hongos (Akinola et al., 2021). Por último, se debe tomar en cuenta que la cascarilla es material de desecho, así que con las medidas necesarias en los puntos críticos de elaboración se puede disminuir la concentración de micotoxinas hasta los límites recomendados y permitidos por cada país (Kabak, 2019).

Se conoce que las micotoxinas pueden afectar de manera negativa a la calidad del chocolate, por lo que en Ecuador se debe comenzar a seguir medidas estrictas para disminuir la presencia de estas. Países los cuales cuentan con normativa y son productores de chocolate son Nigeria, países de la Unión Europea, Italia, Brasil, donde sus límites permitidos son de 4, 1, 0.5, 5 µg/kg respectivamente (Alshannaq & Yu, 2017; Copetti et al., 2014; Delgado-Ospina et al., 2022). Por lo que, este estudio abre paso a futuras investigaciones para que como principal país exportador no solo se enfoque en producir cacao de alta calidad, sino también establecer estándares ejemplares para la industria mundial del cacao.

CONCLUSIONES

1. Se identificó *Aspergillus flavus*, *Aspergillus wentii* y *Aspergillus fumigatus* en muestras de cascarilla de cacao que presentaron niveles de aflatoxina y ocratoxina que superan los límites establecidos por la Codex Alimentarius, los cuales se han identificado como productores de estas micotoxinas
2. No se identificó a *Aspergillus ochraceus* y *Penicillium verrucosum* principales productores de ocratoxina puede deberse a factores como la temperatura de incubación y el medio de cultivo utilizado en este estudio, así como factores implícitos de la microbiota de estas muestras y la estabilidad de las micotoxinas.
3. La contaminación de hongos productores de AFs y OTA en la cascarilla de cacao es una medida indirecta de su presencia en chocolate. Por lo que, al ser el Ecuador un país reconocido a nivel mundial por la calidad del chocolate es importante emprender medidas para prevenir y reducir la presencia de micotoxinas.

TABLAS

Tabla 1. Descripción de las muestras, concentración micotoxinas y hongos identificados.

Muestra	Micotoxinas ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		Colonias aisladas y morfología	Identificación molecular
	Aflatoxina	Ocrotolina		
Cascarilla 1	72.28*	6.94		<i>Talaromyces purpureogenus</i>
Cascarilla 2	23.99*	2.36		<i>Aspergillus fumigatus</i>
Cascarilla 3	202.75*	7.69	No hubo crecimiento	N/A
Cascarilla 4	47.13*	7.40		<i>Aspergillus wentii</i>
				<i>Aspergillus oryzae</i>
				<i>Penicillium citrinum</i>
Cascarilla 5	81.31*	2.95		

				<i>Aspergillus flavus</i>
Cascarilla 6	14.43	2.15	 	<i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus fumigatus</i>
Cascarilla 7	18.82*	7.30	  	<i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus rugulosus</i> <i>Penicillium citrinum</i>

Cascarilla 8	35.32*	3.81		<i>Aspergillus flavus</i>
Cascarilla 9	8.94	5.41		<i>Aspergillus fumigatus</i>
				<i>Aspergillus fumigatus</i>
				<i>Aspergillus rugulosus</i>
Cascarilla 10	8.65	8.45		<i>Aspergillus flavus</i>
				<i>Penicillium citrinum</i>
Cascarilla 11	5.57	16.86*		<i>Penicillium citrinum</i>

				<i>Paecilomyces variotii</i>
Cascarilla 12	9.15	9.65		<i>Aspergillus flavus</i>

* Muestras que superan lo recomendado por la Comisión del Codex Alimentarius de $15\mu\text{g Kg}^{-1}$ en aflatoxinas y $10\mu\text{g Kg}^{-1}$ en ocratoxinas.

FIGURAS

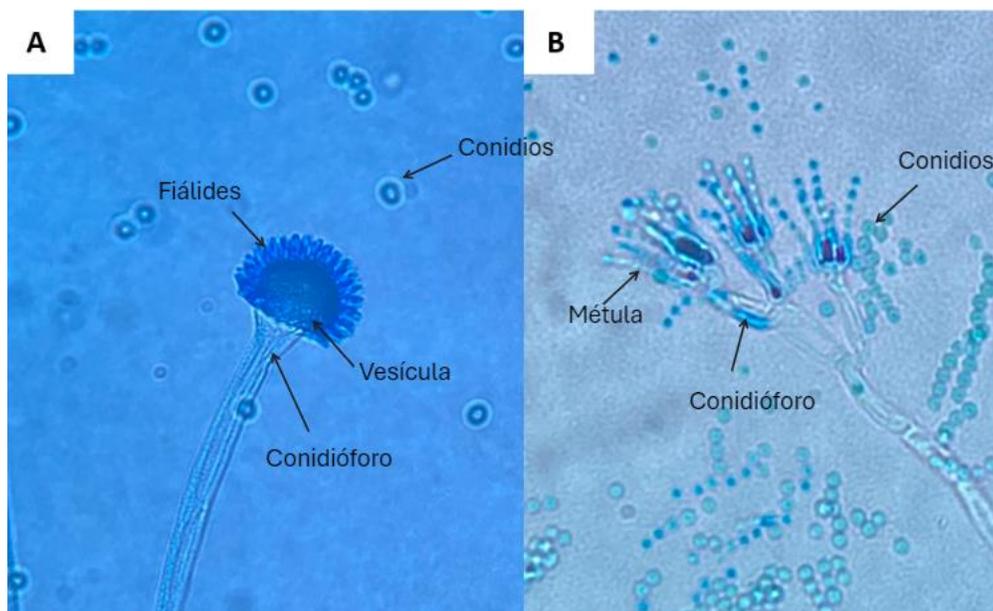


Figura 1. Características morfológicas de *Aspergillus* (A) y *Penicillium* (B)

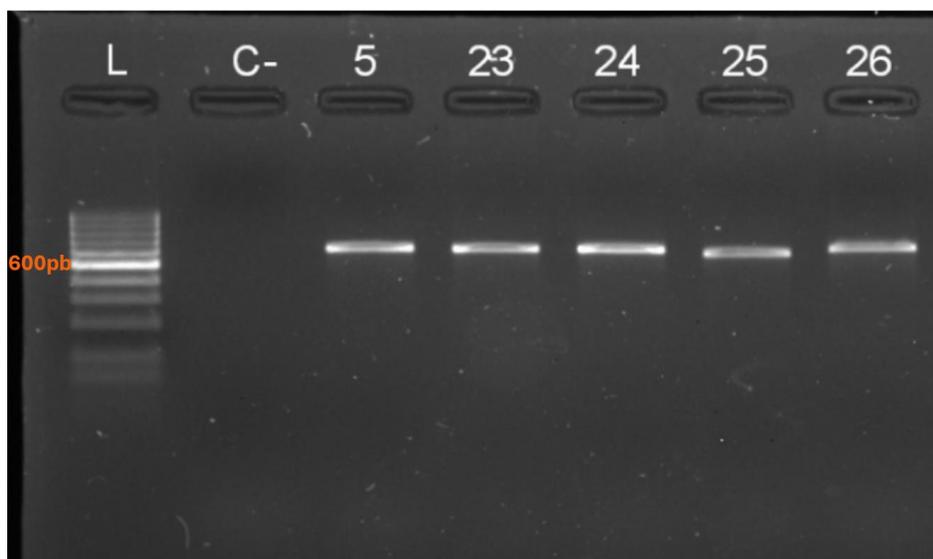


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de la amplificación de la región ITS de 600 a 800pb.

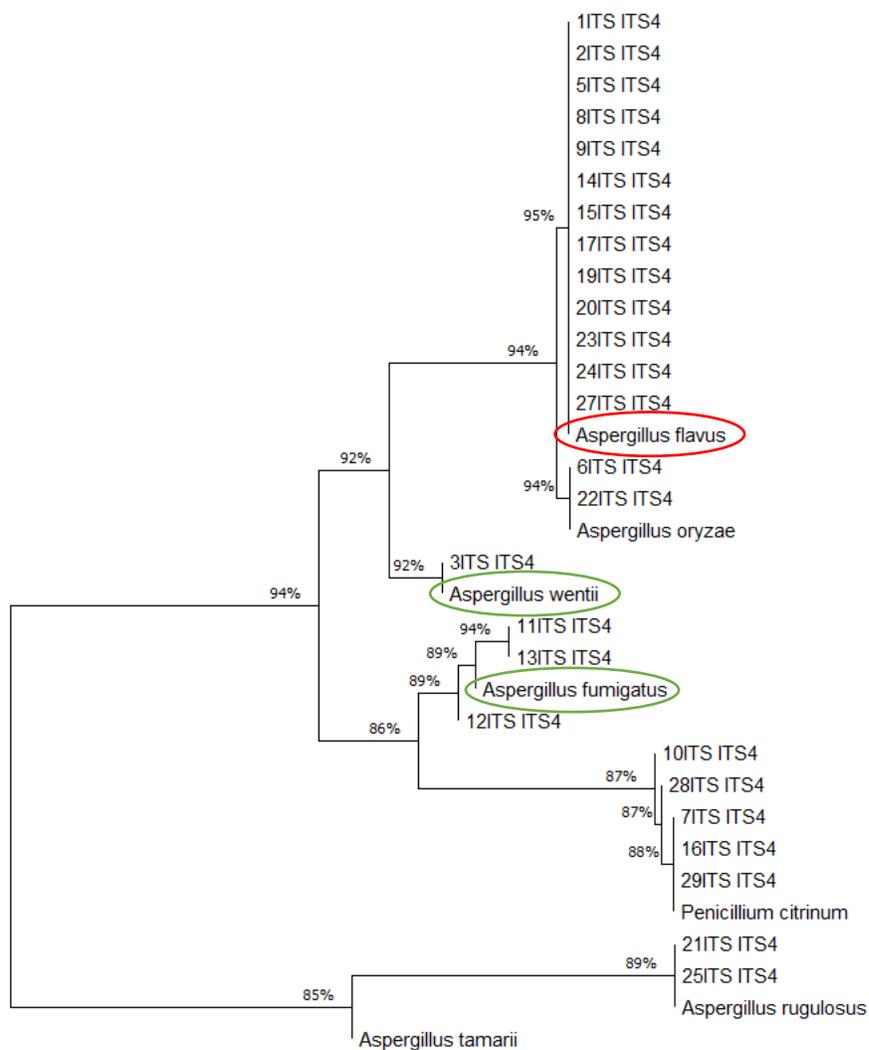


Figura 3. Árbol filogenético por el método Neighbor – joining de 26 secuencias provenientes de las muestras analizadas y 7 secuencias de referencia de algunas especies de *Aspergillus* y *Penicillium*. La especie productora de aflatoxina se identifica en color rojo y las especies productoras de ocratoxina en verde.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, M., Moss, M., & McClure, P. (2016). *Food Microbiology* (4th ed.). Royal Society of Chemistry.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109369>
- Alshannaq, A., & Yu, J. H. (2017). Occurrence, toxicity, and Analysis of Major Mycotoxins in Food. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(632). <https://doi.org/10.3390/ijerph14060632>
- Anecacao. (2022). Ecuador, origen del cacao. *ANECACAO*, 24. Recuperado de <https://anecacao.com/wp-content/uploads/2023/07/24.-REVISTA-ANECACAO-24.pdf>
- Arias, R. S., Orner, V. A., Martinez-Castillo, J., & Sobolev, V. S. (2021). *Aspergillus* Section Flavi, Need for a Robust Taxonomy. *Microbiology Resource Announcements*, 10(48), 99–101. <https://doi.org/10.1128/mra.00784-21>
- Arreguin-Perez, C. A., Miranda-Miranda, E., Folch-Mallol, J. L., & Cossío-Bayúgar, R. (2023). Identification of Virulence Factors in Entomopathogenic *Aspergillus flavus* Isolated from Naturally Infected *Rhipicephalus microplus*. *Microorganisms*, 11(8). <https://doi.org/10.3390/microorganisms11082107>
- Barkai-Golan, R. (2008). *Aspergillus* Mycotoxins. En R. Barkai-Golan & N. Paster (Eds.), *Mycotoxins in Fruits and Vegetables* (pp. 27–44). Recuperado de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123741264000024>
- Caceres, I., Khoury, A. Al, El Khoury, R., Lorber, S., Oswald, I. P., El Khoury, A., ... Bailly, J. D. (2020). Aflatoxin biosynthesis and genetic regulation: A review. *Toxins*, 12(150), 28. <https://doi.org/10.3390/toxins12030150>
- Chang, P. K., & Ehrlich, K. C. (2010). What does genetic diversity of *Aspergillus flavus* tell us about *Aspergillus oryzae*? *International Journal of Food Microbiology*, 138(3), 189–199. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.01.033>
- Chilaka, C. A., Obidiegwu, J. E., Chilaka, A. C., Atanda, O. O., & Mally, A. (2022). Mycotoxin Regulatory Status in Africa: A Decade of Weak Institutional Efforts. *Toxins*, 14(7). <https://doi.org/10.3390/TOXINS14070442>
- Copetti, M. V. (2009). *MICROBIOTA DO CACAU= FUNGOS E MICOTOXINAS DO CACAU AO CHOCOLATE*. UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.023>
- 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(3). <https://doi.org/10.3390/jof7030202>

- Delgado-Ospina, J., Molina-Hernandez, J. B., Viteritti, E., Maggio, F., Fernández-Daza, F. F., Sciarra, P., ... Chaves-López, C. (2022). Advances in understanding the enzymatic potential and production of ochratoxin A of filamentous fungi isolated from cocoa fermented beans. *Food Microbiology*, 104. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2022.103990>
- Guan, Y., Chen, J., Nepovimova, E., Long, M., Wu, W., & Kuca, K. (2021). Aflatoxin Detoxification Using Microorganisms and Enzymes. *Toxins*, 13(46), 1–17. <https://doi.org/10.3390/TOXINS13010046>
- Hall, T.A. (1999) BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95-98.
- Kabak, B. (2019). Aflatoxins and ochratoxin A in chocolate products in Turkey. *Food Additives and Contaminants: Part B*, 12(4), 225–230. <https://doi.org/10.1080/19393210.2019.1601641>
- Laut, S., Poapolathep, S., Piasai, O., Sommai, S., Boonyuen, N., Giorgi, M., ... Poapolathep, A. (2023). Storage Fungi and Mycotoxins Associated with Rice Samples Commercialized in Thailand. *Foods*, 12(3). <https://doi.org/10.3390/foods12030487>
- Lund, F., & Frisvad, J. C. (2003). *Penicillium verrucosum* in wheat and barley indicates presence of ochratoxin A. *Journal of Applied Microbiology*, 95(5), 1117–1123. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.02076.x>
- Masiello, M., Somma, S., Haidukowski, M., Logrieco, A. F., & Moretti, A. (2020). Genetic polymorphisms associated to SDHI fungicides resistance in selected *Aspergillus flavus* strains and relation with aflatoxin production. *International Journal of Food Microbiology*, 334(July), 108799. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108799>
- 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. <https://doi.org/10.1186/s12866-021-02290-3>
- Moura-Mendes, J., Casal-Martínez, C. C., Rojas, C., Ferreira, F., Pérez-Estigarribia, P., Dias, N., ... Arrua, A. (2023). Species Identification and Mycotoxigenic Potential of *Aspergillus Section Flavi* Isolated from Maize Marketed in the Metropolitan Region of Asunción, Paraguay. *Microorganisms*, 11(1879), 22. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/microorganisms11081879>
- Raters, M., & Matissek, R. (2008). Thermal stability of aflatoxin B1 and ochratoxin A. *Mycotoxin Research*, 24(3), 130–134. <https://doi.org/10.1007/BF03032339>
- Rizzo, A., Eskola, M., & Atroschi, F. (2002). Ochratoxin A in cereals, foodstuffs and human plasma. *European Journal of Plant Pathology*, 108(7), 631–637. <https://doi.org/10.1023/A:1020683130901>
- Semeniuk, G., Harshfiel, G. ., Carlson, C. ., Hesseltine, C. ., & Kwolek, W. . (1971). Mycotoxins in *Aspergillus*. *Mycopathologia et Mycologia Applicata*, 43(954), 137–152.

- Spaggiari, G., Morelli, G., Riani, M., & Cozzini, P. (2022). A synergism of in silico and statistical approaches to discover new potential endocrine disruptor mycotoxins. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 435. <https://doi.org/10.1016/J.TAAP.2021.115832>
- Staden, R. (1996). The Staden sequence analysis package. *Molecular Biotechnology*, 5(3), 233. doi:10.1007 / bf02900361
- Tamura K, Stecher G, and Kumar S (2021) MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution*38:3022-3027
- Taniwaki, M. H., Pitt, J. I., Copetti, M. V., Teixeira, A. A., & Iamanaka, B. T. (2019). Understanding Mycotoxin Contamination Across the Food Chain in Brazil: Challenges and Opportunities. *Toxins*, 11(7). <https://doi.org/10.3390/TOXINS11070411>
- 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. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12546>