

**SECRETARIA DE EDUCACIÓN PÚBLICA
TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE VERACRUZ**

“Estudio de la dinámica de microorganismos (bacterias, levaduras y hongos filamentosos) que influyen en la contaminación del grano de cacao (*Theobroma cacao* L.) con Ocratoxina A (OTA)”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS EN ALIMENTOS

PRESENTA:

M.C. ELENA ISABEL CHAMPION MARTÍNEZ

ASESORES:

DRA. MIRNA LEONOR SUÁREZ QUIROZ

DR. OSCAR GONZÁLEZ RÍOS

DR. NÖEL DURAND

H. VERACRUZ, VER. MÉXICO

FEBRERO 2017

“Estudio de la dinámica de microorganismos (bacterias, levaduras y hongos filamentosos) que influyen en la contaminación del grano de cacao (*Theobroma cacao* L.) con Ocratoxina A (OTA)”

Por:

Elena Isabel Champion Martínez

Tesis propuesta a la

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO EN ALIMENTOS

del

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE VERACRUZ

Como requerimiento parcial para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS EN ALIMENTOS

Veracruz, Veracruz 13 Febrero 2017

Dedicada a mi hija Victoria, por ser la luz de mi corazón,
por su apoyo y paciencia infinita en todas mis travesías,
por sus manitas y sus ojos que me abrazan y me animan
aun en los momentos más oscuros
“Te quiero más que a mis ojos”

AGRADECIMIENTOS

A Dios por todas las bendiciones y los ángeles en mi camino.

Un agradecimiento especial a mi familia, mi padre **Jesús** por sus enseñanzas de vida, mi hermano **Aldo** por la complicidad y el cariño, a mi hermana **Gely** por sus buenos deseos y muy especialmente a mi madre **Ángeles** por sus consejos y sobre todo por sus oraciones a lo largo de todo este proceso de cambio.

A mi preciosa hija **Victoria**, quien siempre con una sonrisa anima todo y me llena de fuerza para continuar mi camino, te estaré eternamente agradecida por todo el amor que me das y que sabes es bien correspondido.

A mis abuelos Ángel † y Alfonsina †, por enseñarme a hacer las cosas bien siempre, los amo. A mi papá Porfirio, gracias por su cariño incondicional. A todos los integrantes de mi familia quienes han sido ejemplo de cariño y unión aun en momentos difíciles.

A **Guillita** y toda la familia en Veracruz; por todo el cariño y el apoyo durante mi estancia con mi hija en Veracruz. Un pensamiento especial a don Isaac †, por ser un buen amigo y consejero, siempre tan sabio y sonriente.

He de agradecer muy especialmente a mi asesora la **Dra. Mirna L. Suárez Quiroz**, quien me brindó la confianza y las herramientas necesarias para la realización de este trabajo, pero sobre todo por la paciencia y madurez con la que no solo guió este proyecto, sino mi experiencia en el mundo de la investigación, manifestando en todo momento su amistad y apoyo, sobre todo en momentos difíciles. Gracias por preocuparse y alegrarse conmigo.

A mi asesor el **Dr. Oscar González Ríos**, por sus amables consejos para el desarrollo de este trabajo y por recordarme que la investigación es apasionante y se debe disfrutar más aun cuando hay dificultades. Gracias por el café acompañado de consejos.

Al **Dr. Noël Durand d'Aniane**, mi papá francés, había pensado escribirte, dedicarte y agradecerte tantas cosas, pero a este punto me he quedado sin palabras... Trabajar con un doctor de tu nivel ha sido toda una experiencia, gracias por tu buen ejemplo como investigador, pero aún más como ser humano. No hay palabras que paguen tantas sonrisas y aprendizajes a tu lado.

A mi muy querido amigo el **Dr. Jean-Christophe Meile**, sin ti no hubiera sido posible la realización de este proyecto, tu asesoría en el plano de la biología molecular es y será invaluable para esta humilde estudiante. Gracias por tu amistad sincera y las sonrisas en laboratorio de biomol.

A toda mi familia del **CIRAD**, gracias por acogerme en sus reuniones, por permitirme formar parte de esta magnífica aventura que es la investigación, las fiestas y el café de las 9 am.

A **Pascaline**, una gran persona con quien tuve el gusto de compartir el “bureau” y una entrañable amistad, gracias por los consejos y el apoyo en mi estancia.

Celine, Yasmine y **Dora**, muchas gracias por hacerme sentir en casa, estos meses fuera de mi país. Son excelentes personas y maravillosas amigas. Las extraño cada vez que entro a un laboratorio.

Agradezco también al **Dr. Didier Montet**, por los consejos y las observaciones en el desarrollo de este trabajo. Muchas gracias por abrirme las puertas de su hogar, siempre será bienvenido en México.

A nuestra familia en el laboratorio de Café, gracias por recibir a esta extraña del laboratorio de bromatología que iba por café cada mañana. A Lía, Yeri, Karen, Samuel y bueno a todos, muchas gracias.

A mi muy querida amiga **Ceci**, quien me brindo su amistad sincera (con todas las crisis existenciales que conlleva), te quiero amiga, gracias por todo tu apoyo en momentos que realmente han sido fundamentales para mí.

A **Leo**, gracias por escucharme y por apoyarme cuando ha sido necesario, espero que nuestra amistad dure muchos años más.

A mi comité revisor: **Dra. Rosa María Oliart Ros, Dr. José Alberto Monroy Rivera y Dr. Mario Ramírez Lepe**, les agradezco el tiempo invertido a la revisión de mis presentaciones y documentos en este complicado proceso y las acertadas observaciones que me permitieron crecer a la par de mi trabajo.

Al **CONACYT**, al **Instituto Tecnológico de Veracruz** y al **CIRAD**, por el apoyo concerniente a la tesis co-tutelar, los aspectos: académicos y económico recibido durante el desarrollo de este proyecto.

RESUMEN

M.C. Champion Martínez, Elena Isabel. Doctorado en Ciencias en Alimentos. Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos. Instituto Tecnológico de Veracruz. 13 de febrero de 2017. **Estudio de la dinámica de microorganismos (bacterias, levaduras y hongos filamentosos) que influyen en la contaminación del grano de cacao (*Theobroma cacao* L.) con Ocratoxina A (OTA).** Asesores: Dra. Mirna L. Suárez Quiroz, Dr. Oscar González Ríos, Dr. Noël Durand.

La OTA es una micotoxina producida por los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*, la cual ha sido clasificada por la Agencia Internacional de Investigación para el Cáncer (IARC) como posible carcinógeno en humanos. La presencia de OTA y las especies de hongos que la producen, han sido asociadas a los tratamientos de cosecha y post-cosecha del cacao. Actualmente no existen reportes sobre las poblaciones microbianas presentes durante el beneficio de cacao en México y su interacción con la flora fúngica, por lo que el objetivo de este trabajo fue estudiar la dinámica de bacterias y levaduras y determinar su influencia sobre la presencia de hongos toxigénicos y la contaminación por OTA.

Se obtuvieron muestras de mazorca y de grano de cacao durante el proceso de dos haciendas productoras (A y B) en 2013 y 2014. Se obtuvo el % total de infección por hongos, estos fueron aislados y caracterizados por biología molecular y su capacidad de producir OTA fue evaluada. Se realizó la extracción y la amplificación de ADN de las muestras de cacao por PCR, y se obtuvo el perfil DGGE de hongos.

Se identificaron 59 cepas de hongos, de las cuales *A. carbonarius*, *Penicillium* sp., *P. lividum*, *P. sizovae* y *A. steyni*, resultaron altamente productoras de OTA (5141.05-14307.5 µg/kg). El cacao almacenado por 30 días presentó 304.6 µg de OTA/kg acorde con la presencia de especies aisladas en esta etapa. Se mostró que lavar el grano al final de la fermentación en la hacienda B eliminó parcialmente la pulpa pegada al grano (sustrato disponible), disminuyendo la presencia de especies altamente ocratoxigénicas y el riesgo de contaminación por OTA en etapas posteriores. Los perfiles DGGE mostraron un mayor número de especies presentes

en el proceso de la hacienda B. La calidad de la materia prima, la etapa final de la fermentación y el almacenamiento fueron puntos críticos en la contaminación por hongos toxigénicos y producción de OTA.

Este estudio permitió identificar los peligros y los puntos críticos de contaminación por OTA, precursores para la implementación de un sistema de Análisis de Riesgos y Puntos críticos de control (HACCP), para minimizar la contaminación en la cadena de producción de cacao.

ABSTRACT

M.C. Champion Martínez, Elena Isabel. Doctorate in Food Science. Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos. Instituto Tecnológico de Veracruz. 13 February 2017. **Estudy of the dynamics of microorganisms (bacteria, yeast and filamentous fungi) that influence the contamination of the cocoa bean (*Theobroma cacao* L.) with Ochratoxin A (OTA).** Advisors: Dra. Mirna L. Suárez Quiroz, Dr. Oscar González Ríos, Dr. Noël Durand.

The OTA is a mycotoxin produced by *Aspergillus* and *Penicillium* genus, which has been classified within the group 2B as a possible carcinogen in humans by the International Agency for Research on Cancer (IARC). The occurrence of ochratoxin A (OTA) and OTA-producing fungi in cocoa beans has been linked to harvest and post-harvest treatment conditions. Currently, there are not reports on the microbial populations present during the cocoa benefit in Mexico and their interaction with fungal flora. The aim of this study was to study the dynamics of bacteria and yeast and determine their influence over the OTA-producing fungi presence and OTA contamination.

Pod and cacao bean samples were obtained during the process of two producing farms (A and B) in 2013 and 2014. The total percentage of fungal infection was obtained, fungi were isolated and characterized by molecular biology and their ability to produce OTA was evaluated. DNA extraction and amplification of the cocoa samples were performed by PCR, DGGE profile of fungi was obtained.

A total of 59 fungal strains were identified, of which *A. carbonarius*, *Penicillium* sp., *P. lividum*, *P. sizovae* and *A. steyni*, were highly OTA producing (5141.05-14307.5 µg / kg). Cacao stored for 30 days presented 304.6 µg of OTA / kg according to the presence of species isolated in this stage. It was shown that washing the beans at the end of fermentation at farm B partially eliminated grain pulp (available substrate), reducing the presence of highly ochratoxigenic species and then the risk of contamination by OTA in later stages. DGGE profiles showed a higher number of

species present in the farm B process. The quality of the raw material, the final stage of fermentation and storage were critical points in the contamination by toxigenic fungi and OTA production.

This study identified the hazards and critical points of OTA contamination, precursors for the implementation of a Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP) system, to minimize contamination in the cocoa production chain.

CONTENIDO

| | |
|--|----|
| RESUMEN | 1 |
| ABSTRACT | 3 |
| 1. INTRODUCCIÓN | 13 |
| 2. ANTECEDENTES..... | 15 |
| 2.1 El cacao | 15 |
| 2.2 Producción mundial de cacao..... | 16 |
| 2.3 Cacao en México | 16 |
| 2.4 Cultivo..... | 19 |
| 2.5 Cosecha | 20 |
| 2.6 Tratamientos post-cosecha | 20 |
| 2.6.1 Almacenamiento de mazorcas | 21 |
| 2.6.2 Quiebre | 22 |
| 2.6.3 Fermentación | 22 |
| 2.6.3.1 Efectos del tiempo de fermentación | 25 |
| 2.6.3.2 Aireación de la fermentación | 26 |
| 2.6.4 Secado | 27 |
| 2.6.5 Almacenamiento..... | 28 |
| 2.7 Composición química del grano de cacao | 28 |
| 2.8 Composición química de la pulpa de cacao | 29 |
| 2.9 Micotoxinas | 30 |
| 2.9.1 Micotoxicosis..... | 30 |

| | |
|--|----|
| 2.9.2 Impacto en la salud | 31 |
| 2.9.3 Mecanismo de síntesis | 32 |
| 2.9.4. Factores que regulan el mecanismo de síntesis. | 33 |
| 2.9.4.1 Factores extrínsecos | 34 |
| 2.9.4.2 Factores intrínsecos | 37 |
| 2.10 Ocratoxina A..... | 37 |
| 2.10.2 Propiedades Físicoquímicas..... | 39 |
| 2.10.3 Toxicología..... | 40 |
| 2.10.4 Biosíntesis | 40 |
| 2.10.5 Genes involucrados en la biosíntesis de OTA..... | 42 |
| 2.10.6 Condiciones de producción de OTA..... | 42 |
| 2.10.7 Consumo y límites de OTA..... | 43 |
| 2.11 Presencia de ocratoxina A en cacao..... | 44 |
| 2.12 Hongos productores de OTA en cacao..... | 45 |
| 2.13 Estudio de la ecología microbiana de cacao..... | 47 |
| 2.14.1 Aplicaciones | 49 |
| 2.14.2 Limitantes de la técnica..... | 52 |
| 2.15 Detección de especies fúngicas por PCR | 53 |
| 3. JUSTIFICACIÓN..... | 57 |
| 4. HIPÓTESIS..... | 58 |
| 5. OBJETIVOS..... | 59 |
| 5.1 Objetivo general..... | 59 |
| 5.2 Objetivos específicos | 59 |
| 6. MATERIALES Y MÉTODOS | 60 |
| 6.1 Materiales | 61 |

| | |
|--|----|
| 6.1.1 Material biológico..... | 61 |
| 6.1.3 Equipo de biología molecular | 62 |
| 6.2 MÉTODOS..... | 63 |
| 6.2.1 Condiciones de cultivo y tratamientos post-cosecha aplicados en la Finca A..... | 63 |
| 6.2.2 Condiciones de cultivo y tratamientos post-cosecha aplicados en la inca B | 66 |
| 6.2.3 Muestreo | 70 |
| 6.2.5 Aislamiento, numeración y conservación de poblaciones microbianas | 72 |
| 6.2.6 Extracción y purificación de ocratoxina A en grano de cacao | 73 |
| 6.2.8 Análisis de ocratoxina A por HPLC: Condiciones de operación..... | 75 |
| 6.2.9 Biología Molecular..... | 75 |
| 6.2.9.1 Acondicionamiento de las muestras para extracción de ADN | 75 |
| 6.2.9.2 Extracción de ADN de bacterias | 75 |
| 6.2.9.3 Extracción de ADN de hongos y levaduras..... | 77 |
| 6.2.9.4 Verificación de ADN en gel de agarosa..... | 77 |
| 6.2.9.5 Verificación por espectrofotómetro UV-Visible | 78 |
| 6.2.9.6 Amplificación por PCR | 78 |
| 6.2.9.7 Mezcla de reactivos para PCR..... | 80 |
| 6.2.9.8 Condiciones de PCR | 80 |
| 6.2.10 Electroforesis en Gel de Acrilamida con Gradiente Desnaturalizante (DGGE) | 83 |
| 6.2.10.1 Composición del gel DGGE | 83 |
| 6.2.10.2 Preparación del gel DGGE | 84 |
| 6.2.10.3 Condiciones de electroforesis de la DGGE | 86 |
| 6.2.10.4 Tratamiento estadístico de la imagen y perfiles DGGE | 87 |
| 6.2.10.5 Secuenciación de fragmentos de ADN a partir de bandas DGGE | 88 |
| 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 89 |

| | |
|--|-----|
| 7.1 Dinámica de poblaciones microbianas y su efecto sobre la producción de ocratoxina A en granos de cacao. | 89 |
| 7.2 Estudio de la dinámica microbiana en mazorca y grano de cacao | 89 |
| 7.2.1 Dinámica microbiana en el proceso de cacao de la finca A | 89 |
| 7.2.2 Dinámica microbiana en el proceso de cacao de la finca B | 92 |
| 7.2.3 Efecto del periodo de cosecha y de las prácticas post-cosecha sobre las poblaciones microbianas..... | 95 |
| 7.3 Incidencia de hongos filamentosos y ocratoxigénicos sobre mazorcas y grano de cacao..... | 98 |
| 7.4 Caracterización molecular de hongos toxigénicos y su habilidad productora de OTA.102 | |
| 7.5 OTA en grano de cacao y hongos asociados a su producción. | 108 |
| 7.6 Estudio de las Dinámicas microbianas por DGGE. | 112 |
| 7.7 Análisis de similitud en perfiles DGGE | 117 |
| 8. CONCLUSIONES | 121 |
| 9. RECOMENDACIONES | 122 |
| 10. BIBLIOGRAFÍA | 123 |

LISTA DE TABLAS

| | |
|---|-----|
| Tabla 1. Producción de cacao en México 2015..... | 17 |
| TABLA 2. Plan de muestreo en Fincas A y B | 71 |
| TABLA 3. Secuencia de primers utilizados para PCR-DGGE para análisis de ADN de bacterias, levaduras y hongos..... | 79 |
| TABLA 4. Secuencia de primers utilizados en PCR para cepas puras de hongos..... | 80 |
| TABLA 5. Mezcla de reactivos y programa para PCR de bacterias..... | 81 |
| TABLA 6. Mezcla de reactivos y programa para PCR de levadura..... | 82 |
| TABLA 7. Mezcla de reactivos y programa para PCR de hongos. | 83 |
| TABLA 8. Composición de gel para DGGE con gradiente desnaturalizante de 30% a 60% .. | 84 |
| TABLA 9. Composición de gel para DGGE con gradiente desnaturalizante de 40 a 70%..... | 84 |
| TABLA 10 . Infección por hongos filamentosos y ocratoxigénicos en mazorca y granos de cacao en diferentes etapas del proceso de la cosecha en las fincas A y B en 2013..... | 98 |
| TABLA 11. Infección por hongos filamentosos y ocratoxigénicos en mazorca y granos de cacao en diferentes etapas del proceso de las cosechas en las fincas A y B en 2014. | 100 |
| TABLA 12. Caracterización molecular de cepas puras de hongos presumibles toxigénicos y su capacidad productora de OTA en MEA (2013)..... | 104 |
| TABLA 13. Caracterización molecular de cepas puras de hongos presumibles toxigénicos y su capacidad productora de OTA en MEA (2014)..... | 106 |
| TABLA 14. Contenido de OTA en granos de cacao y hongos productores de OTA asociados a etapas post-cosecha en 2013 | 110 |
| TABLA 15. Contenido de OTA en granos de cacao y hongos productores de OTA asociados a etapas post-cosecha en 2014. | 111 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|-----|
| FIGURA 1. Actividad microbiana durante la fermentación de granos de cacao..... | 24 |
| FIGURA 2. Red metabólica simplificada (Le-bars, 1988) | 33 |
| FIGURA 3. Estructura molecular de Ocratoxina A..... | 39 |
| FIGURA 4. Diagrama de metodología general..... | 60 |
| FIGURA 5. Cultivo Finca A..... | 63 |
| FIGURA 6. Fermentación Finca A..... | 64 |
| FIGURA 7. Secado Finca A..... | 65 |
| FIGURA 8. Almacenamiento de granos de cacao Finca A..... | 66 |
| FIGURA 9. Cultivo de cacao Finca B..... | 67 |
| FIGURA 10. Grano de cacao natural transportado por pequeños productores | 67 |
| FIGURA 11. Fermentación en caja Finca B..... | 68 |
| FIGURA 12. Secado al sol en Finca B..... | 69 |
| FIGURA 13. Mezcla de granos de cacao de diferentes tratamientos | 70 |
| FIGURA 14. Condiciones de preparación de DGGE..... | 85 |
| FIGURA 15. Cuba de electroforesis para DGGE | 86 |
| FIGURA 16. Dinámica de Levaduras (LEV), Bacterias lácticas (BAL) y Acetobacterias (BAA) durante el proceso de transformación de cacao en Finca A, cosechas 2013 y 2014. | 94 |
| FIGURA 17. Dinámica de levaduras (LEV), Bacterias Lácticas (BAL) y Acetobacterias (BAA) en Finca B durante 2013 y 2014. | 95 |
| FIGURA 18. Infección por hongos en Finca A..... | 101 |
| FIGURA 19. Infección por hongos en Finca B..... | 102 |
| FIGURA 20. DGGE que muestra la evolución de la ecología de hongos durante el proceso de cacao en la finca A durante Enero 2014. | 114 |
| FIGURA 21. DGGE que muestra la evolución de la ecología fúngica durante el proceso de cacao en la finca A en Junio 2014. | 115 |
| FIGURA 22. DGGE que muestra la evolución de la ecología fúngica durante el proceso de cacao en la Finca B durante Enero 2014.. | 116 |

| | |
|---|-----|
| FIGURA 23. DGGE que muestra la evolución de la ecología fúngica durante el proceso de cacao en la Finca B durante Junio 2014..... | 117 |
| FIGURA 24. Análisis de perfiles DGGE, bacterias Finca A y B | 117 |
| FIGURA 25. Análisis de bandas de perfiles DGGE para levaduras..... | 119 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|--------------|--|
| ADN | Acido desoxirribonucleico |
| Aw | Actividad de agua |
| BLAST | Basic Local Alignment SearchTool |
| DG18 | Dicloran Glicerol 18 |
| DGGE | Denaturing Gradient Gel Electrophoresis |
| EFSA | Autoridad en seguridad alimenticia |
| g | Gramo |
| HPLC | Cromatografía líquida de alta resolución |
| HACCP | Análisis de peligros y puntos de control críticos |
| IARC | International Agency for Research on Cancer |
| IGS | Intergenic Spacer Region |
| ITS | Internal Transcribed Spacer |
| JEFCA | Join FAO/WHO Expert Committe on Food Additives |
| kg | Kilogramo |
| L | Litro |
| MEA | Malt extract Agar |
| MAA | Medio ácido acético |
| MRS | Man Rogosa Sharpe |
| min | Minuto |
| ml | Mililitros |
| ng | Nanogramo |
| nm | Nanómetro |
| OMS | Organización mundial de la salud |
| OTA | Ocratoxina A |
| OTB | Ocratoxina B |
| PBS | Solucion tampón salina de fosfato |
| PCR | Polymerase chain reaction |
| pH | Potencial hidrogeno |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| SCF | Comité Científico para los Alimentos de la Comisión Europea |
| SCOOP | Grupo de Cooperación Científica |
| V | Volumen |
| UV | Ultravioleta |
| YES | Yeast Extract Supplemented |

1. INTRODUCCIÓN

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

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

La OTA es un metabolito secundario tóxico, producido por varias especies de hongos filamentosos de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*. La OTA posee propiedades nefrotóxicas, inmunotóxicas, teratogénicas y carcinogénicas que la hacen perjudicial para humanos y animales (Höhler, 1998).

En zonas tropicales la OTA es producida generalmente por *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus niger* y *Aspergillus ochraceus*, siendo *A. carbonarius* el principal productor de OTA con un alto nivel de incidencia. Esta micotoxina se encuentra presente en diversos productos alimenticios alrededor del mundo tales como: cereales, café, cerveza, jugo de uva, frutos secos y vino; así como cacao, nueces y especias (Pitt, 2000).

En 2012 Copetti *et al.*, estudiaron grano de cacao comercial de Brasil y reportaron a *A. carbonarius* como el principal productor de OTA, encontrando contenidos de OTA

entre 1.7-5.54 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a lo largo de la cadena de producción, siendo las etapas de secado y almacenamiento las más críticas.

Por otro lado Dongo, *et al.*, en el 2008, reportaron que el 91.5% del grano de cacao de Nigeria contenía entre 40 y 277 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Amezqueta *et al.*, reportaron en el 2004 que el 63% de grano de cacao comercial de diversos orígenes de África presentaba contenidos de OTA entre 0.03 y 14.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$. En todos los casos, los autores coinciden en que se debe poner especial atención a los procesos de cosecha y post-cosecha del cacao.

En 2013 Durand *et al.*, estudiaron la dinámica de levaduras y hongos con PCR-DGGE durante las etapas post-cosecha de café. Ellos encontraron que ambas dinámicas fueron similares, pero su evolución antes y después del secado eran diferentes, atribuyendo esto último a la disponibilidad de agua (A_w) en el sustrato. También coinciden con Gil-Serna *et al.*, 2011, quienes afirman que las levaduras influyen en el crecimiento y la esporulación de hongos ocratoxigénicos, lo que muestra un impacto en la producción de OTA, como es el caso de *Aspergillus westerdijkiae* el cual es reducido a nivel transcripcional por la presencia de *Debaryomyces hansenii*.

Debido a los problemas de salud que se le atribuyen a la OTA, se vuelve necesario estudiar las dinámicas de hongos ocratoxigénicos y microorganismos presentes en el grano de cacao durante la manipulación post-cosecha con la finalidad de observar la actividad competitiva dentro de la flora microbiana y su efecto sobre la producción de OTA.

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

2. ANTECEDENTES

2.1 El cacao

Se conoce como cacao a las semillas contenidas en el fruto de un árbol cacaotero, cuyo nombre científico es *Theobroma cacao* L. Es una planta de hoja perenne, que pertenece al orden *Malvaceae* y a la familia *sterculiaceae*.

Los granos de cacao son las semillas obtenidas de la mazorca, los cuales están compuestos de 3 partes, la testa (cubierta de la semilla), el embrión y el cotiledón (Afoakwa, 2010; Thompson *et al.*, 2001). Adherido a la testa se encuentra una pulpa blanca mucilaginosa, la cual se forma durante el desarrollo de la mazorca del meristemo del endocarpio (Biehl *et Ziegleder*, 2003). La pulpa de cacao es rica en azúcares fermentables, tales como fructosa, sacarosa y con un pH bajo (3.0–3.5), debido principalmente a la presencia de ácido cítrico (Guehi *et al.*, 2010), esta pulpa también es conocida como mucílago. Estas características hacen del mucílago un medio propicio para el crecimiento microbiano (Lefeber *et al.*, 2010). Proteínas, aminoácidos libres, vitaminas y minerales también se encuentran presentes. Los contenidos de sacarosa, glucosa y fructosa varían de acuerdo a la edad de la mazorca (Lefeber *et al.*, 2010).

En los 90s, el mercado internacional del cacao sufrió una crisis financiera a causa del hongo *Moniliophthora perniciosa* (*Crinipellis perniciosa*), causando un decremento en la producción y exportación del grano de cacao (Freire *et al.*, 1999, Schwan y Wheals, 2004). En la búsqueda por aumentar el rendimiento del cacao y su resistencia a enfermedades, se impulsó el desarrollo de híbridos. Estos cruces entre especies, afectaron algunas características tanto en mazorcas como en semillas, tales como, tamaño, color, cantidad y peso de semillas, cantidad de pulpa, sabor y composición química (Camu *et al.*, 2008; Noor-Soffalina *et al.*, 2009). Considerando la amplia variabilidad en contenido y composición de pulpa, así como la composición del cotiledón, no es sorpresa que diferentes híbridos presenten diferentes dinámicas y requerimientos de fermentación (Moreira *et al.*, 2013).

2.2 Producción mundial de cacao

El grano de cacao (*Theobroma cacao* L.) es un producto importante con gran demanda internacional, dado que es un ingrediente importante en el desarrollo de un gran número de productos alimenticios (Tafari *et al.*, 2004). Alrededor de un 70% de la producción mundial de cacao proviene de la región ecuatorial del este de África. Y el resto de las regiones ecuatoriales del centro y sur de América, algunas islas del Caribe y áreas tropicales de Asia. El principal país productor de cacao de acuerdo a la FAO, corresponde a Costa de Marfil y Ghana, con una pequeña participación de países asiáticos, América latina y el Caribe (FAO/WHO, 2012).

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

Numerosas empresas realizan la transformación de granos de cacao hasta chocolate. Tales como ADM, Barry Callebaut, Cargill, Hamester y Blommer, las cuales absorben el 50% de la producción mundial, y quienes transforman el cacao en masa, manteca de cacao y polvo. Pero las más importantes empresas chocolateras son Nestlé, Hershey, Cadbury, Mars et Philip Morris, las cuales transforman en chocolate, los productos intermedios que generaron las otras empresas. (Gonzalez y Amaya, 2005)

Estas empresas regularmente se instalan en los países productores para asegurar su aprovisionamiento. Esto genera diversas fuentes de empleo que redundan en la economía del país.

2.3 Cacao en México

México ocupa el onceavo lugar en producción a nivel mundial, participando con menos del 2% de la producción mundial. En México se producen entre 20 000 y 30 000 ton de cacao anualmente, esto representa una entrada de cerca de \$ 64 606 USD (SIAP/SAGARPA, 2014). Solo 2% de esta producción es destinada al mercado

internacional, principalmente como pasta de cacao. En México 75% de los cultivos se concentran en el estado de Tabasco con 40 782 ha. El cacao trinitario es el principal cultivo, resultado de una hibridación natural de semillas criollo y forastero (Gonzalez y Amaya, 2005). Aunque algunas superficies son exclusivamente para el cultivo de **cacao grano blanco Criollo (Carmelo 1)**, el cual ha sido premiado en los **premios** Internacionales de Cacao en 2011 en la categoría de Frutos frescos en la región central de América y el Caribe (ICA, 2011). Esto representa una oportunidad para la exportación de este cacao a Europa en términos de calidad y no cantidad.

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

Tabla 1. Producción de cacao en México 2015

| Entidad | Superficie sembrada (Ha) | Superficie cosechada (Ha) | Producción (Ton) | Rendimiento (Ton/Ha) |
|-----------------|--------------------------|---------------------------|------------------|----------------------|
| Tabasco | 40,867 | 40,704 | 18,301 | 0.450 |
| Chiapas | 20,150 | 18,169 | 9,439 | 0.520 |
| Guerrero | 243 | 237 | 226 | 0.952 |
| Total | 61,260 | 59,110 | 27,966 | 1.922 |

(SIAP-SAGARPA, 2015)

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

El cacao en México se cultiva actualmente por cerca de 37,000 productores en los estados de Tabasco, Chiapas, Guerrero y ocasionalmente Oaxaca.

La industria en México se forma por 213 empresas, pero sólo ocho de éstas dominan lo que se conoce como mercado de volumen o gran mercado: Nestlé y Pepsico en conjunto manejan el 59% del cacao nacional (Gonzalez y Amaya, 2005).

La mayoría de estas empresas pertenecen a la Asociación Nacional de Fabricantes de Chocolate, Dulces y Similares, en conjunto procesan 67 mil 231 toneladas de cacao anualmente, sin embargo, dominan tres por tener una capacidad de molienda de 12 mil toneladas anuales (el 62.47%), éstas son: INCATABSA, Nestlé y AMSA.

Estas presentan diferencias de acuerdo al mercado que manejan, nacional, regional o local, la capacidad administrativa, el grado de especialización o diversificación (chocolates de amplio consumo o especiales: cocoas, coberturas, orgánicos, etc.), también influyen las mezclas de cacao que utilizan (fermentado y/o lavado) y los eslabones que ocupan dentro de la cadena de comercio, ya sean sólo industriales, productores industriales, o productores-industriales-distribuidores (Colegio de Post-graduados, 2009)

La falta de capital, créditos, capacitación y tecnología, se refleja en una baja competitividad.

En resumen, la producción del cacao en México se ha visto afectada negativamente debido a diversos factores, tales como: el abandono de las plantaciones por el bajo precio del producto, el envejecimiento de los árboles, la ausencia de control de plagas y la falta de capacitación en las técnicas de cultivo.

Al igual que otros cultivos, el cacao es susceptible al ataque de hongos en el campo o durante el almacenamiento. Estos hongos pueden producir como metabolitos secundarios un grupo diverso de sustancias químicas conocidas como micotoxinas. Varias micotoxinas son potentes carcinógenos de los animales y han sido clasificadas como carcinógenos humanos o posibles (potenciales y posibles) carcinógenos humanos. (IARC, 1993) Es por lo anterior que es muy importante conocer su formación y especies que las producen durante el procesamiento de productos susceptibles al ataque de hongos como lo es el cacao.

2.4 Cultivo

Existen 3 subespecies de cacao; Criollo, Forastero y Trinitario, estas han sido establecidas basadas en su morfología y su origen (Cheesman, 1944).

Criollo: Es cultivado principalmente en América central y Sudamérica. En México, el estado de Tabasco, produce el clon Carmelo C1.

Forastero: Proviene de la región Amazona, incluye 2 subgrupos; Amelonado y Amazon.

Trinitario: Es un cultivo híbrido originado de la mezcla entre criollo y Forastero.

La hibridación puede presentarse en los cultivos, así como una diversidad genética debido a variedades localmente adaptadas (Sounigo *et al.*, 2005). Estudios recientes, mostraron que una identificación errónea de cultivos puede presentarse en un 15 - 44 % de los casos (Motamayor *et al.*, 2008). Diferentes cultivos de cacao presentan calidades diferentes, las cuales se reflejan en las características del producto final (Saltini *et al.*, 2013).

Particularmente el cacao criollo presenta altos niveles de procianidinas, las cuales son la principal clase de polifenoles en cacao. Las procianidinas contribuyen a la astringencia y amargor del chocolate independientemente de su origen. Estos contenidos no dependen de las prácticas post-cosecha sino de la naturaleza genética del cultivo (Counet *et al.*, 2004).

Por otro lado los arbustos de cacao forastero son muy productivos y son considerados moderadamente resistentes a pestes y enfermedades (Lima *et al.*, 2011). En comparación con el cacao criollo, el cacao Forastero tiene menor contenido de procianidinas, aunque una misma cantidad de pirazinas (Counet *et al.*, 2004).

Estas diferencias químicas se ven reflejadas en las características sensoriales del producto final. El chocolate obtenido de grano Forastero es menos amargo, menos astringente y menos ácido que el obtenido de granos Criollo o Trinitario (Clapperton *et al.*, 1994; de Muijnck, 2005; Sukha *et al.*, 2008).

2.5 Cosecha

En México, la cosecha se realiza dos veces al año, la principal es de enero a abril y la segunda, de junio a septiembre.

Las mazorcas se cosechan cuando alcanzan su estado de madurez. Una cosecha tardía representa un riesgo de contaminación y/o germinación de granos. Por el contrario, una cosecha temprana disminuye el rendimiento, se obtienen granos inmaduros y mezclar granos con diferentes estados de madurez, le otorgan a la cosecha un sabor desagradable, lo cual reduce su valor en el mercado.

La madurez de una mazorca se observa en el color de la cascara, las mazorcas jóvenes son verdes o rojas, y al alcanzar el estado de madurez el color cambia a amarillo o naranja, según la variedad de la que se trate. Un fruto maduro presenta también una superficie rugosa y ligeramente agrietada.

Se debe evitar la recolección de mazorcas sobre maduras, ya que las almendras no presentan un óptimo de azúcares para iniciar la fermentación. Además, esta sobre madurez puede venir acompañada por otros defectos como enfermedades y daños de roedores y/o insectos. Desde el punto de vista del productor, conseguir un estado ideal de madurez trae algunas complicaciones, especialmente para los pequeños productores, por lo que es común que algunas de estas mazorcas y su contenido formen parte de la masa de fermentación.

Por otro lado, la cosecha es una operación manual que requiere una mano de obra capacitada. Esta actividad es realizada principalmente por mujeres y/o niños. Las mazorcas se cortan del árbol de manera perpendicular con un cuchillo o machete, con cuidado de no dañarla. Una vez cosechados los granos no deben almacenarse más de 3 o 4 días, puesto que pueden sufrir daños que afectaran los granos contenidos en ellas.

2.6 Tratamientos post-cosecha

La cadena productiva del cacao es compleja e involucra a varios factores. Inicia en el campo, en las plantaciones donde se desarrollan los cacaoteros y las mazorcas son

cosechadas, atravesando diversas etapas post-cosecha tales como, quiebre, fermentación, secado, y almacenamiento.

Generalmente los granos de cacao que se someten a estos tratamientos, provienen de diversas plantaciones o fincas productoras, por lo que varias de las características del producto final dependerán de este proceso.

Diferentes estudios han mostrado diferencias entre las practicas post-cosecha entre países y en algunos casos, entre fincas del mismo país (Magan & Aldred, 2007). La mayor parte del cacao producido a nivel mundial, proviene de fincas de pequeños productores.

Las formas de procesamiento de cacao en las fincas afecta las características del grano de cacao, por lo que es posible que los lotes de cacao que reciben las industrias productoras de chocolate presenten cierta heterogeneidad debido a las diferentes prácticas post-cosecha utilizadas en cada finca. Esto se traduce en una pérdida total de trazabilidad, ya que no es posible llevar a cabo un análisis preciso de identificación de cultivos (Saltini *et al.*, 2013).

Por lo anteriormente descrito, se hace necesario no solo generar información acerca del proceso post-cosecha de cacao, sino también compartir esta información con los productores y establecer sistemas de trazabilidad. Además de involucrar a todos los participantes de la industria del cacao en la elaboración de estándares de calidad e inocuidad.

A continuación, se describen brevemente las etapas post-cosecha del cacao y el impacto sobre sus características físicas, químicas y sensoriales.

2.6.1 Almacenamiento de mazorcas

Se recomienda almacenar las mazorcas difíciles de fermentar para obtener chocolate con un fuerte sabor ácido. El almacenamiento de mazorcas después de la cosecha puede reducir los contenidos de sacarosa, glucosa, fructosa, etanol y ácido acético, e incrementar el pH en granos de cacao fermentado, mejorando el sabor final del chocolate. Por esta razón, el almacenamiento puede ser benéfico para los

granos que tienden a desarrollar bajos pH y sabores ácidos, como es el caso del cacao criollo (Meyer *et al.*, 1989; Tomlins *et al.*, 1993).

Sin embargo, el almacenamiento no siempre refleja beneficios. La cantidad de granos infectados por hongos incrementa con el almacenamiento de las mazorcas, y por lo tanto también la merma de cacao. (Meyer *et al.*, 1989; Ortiz de Bertorelli y Graziani de Fariñas, 2009; Tomlins *et al.*, 1993).

En resumen, el almacenamiento de mazorcas previo al corte puede ser útil pero solo cuando se puede alcanzar un beneficio sensorial controlado y sin comprometer la inocuidad del grano.

2.6.2 Quiebre

El quiebre puede realizarse entre los cacaoteros o en un lugar específico de la finca. Las mazorcas cosechadas son abiertas por la mitad, con el golpe de un machete en forma perpendicular sin dañar los granos contenidos en el centro. Una vez abiertas, los granos son extraídos manualmente y los restos son desechados. Inmediatamente después del quiebre, los granos se depositan en cajas de madera o se cubren con hojas de plátano en el suelo, para dar inicio a la fermentación. (Doyle *et al.*, 2001; Lopez y Dimick, 1995)

2.6.3 Fermentación

En términos generales el principal objetivo de la fermentación es eliminar la pulpa que cubre al grano, generar los precursores de aromas que le confieren al grano de cacao el característico sabor a chocolate y la muerte del embrión para evitar la germinación. (Vincent, 2002).

El método de fermentación está relacionado al país productor y puede ser realizado en montones (Ghana y Costa de marfil), cajas (Brasil y Malasia), canastas (Nigeria y Ghana), bandejas (Ghana), sacos (Ecuador) y plataformas de fermentación (Ecuador) (Schwan y Wheals, 2004a)

El método en cajas de madera es el método más utilizado en México. Este método es recomendable sí se cuenta con grandes cantidades de cacao. Las cajas son

construidas de madera, con dimensiones de 90 x 120 cm. El fondo de la caja debe estar perforado para permitir el escurrimiento del mucílago y la ventilación. El sistema de cajas debe estar separado del piso aproximadamente a una distancia de entre 15 a 20 cm. Este tipo de cajas permite procesar hasta 800 kg de cacao fresco. Una vez depositado el grano de cacao a fermentar se deja reposar las primeras 24 horas y posteriormente se remueve cada 24 horas con la finalidad de airear la masa de fermentación y lograr una fermentación uniforme (García, 1994).

En general los granos de cacao fermentados en caja muestran bajas concentraciones de azúcares, etanol y ácido acético, además un pH alto. Al inicio de la fermentación la temperatura aumenta lentamente. En algunos casos el método de caja ha sido considerado como un método con baja uniformidad, ya que no hay un consumo total de los azúcares disponibles (Guehi *et al.*, 2010; Tomlins *et al.*, 1993). También se ha reportado que el tamaño, la forma y el material de construcción de la caja tiene un efecto significativo en el pH, presencia de taninos, contenido de azúcar y presencia de granos púrpura (Guehi *et al.*, 2010; Portillo *et al.*, 2007). La presencia de granos púrpura son característicos de una fermentación incompleta. Mientras que los granos marrón indican que la fermentación se ha completado (Guehi *et al.*, 2010).

Cuando la fermentación se realiza en pilas la temperatura incrementa rápidamente al inicio del proceso, caso contrario del proceso en caja. Además la fermentación es más uniforme y la presencia de granos púrpura disminuye, mientras que la de granos marrón aumenta (Tomlins *et al.*, 1993). Aunque hay reportes de varios autores que no encontraron diferencias entre el método de caja y el de pilas (Carr *et al.*, 1979).

Schwan y Wheals, (2004a) estudiaron la microflora presente en la fermentación de granos de cacao y su impacto en la calidad del chocolate, sugiriendo que la fermentación del cacao involucra una sucesión microbiana.

El pH bajo de la pulpa a causa del ácido cítrico y los bajos niveles de oxígeno favorecen la colonización de levaduras. La proliferación de levaduras a su vez da

lugar a la producción de etanol, y una actividad pectinolítica, por la presencia de enzimas pectinolíticas. Por lo tanto, la población de levaduras aumenta considerablemente dentro de las primeras 24 horas (fase 1), después de las cuales se observa un ligero decremento. Estas condiciones favorecen el crecimiento de bacterias ácido lácticas (BAL), las cuales alcanzan un máximo crecimiento alrededor de las 36 h de fermentación (fase 2). La principal actividad de las BAL es degradar la glucosa a ácido láctico. El incremento de pH es debido al metabolismo de los productos no ácidos.

Después de 48 horas de fermentación la población de BAL decrece, dando espacio al crecimiento de bacterias ácido acéticas (BAA). Las reacciones exotérmicas de BAA al oxidar el etanol a ácido acético incrementan la temperatura arriba de 50°C (fase 3) y por otro lado el CO₂ se oxida y se produce agua.

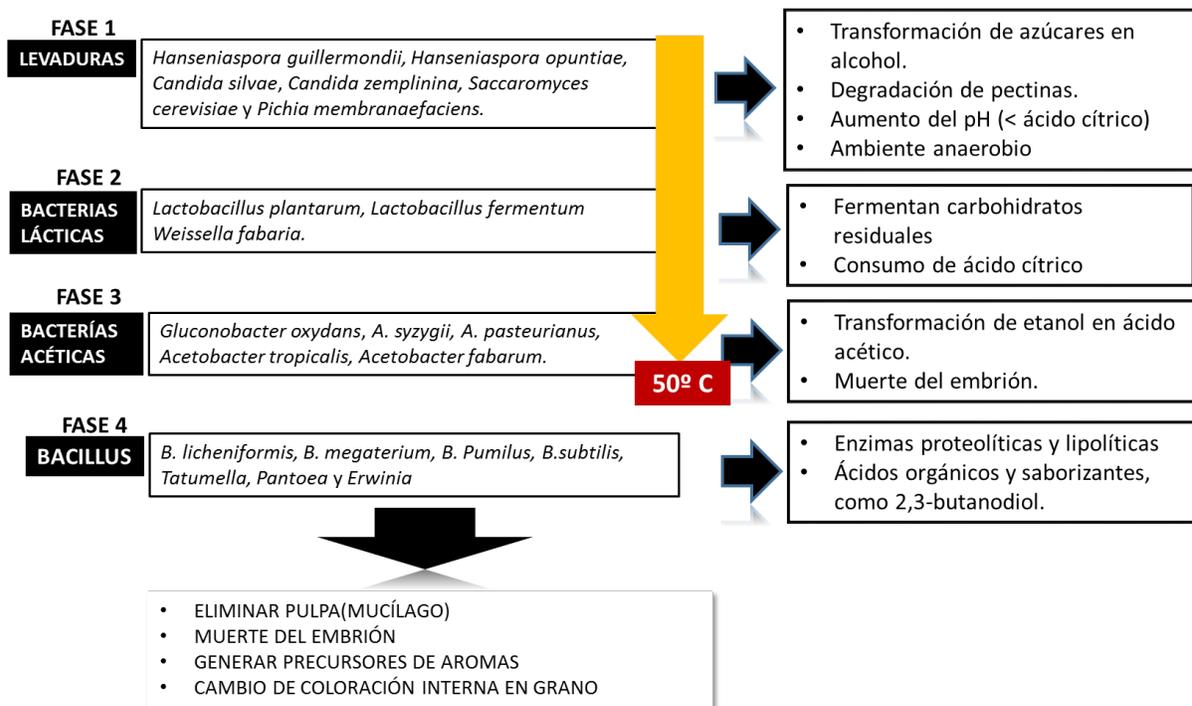


FIGURA 1. Actividad microbiana durante la fermentación de granos de cacao

(Ardhana y Fleet, 2003; Cleenwerck *et al.*, 2008; Daniel *et al.*, 2009; De Bruyne *et al.*, 2010; Garcia-Armisen *et al.*, 2010; Nielsen *et al.*, 2005).

En este estudio se sugiere que las condiciones bioquímicas en el grano en combinación con una alta temperatura, son la causa de la difusión e hidrólisis de proteínas. Por lo que se considera que las BAA juegan un rol importante en la formación de los precursores de sabor. Las BAA son aeróbicas obligatorias, por lo que al incrementar la aeración durante la fermentación su actividad aumenta.

Después de 5 o 6 días de fermentación, la población de BAA decrece y dan lugar a bacterias aerobias formadoras de esporas (fase 4). Estas producen una variedad de compuestos químicos durante el proceso fermentativo, que puede contribuir a la pérdida del sabor, por lo que no son del todo deseables (Lima *et al.*, 2011; Schwan y Wheals, 2004a; Sengun y Karabiyikli, 2011).

2.6.3.1 Efectos del tiempo de fermentación

El tiempo que dura la fermentación es determinante para los cambios bioquímicos que suceden en diferentes puntos de esta etapa y sus efectos sobre las condiciones del medio y en consecuencia, sobre la síntesis de diversos compuestos relacionados con la calidad final del producto.

Los aminoácidos son precursores de la síntesis de compuestos que posteriormente le conferirán el sabor característico al chocolate durante su producción (de Brito *et al.*, 2001). La leucina, alanina, fenilalanina y tirosina son los principales aminoácidos producidos alcanzando sus máximos de producción a los 4 días, después de los cuales, su concentración se mantiene constante (Kirchhoff *et al.*, 1989).

La sacarosa es consumida en los primeros días de fermentación, los azúcares reductores decrece un 90% durante los primeros 5 días de fermentación y después se mantienen constantes, por lo que una fermentación mayor a 5 días no mejorará el potencial de sabor de los granos (Ardhana y Fleet, 2003; Lagunes-Gálvez *et al.*, 2007). Por el contrario, podría deteriorar la calidad del grano debido al crecimiento de hongos.

La teoría de la fermentación dice que los precursores como las pirazinas los aminoácidos y azúcares reductores, son transformados durante el proceso de

tostado debido a las reacciones de pardeamiento no enzimáticas de Maillard. Sin embargo, varios autores han reportado que esto no es del todo cierto, ya que pequeñas cantidades de diferentes tipos de pirazinas han sido encontradas en las paredes del grano de cacao fermentado (Hashim *et al.*, 1998).

Durante la fermentación, el ácido cítrico es consumido casi en su totalidad, incrementando el pH hasta alcanzar un valor entre 5 y 6 después de 6 días de fermentación (Lagunes-Gálvez *et al.*, 2007).

El contenido de polifenoles disminuye durante la fermentación, debido a la actividad de la enzima polifenol oxidasa (Rohan, 1958). Su actividad es reducida fuertemente durante los primeros días de fermentación.

Aun así, una baja actividad de la polifenol oxidasa durante el proceso es suficiente para llevar a cabo las reacciones de oxidación que tienen lugar en la parte aeróbica de la fermentación y disminuir significativamente el contenido de polifenoles. Sin embargo, una vez que la polifenol oxidasa es inactivada, es probable que se lleve a cabo una oxidación no enzimática (Hansen *et al.*, 1998).

2.6.3.2 Aireación de la fermentación

Independientemente del método de fermentación, la cantidad de grano de cacao a fermentar tiene una influencia en el proceso.

Hashim *et al.*, (1998), realizaron un experimento con un reactor de tambor rotatorio de tamaño estándar y con tiempos de agitación programados. En un primer caso, colocaron dentro del reactor un gran volumen a fermentar, lo que originó una disminución de aeración durante el proceso, esto ocasionó una disminución en la actividad microbiana y por lo tanto en la temperatura y la actividad proteolítica.

Por otro lado, al fermentar un volumen pequeño de granos de cacao, bajo las mismas condiciones que el experimento anterior, se observó una aeración mayor, esto originó una pérdida de calor, disminuyendo así la temperatura y la velocidad metabólica de la actividad microbiana.

Con lo anterior se concluye que la cantidad de grano es inversamente proporcional a la aeración durante la fermentación. Es decir, a mayor volumen de grano disponible para la fermentación, menor aeración en la masa de fermentación.

2.6.4 Secado

Tradicionalmente, el secado del cacao fermentado es realizado por exposición al sol. Sin embargo, algunos productores recurren al secado artificial por samoas, las cuales consisten en tanques cubiertos con mallas metálicas, con una entrada de alimentación de aire caliente en uno de los costados del tanque. Los granos a secar se colocan sobre la malla y el aire caliente sale atravesando la malla y los granos sobre esta, llevándose consigo la humedad presente en los granos, el tiempo requerido varía de acuerdo a la humedad contenida.

Se recomienda iniciar el secado con una temperatura cercana a los 50°C y luego seguir subiendo hasta que se mantenga con una temperatura cercana a los 60°C. Si el grano se somete a temperaturas superiores a los 70°C, las almendras no terminan el proceso normal de desarrollo del sabor que inició en la fermentación, se vuelven quebradizas y de muy difícil manejo, finalmente el pH no llega a su punto ideal y permanece con cierta acidez.

En esta etapa, los sabores se desarrollan, el proceso de pardeamiento continúa y la astringencia, amargor y acidez son reducidas (Jinap y Thien, 1994). En teoría el proceso de secado finaliza cuando el contenido de humedad en el grano es menor a 8%.

El secado al sol es considerado el mejor método para obtener un mayor y mejor desarrollo de sabores (Jinap y Thien, 1994). Sin embargo, este método toma largos tiempos y requiere de mano de obra para efectuarla. Además, se producen granos de cacao con calidades heterogéneas durante temporadas de lluvia.

El secado termina cuando el productor lo considera, basado en su propio criterio. Sin embargo, y a pesar de la experiencia del productor, el contenido de humedad y en consecuencia la calidad del grano de cacao seco, puede variar considerablemente entre los granos (Rohsius, *et al.*, 2006).

El secado es una continuación del estado oxidativo del proceso de fermentación y por lo tanto juega un rol importante en la reducción de astringencia, amargor y acidez.

Este proceso es crucial para la calidad final del grano de cacao. Si el secado se realiza rápidamente, los granos pueden retener una excesiva cantidad de ácidos, incluyendo al ácido acético, el cual es responsable del sabor en el cacao. Por otro lado, si el secado es lento, puede otorgar baja acidez, colores pálidos y alta presencia de hongos en el grano (Bharath *et al.*, 2008, Zhahouli *et al.*, 2010).

Al finalizar el secado, el grano de cacao debe ser almacenado en sacos, para su posterior transporte y manipulación.

2.6.5 Almacenamiento

Una vez completado el proceso de secado y clasificación, los granos de cacao deberán introducirse en sacos adecuados y almacenarse. El ensacado y almacenamiento correcto son tan importantes como una fermentación y un secado adecuados. Un ensacado o almacenamiento inadecuado puede dar lugar al rechazo del cacao, lo que conlleva una pérdida de tiempo, de esfuerzos y de dinero.

Los granos de cacao deben introducirse en sacos limpios bien cosidos o sellados. Estos deben ser de materiales no tóxicos, preferentemente sacos de yute libres de hidrocarburos, de calidad alimentaria, que no atraigan insectos o roedores y sean lo suficientemente fuertes para aguantar el almacenamiento durante períodos más largos.

Los sacos de granos de cacao deben guardarse en almacenes impermeables, bien ventilados, libres de humedad e insectos y alejados de humos y otros olores que podrían estropear el cacao. Los sacos se deben almacenar sin tocar el suelo, y estar alejados de las paredes. Las zonas de almacenamiento se mantendrán siempre limpias y cerradas (García, 1994).

2.7 Composición química del grano de cacao

Cada semilla contiene una cantidad significativa de grasas, entre 40 y 50% como manteca de cacao, y polifenoles, los cuales representan un 10% del peso seco del grano de cacao. El grano de cacao fresco tiene una composición aproximada de 32-39% de agua, 30-32% de grasas, 8-10% de proteínas, 56% de polifenoles, 4-6% de almidón, 4-6% de pentosas, 2-3% de celulosa, 2-3% de sacarosa, 1-2% de teobromina, 1% de ácidos y 1% de cafeína (Lopez *et Dimick*, 1995). De entre los compuestos polifenólicos y flavonoides de cacao, los taninos (hidrolizables y condensados), el grupo flavan-3-ol y las antocianinas, son responsables del sabor astringente, afectan la estabilidad y digestibilidad del cacao (Bate-Smith, 1973; Haslam *et al.*, 1988).

Dado que el cacao tiene un alto contenido de monómeros tales como epicatequina y catequina, y oligómeros (procianidinas) como los flavonoles, tanto el cacao como el chocolate son considerados alimentos funcionales (Rusconi y Conti, 2010). El Cacao contiene alrededor de 380 químicos desconocidos y 10 compuestos psicoactivos (Praag *et al.*, 1968).

2.8 Composición química de la pulpa de cacao

La pulpa de cacao contiene de 82 a 87% de agua, 10 a 15% de azúcares fermentables, de los cuales 60% es sacarosa y 39% corresponde a una mezcla de glucosa y fructosa, 2 a 3% de pentosas, 1 a 3% de ácido cítrico que le confiere valores de pH que oscilan entre 3 y 3.5 y de 1 a 1.5% de pectina, además de proteínas, aminoácidos, vitaminas (principalmente vitamina C) y minerales (Schwan y Wheals, 2004b). Estas condiciones dan lugar a la presencia de microorganismos, que ocasionan el inicio natural de la fermentación del grano de cacao, la cual durará entre 4 y 7 días con la finalidad de eliminar el mucilago por actividad microbiana.

Sin embargo, la pulpa también presenta altos contenidos de pectina la cual en combinación con los polisacáridos presentes confieren a la pulpa características viscosas, limitando la difusión del aire a través de los granos durante la fermentación (Schwan *et al.*, 1995).

Por otro lado, no toda la pulpa es necesaria para la fermentación de grano. En zonas de producción como Malasia y Brasil se ha establecido que por medio de una remoción de la pulpa es posible generar granos de cacao fermentados menos ácidos y con bajo contenido de ácido láctico (Schwan y Wheals, 2004b).

2.9 Micotoxinas

Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por hongos filamentosos, capaces de crecer en gran variedad de sustratos y bajo las más diversas condiciones ambientales, contaminando con frecuencia alimentos, en especial los de origen vegetal. La respuesta tóxica causada por las micotoxinas en el hombre y los animales se denomina “micotoxicosis”.

2.9.1 Micotoxicosis

Los primeros indicios de “micotoxicosis” fueron durante la Edad Media con una enfermedad conocida ahora como ergotismo. Esta se presentaba debido al consumo de alimentos preparados con cereales contaminados con alcaloides ergóticos, producidos por el hongo *Claviceps purpurea*. El ergotismo es causado por la exposición a la dietilamida del ácido lisérgico, la cual es una sustancia que produce alucinaciones, delirios, convulsiones, gangrena en las extremidades y una intensa sensación de quemazón (Beardall y Miller, 1994).

Durante el siglo XIX se empezaba a conocer la capacidad de los hongos para producir “metabolitos tóxicos”. En el siglo XX, la producción de toxinas de *Fusarium* y *Stachybotrys*, en cereal ocasionó miles de muertes en Rusia y Siberia durante la Segunda Guerra Mundial. Esta micotoxina se conoce ahora como Aleucia Tóxica Alimentaria (ATA) (Nesterov, 1951).

Sin embargo, no fue sino hasta el año 1961 con el aislamiento de cepas de *Aspergillus* y el descubrimiento de las aflatoxinas y sus propiedades que, se evidenció la importancia de los hongos en el desarrollo de procesos patológicos en animales y la posible conexión con la patología humana (Casas, 1989).

Durante estos 50 años, la investigación sobre las micotoxinas ha cobrado mayor importancia. A la fecha se conocen más de 300 tipos diferentes, sus preferencias por determinados sustratos, composición, estructura química y las especies de hongos que las producen (Hardman, *et al.*, 1996)

Las micotoxinas pueden disolverse en las fases lipídicas (fundamentalmente) o acuosas de los alimentos, y difundir al interior de ellos, ya que presentan una amplia variedad química (Pitt, 1996). En consecuencia, pueden ser encontradas en cereales, semillas, frutas, y alimentos elaborados en base a estas materias primas.

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

Las micotoxinas pueden también ser agentes cancerígenos, mutágenos, teratógenos e inmunodepresores. La presencia de micotoxinas en niveles superiores a los tolerables representa un riesgo importante en inocuidad alimentaria.

2.9.2 Impacto en la salud

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

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

Existen dos tipos de toxicidad: aguda y crónica. En la toxicidad aguda el individuo consume alimentos con una alta carga de micotoxina, por otro lado, en la toxicidad

crónica el individuo consume alimentos con una baja carga de micotoxina pero de manera repetida a lo largo de un cierto período de tiempo.

Actualmente, no es común encontrar casos de micotoxicosis agudas en humanos. Sin embargo la toxicidad crónica de muchas micotoxinas, tales como; aflatoxinas, ocratoxinas, fumonisinas o zearalenona, suscitan mayor preocupación (Galan y Rodriguez, 2003) el tiempo de exposición y que en su mayoría estas se encuentran presentes en productos frecuentemente consumidos.

El Comité Mixto FAO/OMS (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación/Organización Mundial de la Salud) de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) ha evaluado, en diferentes sesiones, los efectos tóxicos de diversas micotoxinas, concluyendo que el riesgo de intoxicación aguda es entre moderado y bajo en comparación con otras familias de compuestos de origen microbiológico. Sin embargo, el riesgo se incrementa, cuando se habla de efectos crónicos según el organismo de Naciones Unidas, (FAO/OMS, 2012).

2.9.3 Mecanismo de síntesis

El metabolismo primario de un organismo es el conjunto de reacciones químicas (degradación y síntesis) catalizadas por enzimas, las cuales proporcionan al organismo la energía, los compuestos intermediarios para la síntesis y macromoléculas clave para su desarrollo.

Por otro lado, el metabolismo secundario comprende el proceso de síntesis en el que los productos finales, es decir los metabolitos secundarios, no juegan un papel primordial para el organismo. El metabolismo secundario, da lugar a una gran diversidad de moléculas, tales como las micotoxinas.

Los mecanismos de regulación del metabolismo secundario son muy complejos; estos dependen de la disponibilidad del sustrato y del desequilibrio progresivo entre los nutrientes. Es decir, si un determinado mecanismo en curso (por ejemplo: el ciclo de Krebs) reduce su actividad, un producto I (por ejemplo, acetil Coenzima A) se encontrará en exceso (Vía AB de la Figura 2) al final del crecimiento activo, originando que éste, se desvíe hacia la producción de metabolitos secundarios (Vía

C), que permiten al organismo no intoxicarse por la acumulación de metabolitos primarios (Le-Bars, 1988).

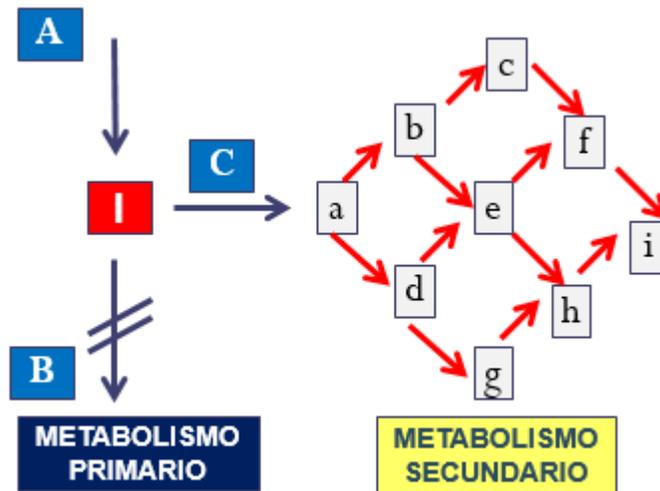


FIGURA 2. Red metabólica simplificada (Le-bars, 1988)

Los metabolitos secundarios son, en su mayoría elaborados por familias de productos químicamente vecinos; esto se explica particularmente por la existencia de lo que Bu'Lock describe como "redes metabólicas (Figura 2); la vía C da lugar a un metabolito (a) el cual puede transformarse en (b) o (d), y así sucesivamente, la naturaleza de los productos dependerá de las características individuales de la fuente (Le-Bars, 1988).

2.9.4. Factores que regulan el mecanismo de síntesis.

Los hongos toxigénicos crecen mejor bajo ciertas condiciones ambientales. Sin embargo, la presencia de estos hongos no implica una síntesis de micotoxinas, puesto que la producción de metabolitos secundarios no es esencial para el microorganismo.

Las condiciones a las cuales producen micotoxinas, son muy específicas e independientes de aquellas requeridas para el crecimiento del hongo. Por otro lado, la ausencia visible de hongos no significa que las micotoxinas no puedan estar

presentes, dado que pueden permanecer en el producto tiempo después de que el hongo productor ha desaparecido.

Los principales factores que influyen el crecimiento y producción de toxinas de *Aspergillus* son temperatura, pH y humedad. Sin embargo los factores ambientales también participan, así como los factores químicos y biológicos los cuales juegan un papel importante (Pitt, 2000).

2.9.4.1 Factores extrínsecos

El diverso grupo de hongos y levaduras que atacan los alimentos incluye varios cientos de especies. La capacidad de estos organismos para atacar muchos alimentos es debido en gran parte a su relativa versatilidad de requerimientos ambientales.

TEMPERATURA

Los hongos son capaces de sobrevivir bajo un amplio rango de temperaturas en los ambientes donde habitan. En general la temperatura óptima para la producción de micotoxinas es por debajo de la temperatura óptima de crecimiento. La producción de diferentes toxinas por la misma especie se encuentra también relacionada al nivel de temperatura.

La temperatura puede ser considerada una forma ambiental para controlar o prevenir la producción de micotoxinas en alimentos, principalmente en almacenamiento. Sin embargo, la temperatura no es fácilmente controlable, particularmente en productos agrícolas.

DISPONIBILIDAD DE AGUA (A_w)

Los requerimientos de humedad de hongos que atacan productos alimenticios son relativamente bajos, muchas especies crecen a $0.85 A_w$ o menos, aunque algunas levaduras requieren generalmente una alta actividad de agua. Regularmente $0.60 A_w$ es considerada el límite para crecimiento celular, pero las esporas de *Aspergillus* y *Penicillium*, son capaces de sobrevivir a bajos A_w por varios años (Carlile *et al.*, 2001).

El control de humedad es el mejor y más económico método de control ambiental para prevenir el crecimiento de hongos y la producción de micotoxinas.

CONCENTRACIÓN DE ION HIDROGENO (pH)

La concentración del ion hidrogeno en un medio puede afectar el crecimiento indirectamente por su efecto en la disponibilidad de nutrientes o directamente por su acción en la superficie celular. El requerimiento ácido/alcalino para el crecimiento de levaduras y hongos es muy amplio, el rango va de un pH de 3 hasta 8, con un óptimo alrededor de pH 5, si los requerimientos nutritivos son satisfechos. En general, las especies de *Aspergillus* son más tolerantes a un pH alcalino mientras que las especies de *Penicillium* parecen ser más tolerantes a pH ácido (Wheeler *et al.*, 1991).

Se ha observado que, a valores cercanos a un pH neutro, los hongos compiten con bacterias por el espacio, y a altos valores de A_w la mayoría de los hongos no muestran competitividad en el medio. Sin embargo, donde A_w es menor a 0.90, los hongos se vuelven dominantes independientemente del pH. En medios especializados donde las bacterias no parecen tener un rol como patógenas, específicamente *Fusarium* y *Penicillium* son dominantes también a pH y alta A_w (Wheeler *et al.*, 1991).

DISPONIBILIDAD DE OXIGENO

Los organismos pueden obtener energía por metabolismo oxidativo (respiratorio) o por fermentación. Las implicaciones para requerimientos de oxígeno para la respiración, fermentación o ambos en un hongo, los divide en aerobios obligados y anaerobios facultativos (Carlile *et al.*, 2001). Mohos presentes en forraje, así como todos los hongos filamentosos y levaduras, poseen un requerimiento absoluto de oxígeno. La concentración de oxígeno disuelto en el sustrato tiene una influencia mucho mayor en el crecimiento de hongos que la tensión de oxígeno atmosférico (Pitt y Hocking, 1997). La mayoría de hongos demandantes de oxígeno colonizaran la superficie de la comida, mientras que los menos exigentes se encontraran dentro del alimento.

Aunque tal vez no es económicamente factible, una manera segura para prevenir la contaminación por micotoxinas de cereales y otros alimentos, es almacenarlos bajo condiciones anaeróbicas, por ejemplo, en atmósferas de CO₂ o nitrógeno.

MICROFLORA COMPETITIVA

La presencia simultánea de diferentes microorganismos, tales como bacterias u otros hongos, puede afectar el crecimiento de hongos y la producción de micotoxinas. Es por esto que varios microorganismos han sido reportados como agentes control de plagas biológicas. Un ejemplo claro se observa en *Trichoderma harzianum* el cual produce una enzima lítica, quitinasa con una actividad antifúngica contra un amplio rango de cepas fúngicas, una de ellas, *A. niger* (Nampoothiri *et al.*, 2004; Valero *et al.*, 2007).

INSECTOS

Insectos y ácaros son uno de los vectores capaces de introducir esporas de hongos en alimentos por lesiones que estos le producen. Los insectos pueden contribuir a la infección de mercancía agrícola de diferentes formas: Pueden transportar un inóculo primario, mover el inóculo a través del producto, diseminar esporas dentro del alimento y/o facilitar la colonización e infección por daño de alimentos (Payne y Brown, 1998).

FACTORES NUTRICIONALES

Como heterótrofos, los hongos requieren compuestos orgánicos para la síntesis de la biomasa (metabolismo anabólico) y para producir la energía para realizar estas reacciones (metabolismo catabólico). Estos aspectos del metabolismo son frecuentemente referidos como metabolismo primario (Smith y Moss, 1985).

Los hongos utilizan un número de fuentes de carbono diferentes para cubrir sus necesidades de carbón para la síntesis de carbohidratos, lípidos, ácidos nucleicos y proteínas. La oxidación de azúcares, alcoholes, proteínas, lípidos, y polisacáridos lo proveen de una fuente de energía. Los hongos requieren de una fuente de nitrógeno para la síntesis de aminoácidos para proteínas, purinas y pirimidinas para ácidos nucleicos, glucosamina para quitina, y varias vitaminas, ya que no tienen la

capacidad de fijar nitrógeno. Dependiendo del tipo de hongo, el nitrógeno es obtenido en forma de nitrato, nitrito, amonio o nitrógeno orgánico. La mayoría de los hongos usan nitrato, el cual es reducido primero a un nitrito y después a amoniaco.

La fuente de carbón y nitrógeno afectan la producción de micotoxinas y la diferenciación morfológica. Por ejemplo; la producción de OTA por *A. ochraceus* varía con las diferentes concentraciones de extracto de levadura (0-4%) y sacarosa (0-4%) en medios sintéticos (Atalla y El-Din, 1993). En 1976 Engel probó diferentes fuentes de carbohidratos como lactosa, maltosa, fructosa, glucosa y sacarosa, y encontró enormes rendimientos de OTA por *A. ochraceus* en un medio enriquecido con maltosa y Medina en 2004 reportó un comportamiento similar al enriquecer el medio con polen de abeja.

2.9.4.2 Factores intrínsecos

La producción de micotoxinas está influenciada tanto por el genotipo del organismo como por el ambiente fisicoquímico en el cual se desarrolla. La producción de cualquier micotoxina depende de la cepa y no solo de la especie.

Sin embargo, la biosíntesis de OTA del ocratoxigénico *Aspergillus spp.* está determinada por las condiciones ambientales más que por la capacidad inherente de el microorganismo para producir OTA. Si un aislado no produce OTA bajo determinadas condiciones, esto no justifica cualquier conclusión acerca de su capacidad general para producir la toxina.

En contraste, la producción de OTA en el género *Penicillium* parecer ser estable e igualmente distribuida (Mühlencoert *et al.*, 2004).

2.10 Ocratoxina A

Los generos *Aspergillus* y *Penicillium* están asociados a la producción de metabolitos secundarios tóxicos, tales como ocratoxina A (OTA). En áreas tropicales es principalmente producida por *Aspergillus carbonarius*, *A. niger* y *A. ochraceus*.

En zonas templadas es producida principalmente por *Penicillium verrucosum* y *P. nordicum* (Abrunhosa *et al.*, 2010; O'Callaghan *et al.*, 2003; Pitt, 2000; Varga *et al.*, 1996). En México la principal especie productora de OTA es *Aspergillus westerdijkiae*, aislada de granos de café por Suárez-Quiroz *et al.*, en 2004.

En humanos la OTA ha sido asociada a la Nefropatía Endémica de los Balcanes (BEN), la cual es una enfermedad crónica que ataca al riñón y es predominante en personas que viven en el área rural de los Balcanes (la antigua Yugoslavia, Rumania, Bulgaria) y consiste en una fibrosis difusa que da lugar a una falla renal. Se han encontrado cantidades elevadas de OTA no solo en alimentos, sino también en el suero de sangre procedente de los habitantes pertenecientes al área de los Balcanes (Petkova-Bocharova *et al.*, 2003). También se le asocia a la nefropatía crónica intersticial en Tunesia (Maaroufi *et al.*, 1995), actúa como un neurotóxico, inmunosupresivo, teratógeno y cancerígeno (Höhler, 1998; Pfohl-Leszkowicz y Manderville, 2007; Woo y El-Nezami, 2016).

La agencia internacional de Investigación contra el Cáncer (IARC, 1993) ha clasificado la OTA dentro del grupo 2B como un posible carcinógeno en humanos. Esta toxina se ha vuelto de interés dada su frecuente presencia en productos tales como cereal, café y granos de cacao, cerveza, vino, especias y nueces (Bonvehí, 2004; Larsen *et al.*, 2001; Lund y Frisvad, 2003; Studer-Rohr *et al.*, 1995), y sus efectos negativos en la salud de humanos y animales (Hussein y Brasel, 2001; Zain, 2011).

2.10.1 Origen y estructura molecular

La OTA, fue aislada por primera vez en 1965 de una cepa de *Aspergillus ochraceus*, (Van der Merwe *et al.*, 1965). Sin embargo, también ha sido encontrada en otras especies tales como *A. alliaceus*, *A. melleus*, *A. ostianus*, *A. petrakii*, *A. sclerotiorum*, *A. sulphureus* (Hesseltine *et al.*, 1972), *A. albertensis*, *A. auricomus* (Varga *et al.*, 1996). Así como en el Aspergilio negro perteneciente a sección Nigri: *A. niger* var. *niger*, *A. carbonarius* (Samson, 1994). La producción de OTA también se ha

reportado en cepas de *Penicillium nordicum* y en menor cantidad y frecuencia en *P. verrucosum* (Castella *et al.*, 2002).

La contaminación por OTA se asocia comúnmente a los cereales, las uvas frescas, la fruta seca de la viña, el vino, la cerveza, el café y el cacao.

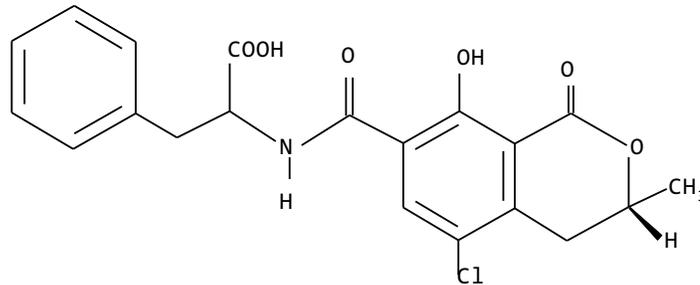


FIGURA 3. Estructura molecular de Ocratoxina A

Esta consiste en una molécula di-hidro-isocumarina unida por el grupo carboxil a la fenilalanina a través de un enlace amino con el grupo 7-carboxilo. La hidrólisis ácida de la OTA con enzimas proteolíticas da como resultado la L-fenilalanina y el compuesto conocido como ocratoxina α (Naccha, 2005).

La OTA se encuentra estructuralmente relacionada con la citrinina (Kuiper-Goodman y Scott, 1989), otra importante micotoxina que puede aparecer junto con la OTA, como se ha descrito en *Penicillium verrucosum* (Pitt y Hocking, 1997).

2.10.2 Propiedades Fisicoquímicas

La OTA, es un compuesto cristalino, incoloro, que exhibe fluorescencia azul bajo la luz UV. La sal de sodio de ocratoxina A es hidrosoluble, es moderadamente soluble en disolventes orgánicos polares como cloroformo y metanol (Budavari, 1989). También se considera termo-estable, ya que sobrevive a la mayoría de los procesos de alimentos, tales como tostado, malteado y cocción, por mencionar algunos (Krogh *et al.*, 1973; Scott, 1996).

En 2011 Castellanos-Onorio *et al.*, reportaron que durante el tostado de café, la Ocratoxina A es transformada en su forma abierta (OP-OTA), el producto de transformación encontrado, correspondió a la Hidroxi-Ocratoxina A, el producto de la sustitución nucleofílica de la OTA. También encontraron que las operaciones industriales del tostado del café no reducen la contaminación del café con OTA a niveles seguros. Dicho estudio, recomendó evitar la contaminación inicial de los granos durante los procesos post-cosecha del café, para así asegurar un producto final libre de OTA.

2.10.3 Toxicología

La OTA es tóxica aún sin una activación metabólica, pero muestra efectos mutágenos en células eucarióticas (Castegnaro *et al.*, 1991).

La toxicidad de la OTA depende de la especie, el género y la estructura celular específica del organismo que la produce. Actúa principalmente como una nefrotóxina en cerdos, pero también presenta efectos genotóxicos, inmunosupresivos, teratógenos y carcinógenos en roedores (Huff y Hamilton, 1979; Kuiper-Goodman, 1995; Petzinger y Weidenbach, 2002; Størmer *et al.*, 1983). En humanos ha sido clasificada como un carcinógeno en potencia por la Agencia Internacional de Cáncer (IARC, 1993).

El mecanismo molecular de los efectos tóxicos de OTA permanece desconocido. Sin embargo, se han observado aberraciones cromosomales, efectos inhibitorios en biosíntesis de proteínas y coagulación, inhibición de producción de ATP mitocondrial y gluconeogénesis, así como una inducción de peroxidación de lípidos y apoptosis (Petzinger y Ziegler, 2000).

En la sangre, la toxicidad de OTA se debe a la capacidad de unirse de diferentes forma a las proteínas del plasma y el suero de albúmina (Hagelberg *et al.*, 1989).

2.10.4 Biosíntesis

Una posible ruta para la biosíntesis de OTA fue publicada por Huff y Hamilton (1979), de acuerdo a su hipótesis, se presentan 3 pasos en la biosíntesis de OTA; la primera parte es la síntesis de un policétido de ocratoxina α vía meleina que

involucra la enzima policétido sintasa, seguida por una acil activación, donde la meleina es metilada y se oxida a 7-carboxi-meleina (OTB).

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

Sin embargo, en un estudio realizado por Harris y Mantle en 2001 no se encuentra evidencia de que métil meleina y OTC jueguen un rol de intermediarios en la ruta biosintética de OTA. Ellos difieren de la ruta propuesta por Huff y Hamilton, y sugieren una ruta, donde la OT β , un intermediario pentacétido, puede transformarse eficientemente tanto en OTA como en OTB con valores de 14 y 19 % respectivamente. Por otro lado, observaron que la OT α previamente clorada puede transformarse en OTA, por lo que sugieren que la cloración es el penúltimo paso en la ruta de síntesis de OTA.

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

La existencia de esta enzima ya había sido observada en la síntesis de OTA, en el extracto libre de células de *Aspergillus ochraceus* Wilh. CSIR804, y fue originalmente propuesta por Ferreira y Pitout, (1969).

Los genes involucrados en la biosíntesis de micotoxinas y otros metabolitos secundarios se organizan formando agrupaciones de genes o clúster, en donde se encuentra la información de la síntesis, la regulación de la ruta, el transporte del producto sintetizado y de la autoprotección del hongo frente a su propio metabolito (Ehrlich *et al.*, 2005; Shwab y Keller, 2008).

2.10.5 Genes involucrados en la biosíntesis de OTA

Geisen, Mayer, Karolewicz, & Farber, en 2004, reportaron por primera vez los genes de la ruta de biosíntesis de OTA, mediante la clonación de una secuencia que contenía tres genes adyacentes, relacionados con la producción de OTA en *Penicillium nordicum*. La secuenciación de estos genes permitió la detección mediante PCR de especies de *Penicillium* productoras de OTA.

En el 2007, Schmidt-Heydt *et al.*, reportaron una policétido sintasa relacionada con la síntesis de OTA en *P. verrucosum* (gen otapksPV).

Para las especies de *Aspergillus*, (O'Callaghan *et al.*, 2006) identificaron un gen codificador de una proteína policétido sintasa (PKS), que con está involucrado en la síntesis de OTA por *A. ochraceus*.

Por otro lado Morello *et al.*, en 2007, reportaron el uso de los primers Bt2Aw-F y Bt2Aw-R, diseñados a partir del gen de la β -tubulina, que les permitió detectar y cuantificar especies de *Aspergillus* productoras de OTA. Y además diferenciar entre especies tan cercanas como lo son *Aspergillus ochraceus* y *Aspergillus westerdijkiae*, y observaron que el 84% de cepas reportadas anteriormente como *A. ochraceus*, eran realmente cepas de *A. westerdijkiae*.

Conocer a los genes involucrados en la biosíntesis de OTA en especies productoras, nos permite detectar y diferenciar cepas con potencial toxigénico, mediante la técnica PCR (Polymerase chain reaction), así como; cuantificar y detectar con mayor precisión con la técnica PCR en tiempo real. Esto a su vez genera un diagnóstico oportuno en productos alimentarios (Frisvad *et al.*, 2007; Schmidt-Heydt *et al.*, 2007).

2.10.6 Condiciones de producción de OTA

La producción de micotoxinas está dada por diversos factores, los cuales aplican también para la síntesis de OTA. Uno de esos factores es el tipo de especie que la produce, ya que cada una de estas requiere satisfacer necesidades fisiológicas diferentes y por lo tanto se desarrollan en medios diferentes. Esto hace necesario estudiar a fondo la relación entre la fisiología y la ecología de las especies.

La producción de OTA está relacionada principalmente a hongos del género *Aspergillus* y *Penicillium*. En zonas templadas como México, la principal cepa aislada es *A. westerdijkiae* (Suárez-Quiroz *et al.*, 2004).

Humedad, temperatura, el tipo de sustrato y algunos otros factores juegan un rol importante en el desarrollo de cepas productoras de OTA y sus toxigenesis (Le-Bars, 1988). Los factores que afectan el desarrollo de la cepa durante el almacenamiento son actividad de agua (A_w) y temperatura (Northolt *et al.*, 1979). *Aspergillus ochraceus* ha sido propuesto como el principal productor de OTA, crece entre 8 y 37°C, con un óptimo a 24-31°C. Las condiciones óptimas para crecimiento se presentan a una A_w de 0.95-0.99, mientras que el límite más bajo de crecimiento es a 0.79 en un medio conteniendo azúcares, y 0.81 en medios basados en NaCl (Pitt y Hocking, 1997).

La producción de OTA en medio de cultivo PDA estudiada por Harris y Mantle (2001), revela que la biosíntesis de la concentración máxima de esta toxina se obtiene después de 72 h aun añadiendo el compuesto etionina; el cual actúa como inhibidor de la metilación y solo tiene tal efecto en una fase temprana, a las 32 horas de iniciado el cultivo.

Existe una gran cantidad de estudios que reportan la presencia de *A. ochraceus* en cacao, siendo esta especie la más importante en virtud de su alta productividad de OTA.

2.10.7 Consumo y límites de OTA

Los dos principales grupos de alimentos que contribuyen en mayor medida al aporte medio diario de OTA son los cereales, sus productos derivados, y el vino.

Se estima que la ingesta diaria de OTA en Países Europeos se encuentra entre 0.15 y 2.5 ng kg⁻¹ de peso corporal⁻¹ (Miraglia y Brera, 2002). La OTA puede ser consumida de diferentes fuentes alimenticias. En efecto, esta micotoxina está ampliamente distribuida en productos alimenticios y su presencia ha sido reportada en cereales, café, frijol, soya, cacao, cacahuates, leche y cerveza.

En 1995 la OTA fue detectada en vino por Zimmerli y Dick, y estudios posteriores han confirmado la presencia de OTA en productos derivados de la uva (Stander *et al.*, 2000). El vino es considerado, después del cereal, la segunda fuente importante de ingesta de OTA.

La exposición semanal de consumidores europeos a la OTA ha sido encontrada entre 15 y 60 ng de OTA/kg de peso corporal (EFSA, 2006). El vino y cereales son los principales productos con altos contenidos de OTA. Los cereales contribuyen al 50% del total de la ingesta, mientras el cacao contribuye a cerca del 5% (FAO/WHO, 2012). En 2006, la autoridad en seguridad alimenticia Europea (EFSA) estableció una ingesta semanal tolerable de 120 ng/kg de peso corporal, y límites máximos de 2 µg/kg en vino y jugo de uva, 10 µg/kg en uvas secas, 5 µg/kg en café tostado y 10 µg/kg en café soluble, así como en un gran número de alimentos.

En caso del cacao, la Unión Europea, no ha establecido aún un límite máximo de contaminación.

La OTA inhibe la síntesis de proteínas *in vitro* e *in vivo* a través de la competición con fenilalanina, además de incrementar la peroxidación lípida, generando daño celular y mitocondrial (Obrecht-Pflumio y Dirheimer, 2001).

2.11 Presencia de ocratoxina A en cacao

La OTA es la principal micotoxina presente en cacao (Mounjouenpou *et al.*, 2008). De acuerdo al documento de trabajo del Comité Experto en Contaminantes Agrícolas del Comité Científico de la Comisión Europea en Alimentos, las propuestas para regular OTA en cacao y productos de cacao son los siguientes:

- a) 2mg/kg en materia prima como granos de cacao, para la transformación en productos alimenticios.
- b) 1mg/kg para productos de alta demanda, es decir: polvo de chocolate, chocolate y bebidas de chocolate.

A pesar de que el grano de cacao no es consumido crudo, que la mayor parte de OTA se encuentra en la cascara (80%) y que el proceso de transformación de cacao no elimina completamente la toxina (Amézqueta *et al.*, 2005; Tafuri *et al.*, 2004), el

mercado externo se muestra más preocupado con respecto a los niveles de OTA en cacao. Debido a esto, los granos de cacao y sus derivados pueden ser exportados únicamente si existen criterios de calidad bien establecidos y que por supuesto incluyan el análisis de OTA.

Amezqueta *et al.*, en (2004) evaluaron la presencia de OTA en 46 muestras de grano de cacao de diferentes orígenes y lotes, provenientes de África. Un total de 63% presentaron contaminación de OTA en un rango de 0.04 y 14.8 µg/kg.

La temporada de cosecha, las condiciones fitosanitarias de la mazorca, y la correlación entre condiciones climáticas como humedad y temperatura durante el procesamiento (Almela *et al.*, 2007; Bastide *et al.*, 2006; Mounjouenpou *et al.*, 2008) son determinantes para el desarrollo de hongos toxigénicos y la síntesis de OTA.

La contaminación por OTA se presenta después de la cosecha. Las principales fuentes de contaminación son el suelo, equipos y las superficies de secado. Además, la madurez y los defectos en mazorca también tienen un alto impacto en los valores encontrados, por lo que utilizar materia prima de calidad contribuye a la reducción de la toxina.

Dado lo anterior, un cuidadoso análisis de peligros y puntos de control críticos (HACCP) durante el procesamiento de granos de cacao y etapas subsecuentes, son indispensables para prevenir el riesgo de un alto contenido de OTA (Almela *et al.*, 2007; Belli *et al.*, 2006; Chiodini *et al.*, 2006).

2.12 Hongos productores de OTA en cacao

La OTA y los hongos que la producen pueden estar presentes a lo largo de la cadena productiva en las fincas cacaoteras, desde la cosecha hasta el almacenamiento y transporte (FAO/WHO/UNEP, 1999).

El clima templado y húmedo de los países productores de cacao, aunados a las prácticas de agricultura, favorece el desarrollo de especies de *Aspergillus* y *Penicillium*, y la biosíntesis de OTA.

Los hongos filamentosos, se encuentran ampliamente presentes en los últimos días de fermentación y están usualmente relacionados con la pérdida de sabor y deterioración de los granos de cacao (Batista *et al.*, 2003)

Mounjouenpou *et al.*, en 2008 realizaron un estudio sobre la presencia de hongos filamentosos productores de OTA en el procesamiento de granos de cacao en Camerún. Este grupo de trabajo reportó que independientemente de las condiciones de la mazorca y el tipo de fermentación (cajas o montones), un gran número de hongos filamentosos inciden, principalmente después de la fermentación.

Aspergillus niger fue encontrado en todas las etapas del procesamiento, desde grano fresco hasta grano seco. Particularmente *Aspergillus carbonarius* se encontró en grano natural (sin fermentar), que provenía de mazorcas dañadas.

En 2010, Copetti *et al.*, evaluaron la presencia de OTA en granos de cacao, en todos los estados de procesamiento, y encontraron que la mayor incidencia ocurría en la etapa de secado y almacenamiento. También evaluaron la capacidad de producción de especies potencialmente toxigénicas, y encontraron que todas las especies aisladas de *Aspergillus carbonarius* y *Aspergillus ochraceus*, fueron productoras de OTA. Mientras que solo 5% de *Aspergillus niger* presentaron tal habilidad.

En otro estudio realizado en Brasil en 2006 por Copetti *et al.*, se analizaron 21 muestras de cacao (granos de cacao, cascara y polvo de cacao) y se evaluó la presencia de hongos con capacidad de producir OTA. Un total de 123 cepas de *Aspergillus* estuvieron presentes en el 42.9% de las muestras, de las cuales el 18.2% de aislados de *A. niger*, 100% de *A. carbonarius* y 100% de *A. ochraceus* fueron productores de OTA.

Del genero *Penicillium* las principales especies responsables de producción de OTA, son *P. verrucosum* y *P. nordicum* (Pitt y Hocking, 1997), las cuales no han sido reportadas como productoras de OTA en cacao. Sin embargo, han sido reportadas como productoras de otras micotoxinas importantes, tales como *P. citrinum* (citrinina) y *P. chrysogenum* (roquefortine C) (Pitt y Hocking, 1997)

La especie *P. verrucosum*. Puede crecer a actividades de agua menores a 0.80 y a bajas temperaturas que oscilan entre 0 y 31°C con un óptimo a 20°C.

La capacidad de *P. verrucosum* de desarrollarse a bajas temperaturas, ha hecho que se le considere como endógeno de las zonas frías. Se ha reportado su presencia en cereales cultivados en las zonas del norte de Europa y el centro de Canadá. En cambio *P.nordicum* se encuentra más adaptada a medios ricos en sal y proteínas, como ciertos quesos y carnes ahumadas y secas (Cabañes *et al.*,2010)

Desde 1999, la industria Europea analiza muestras de granos de cacao importado de diferentes orígenes. Y se ha encontrado que los granos con OTA provienen de todas las regiones productoras. También se reportó que los niveles encontrados varían entre regiones, dentro de las regiones y entre años (Gilmour y Lindblom, 2005).

Además, durante las etapas de post-cosecha, principalmente durante el almacén, la cantidad de OTA puede aumentar si las condiciones de almacenamiento no son adecuadas.

La presencia de OTA ha sido reportada en cacao y sus derivados, originarios de Costa de Márfil, Guinea, Nigeria, Camerún (Bonvehí, 2004) , Italia(Tafari *et al.*, 2004), Brasil (Teixeira *et al.*, 2011) por mencionar algunos.

Sin embargo, los reportes acerca de la presencia de esta toxina en cacao mexicano y sus derivados son escasos. En este trabajo, se evaluará la presencia de ocratoxina A en granos de cacao a lo largo del procesamiento de dos fincas productoras en Tabasco, durante una cosecha en años 2013 y dos cosechas en 2014.

2.13 Estudio de la ecología microbiana de cacao.

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

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

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

2.14 Estudio de la ecología microbiana por PCR-DGGE

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

Para bacterias se utilizan primers diseñados a partir de la secuencia del ADN_r (Acido Desoxirribonucleico ribosomal) 16s. En el caso de las levaduras es 26S y para los hongos 28S. El ADN amplificado es inmediatamente sometido a una DGGE.

La DGGE permite separar los fragmentos de ADN del mismo tamaño pero de secuencias diferentes (Composiciones diferentes en bases púricas y pirimídicas) y por lo tanto evaluar la diversidad en una comunidad de microorganismos compleja, basada en su genotipo.

Una muestra de ácido nucleico se deposita sobre un gel de electroforesis (poliacrilamida/bis) con un gradiente lineal y creciente de un agente desnaturalizante (urea-formamida).

Durante la migración en el DGGE las dos hebras de ADN se separan en función de su composición de bases A-T y G-C (Dos enlaces hidrogeno en A-T y 3 en G-C).

Se obtiene una resolución óptima cuando los fragmentos no son totalmente desnaturalizados. Para evitar la desnaturalización total de la doble cadena de ADN, se agrega una estructura con un alto punto de fusión rica en G-C en uno de los *primers* utilizados para la amplificación por PCR.

La PCR se realiza con un primer líder con una secuencia de 40 GC adherida al extremo 5', dicha secuencia es conocida GC "*clamp*" (Sheffield, Cox, Lerman, & Myers, 1989), cuya traducción al español (grapa) hace referencia a su función para evitar que las dos hebras de ADN se separen completamente.

La molécula de ADN más estable (alto contenido de G-C) migrará más lejos que aquella que no lo es (bajo contenido de G-C) y que se desnaturalizará de manera temprana en el gradiente.

Los fragmentos de ADN de doble cadena presentan secuencias diferentes por lo que también presentarán migraciones diferentes, ya que se detendrán a diferentes posiciones o longitudes del gel, de acuerdo a la concentración del gradiente desnaturalizante.

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

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

2.14.1 Aplicaciones

En 1993, Muyzer *et al.*, describieron un nuevo método para analizar la diversidad genética de poblaciones microbianas complejas. Esta técnica se basa en la separación de fragmentos de genes que codifican para ARNr 16s, previamente amplificados por PCR, en una electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante.

La DGGE, esta ha sido empleada con éxito para estudiar diferentes comunidades microbianas en el ambiente evaluando la diversidad y la dinámica de la comunidad microbiana.

Durante los últimos años, la técnica DGGE ha sido utilizada para estudiar las poblaciones de hongos en el café (Masoud *et al.*, 2004; Vilela *et al.*, 2010), la dinámica de levaduras en fermentaciones en vino (Cocolin *et al.*, 2000), la diversidad de bacterias (Lefeber *et al.*, 2011; Papalexandratou *et al.*, 2013) y levaduras (Nielsen *et al.*, 2005) en cacao.

Esta técnica es una alternativa más viable que el método de microbiología tradicional, para evaluar la ecología microbiana presente en productos de interés. En cada caso, los autores han obtenido una excelente correlación entre los datos obtenidos con microbiología tradicional y la presencia o ausencia de una banda en el perfil DGGE obtenido.

Nielsen *et al.*, (2005), utilizaron la técnica para caracterizar las poblaciones de levaduras presentes en el grano de cacao fermentado de Ghana sobre tres lugares diferentes a diferentes períodos durante la temporada de cosecha.

Sobre el mismo enfoque Laforgue *et al.*, (2009), mostraron que la PCR-DGGE permite seguir la dinámica de comunidades de hongos presentes sobre las uvas para una detección temprana de especies relacionadas con los defectos del vino.

Masoud *et al.*, en 2004 siguieron la evolución de las levaduras durante el proceso por vía húmeda, ellos reportaron una buena correlación entre los resultados obtenidos por los métodos tradicionales y la PCR-DGGE.

En lo que concierne al cacao, Jespersen *et al.*, en 2005 investigaron la presencia y diversidad de levaduras en fermentaciones en grano de cacao en el este de África. Este estudio fue el primero en utilizar métodos moleculares para la identificación de levaduras involucradas en la fermentación de cacao.

En este estudio se reportaron las especies *Candida krusei*, *Pichia membranifaciens* y *Hanseniaspora guilliermondii*, como las predominantes en las fermentaciones realizadas por la técnica de “amontonamiento”.

Por otro lado, Nielsen *et al.*, en 2007, estudiaron la presencia de bacterias ácido lácticas, involucradas en la fermentación de cacao. Utilizaron la técnica PCR-DGGE y las técnicas de microbiología tradicional. Reportaron que la flora encontrada por microbiología, coincidía con el perfil DGGE. Sin embargo, la DGGE permitió observar que *Leuconostoc pseudoficulneum* juega un rol importante durante la fermentación de cacao, a diferencia del comportamiento que presentó en medios de cultivo.

También reportaron un mayor número de levaduras que las aisladas por medios de cultivo, incluyendo tres especies que no se habían descrito antes. Varias BAL incluyendo *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *L. pseudoficulneum*, *Pediococcus acidilactici* y una supuesta especie de BAL sin describir, también fue detectada.

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

La técnica PCR-DGGE en cacao aporta estimación general del número de las comunidades microbianas como una función de tiempo, y aún en ausencia de resultados de cultivos, la evolución de compuestos o cualquier otra característica, esta estimación puede ser asociada a las dinámicas de la ecología microbiana, en cualquier caso.

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

2.14.2 Limitantes de la técnica

Como todas las técnicas moleculares, la PCR-DGGE también presenta limitantes, los cuales pueden ser críticos. Estas limitantes pueden presentarse en diferentes puntos del estudio y van desde el muestreo, la conservación de la muestra, la lisis celular en la extracción de ADN, hasta la amplificación de ADN por PCR, la migración electroforética sobre el gel DGGE y/o la sensibilidad del método para las fuentes analizar.

La muestra debe ser aleatoria para representar lo más fielmente posible la comunidad microbiana del medio a analizar. En el caso donde no sea posible extraer el ADN inmediatamente, las muestras deben conservarse en condiciones que permitan conservar la integridad de los ácidos nucleicos. El lavado, el transporte o los procedimientos de enfriamiento pueden influenciar la presencia o ausencia de especies microbianas presentes en la muestra, aumentando o reduciendo el número y las especies que pudieran ser observadas en PCR-DGGE (Ercolini, 2004)

Por otro lado, la extracción de ADN es una etapa clave. La lisis celular, la cual es la primera etapa en la extracción de ADN, debe dañar lo menos posible los ácidos nucleicos.

Las especies microbianas no poseen la misma sensibilidad a los agentes de lisis, ya que presentan diferentes composiciones en pared celular o membrana celular, según sea el caso. La purificación de los ácidos nucleicos puede ser difícil si las muestras no son homogéneas. Las matrices alimentarias con alto contenido en lípidos, proteínas, polisacáridos y sales, afectan negativamente los rendimientos de extracción y pueden contaminar los extractos de ADN. Estos residuos pueden actuar como inhibidores en la amplificación por PCR.

La amplificación por PCR es una de las principales fuentes de sesgo en el estudio de la diversidad microbiana. En algunas ocasiones las secuencias a amplificar pueden presentar una preferencia (Reysenbach *et al.*, 1992). Una mezcla del ADN de una comunidad microbiana, puede ser parcialmente amplificada, y como consecuencia se obtendrá un producto que no sea representativo del número de

especies originalmente presentes en dicha comunidad. Por lo que las especies detectadas no reflejaran completamente la diversidad en la muestra.

Por otro lado, otro de los limitantes de la técnica puede ser la propia electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE), ya que la acrilamida no permite una separación de fragmentos de longitudes mayores a 500 pb (pares de bases) (Myers *et al.*, 1985). Esto hace difícil la identificación confiable de especies microbianas ya que las secuencias de las bandas DGGE que son comparadas con las bases de datos pueden ser idénticas para un mismo género, esto se acentúa más si las secuencias comparadas son cortas (200 a 300 pb en muchos casos). Además, no siempre es posible separar los fragmentos de ADN que tienen poca variación en sus respectivas secuencias (Vallaeyts *et al.*, 1997). La co-migración de fragmentos de ADN a menudo es un problema para la investigación de secuencias particulares. En ocasiones aun siendo secuencias diferentes, los puntos de fusión de los fragmentos de ADN pueden ser idénticos a veces. En ese caso, los geles DGGE no separan las bandas (Ercolini, 2004).

La detección de especies por PCR-DGGE generan ciertas ambigüedades. Algunos autores estiman que depende de la concentración de la población a analizar, por ejemplo Cocolin *et al.*, (2000) consideran que una población mínima de 10^4 células/ml de levaduras es necesaria para una detección exitosa. Otros autores sostienen que la detección está en función de la concentración que cada especie presente. Es decir, si se tienen 10 especies en una muestra, y solo 8 de ellas tienen una concentración alta, solo estas 8 serán detectadas por PCR-DGGE y las otras no (Prakitchaiwattana *et al.*, 2004).

2.15 Detección de especies fúngicas por PCR

En la identificación de las especies fúngicas mediante la taxonomía clásica se utilizan, casi exclusivamente, caracteres morfológicos (Hawksworth *et al.*, 1996). Estos métodos incluyen la necesidad de cultivar los hongos en diferentes medios, la observación de características externas macroscópicas (coloración y textura, diámetro de la colonia...) y de estructuras microscópicas (ornamentación y tamaño de los conidios, longitud y anchura de las métulas y fialides). Estos métodos son

laboriosos, requieren varias semanas para su observación y análisis, son difíciles de estandarizar y han de ser realizados por expertos en taxonomía (Zhao *et al.*, 2001). Por otra parte, no se detecta la variabilidad intra-específica y por lo tanto no es posible realizar una identificación de cepas confiable. Por todo ello, la identificación de hongos por métodos tradicionales ha sido cuestionada en los últimos años. En algunos casos se han utilizado otros parámetros como son los perfiles de metabolitos secundarios para diferenciar especies muy próximas. Estos caracteres siguen empleándose en la actualidad para *Aspergillus* por algunos autores (Frisvad y Frank, 2004; Parenicová *et al.*, 2001; Samson *et al.*, 2004). Por otro lado, los avances en las técnicas de análisis de ADN han conducido al desarrollo de nuevos métodos para la caracterización y diferenciación de cepas tanto de hongos filamentosos como de otros organismos. La principal ventaja de los métodos de identificación basados en el ADN sobre los métodos de identificación fenotípica es que no están influenciados por las condiciones ambientales (Ness *et al.*, 1993), o por la interpretación de observaciones micro y macroscópicas. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es rápida y específica (Lefeber *et al.*, 2011; Nielsen *et al.*, 2007). Existen ciertas variantes de la técnica que amplifican y cuantifican en tiempo real, esto permite estimar la cantidad de ADN que inicialmente se encuentra presente en la muestra.

La detección de hongos productores de toxinas mediante PCR es rápida, sensible y específica, y puede estar basada en secuencias relacionadas o no con la toxina producida (Gonzalez-Jaen *et al.*, 2004). La primera situación presupone el conocimiento de los genes implicados en su biosíntesis. En cualquier caso, para sistemas específicos de detección se deben definir oligonucleótidos que permitan distinguir cepas, especies o incluso géneros, dependiendo del nivel de detección que queramos considerar.

En este sentido, es importante elegir bien la secuencia de ADN diana que se va a amplificar en un primer momento mediante PCR, la cual puede ser de genes codificadores, como los genes de EF-1 α , la β -tubulina, la calmodulina o policétido

sintasas (Perrone *et al.*, 2004; Dao *et al.*, 2005; Susca *et al.*, 2007a), o secuencias de regiones no codificadoras, como los espaciadores ITS.

Una de las regiones más empleadas actualmente para la distinción entre especies de hongos filamentosos, es la del ADN ribosomal (ADNr). Los genes que codifican para ARNr en eucariotas están repetidos en tándem con varios cientos de copias por genoma. Cada copia consiste en regiones altamente conservadas, que incluyen los genes que codifican para las subunidades de ARNr 18S, 5,8S y 28S (White *et al.*, 1990), alternadas con regiones espaciadoras variables.

Los espaciadores ITS (“Internal Transcribed Spacer”) consisten en dos regiones variables no codificantes llamadas ITS1 e ITS2 y están localizadas entre los genes del ADNr 18S y 5,8S y entre el 5,8S y 28S respectivamente. La región IGS (“Intergenic Spacer Region”) separa las unidades 18S y 28S del ADNr y no se transcribe, mientras que las regiones ITS si lo hacen.

La elección del ADNr para realizar estudios filogenéticos se debe a que se encuentra presente en todos los seres vivos lo que permite que se puedan establecer comparaciones entre casi cualquier organismo. Otra característica definitiva son los diferentes niveles de variabilidad que presentan las distintas regiones de la unidad de ADNr (genes codificadores y espaciadores ITS e IGS) (Hillis y Dixon, 1991). Las regiones más conservadas (genes) permiten la comparación de especies más alejadas evolutivamente mientras que el estudio de las regiones variables (espaciadores) permite realizar estudios entre especies más cercanas.

De tal forma que, se han desarrollado protocolos de detección por PCR para especies de *Aspergillus* y *Penicillium* basados en genes codificadores de la subunidad pequeña del ARNr de ambos organismos respectivamente (Makimura *et al.*, 1994), mientras que sus regiones espaciadoras se emplean para la identificación de especies del mismo género.

El empleo de las regiones del rADN presenta distintas ventajas frente a otras dianas moleculares (Arnheim *et al.*, 1980). La región ITS tiene un tamaño de aproximadamente 600 pb, mientras que la región IGS tiene entre 1700-2800 pb, el

nivel de variabilidad de la región ITS es menor que la región IGS y mayor que los genes codificadores, lo que la hacen idónea para discriminar especies estrechamente relacionadas en hongos filamentosos (Parenicová *et al.*, 2001; White *et al.*, 1990), para la identificación de especies de *Aspergillus* mediante el polimorfismo conformacional de cadena sencilla de la ITS amplificada mediante PCR (Rath y Ansorg, 2000), y para ensayos de PCR específicos de especies productoras de toxinas (Sugita *et al.*, 2004).

El uso de técnicas independientes de cultivo, como la Reacción en Cadena de Polimerasa-Electroforesis en Gel de Gradiente Desnaturalizante (PCR-DGGE) para identificar la microflora en cacao ha sido aplicada exitosamente en bacterias lácticas y acetobacterias (Camu *et al.*, 2007) . Por otro lado, la Reacción en Cadena de Polimerasa cuantitativa (qPCR) en tiempo real, ha sido reportada para la detección y cuantificación de hongos toxigénicos presentes en granos de café y en uvas para elaborar vino (Morello *et al.*, 2007).

3. JUSTIFICACIÓN

La presencia de OTA en el grano de cacao, los problemas de salud que se le atribuyen y dado que actualmente no existen estudios sobre las poblaciones microbianas presentes en cada una de las etapas del proceso de cacao mexicano, hacen necesario estudiar las dinámicas de dichas poblaciones y su posible influencia en el desarrollo de hongos toxigénicos y la producción de OTA.

4. HIPÓTESIS

Los períodos de cosecha, así como las relaciones inter e intra-específicas de las poblaciones microbianas (bacterias, levaduras y hongos) presentes durante el procesamiento de cacao, influyen sobre la presencia de hongos toxigénicos y la contaminación de OTA en grano de cacao mexicano.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Estudiar la dinámica de bacterias, levaduras y hongos filamentosos presentes durante la cosecha y post-cosecha del cacao y determinar su influencia sobre el desarrollo de hongos toxigénicos y la producción de OTA.

5.2 Objetivos específicos

1. Estudiar la población microbiana en granos de cacao durante la post-cosecha por métodos dependientes e independientes (PCR-DGGE).
2. Relacionar los niveles de OTA con las especies toxigénicas y su potencial riesgo toxigénico a lo largo del proceso de cacao.
3. Estudiar la presencia de bacterias y levaduras, y su efecto sobre hongos toxigénicos y la producción de OTA.
4. Estudiar la influencia del periodo de cosecha y de las practicas post-cosecha sobre las poblaciones microbianas y la producción de OTA.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un muestreo a lo largo del proceso de cacao en las fincas A y B. Cada una de estas muestras fue sometida a 3 análisis diferentes. Por un lado, se estudiaron las dinámicas poblacionales y se aislaron e identificaron especies fúngicas, por medio de microbiología tradicional. Por otro lado, se realizó una extracción de ADN total de la superficie de las muestras para el estudio de las dinámicas poblacionales utilizando la técnica PCR-DGGE. Adicionalmente, se cuantificó la cantidad de OTA presente en el grano de cacao y se evaluó la capacidad productora de OTA de presuntas cepas ocratoxigénicas aisladas durante las etapas del proceso.

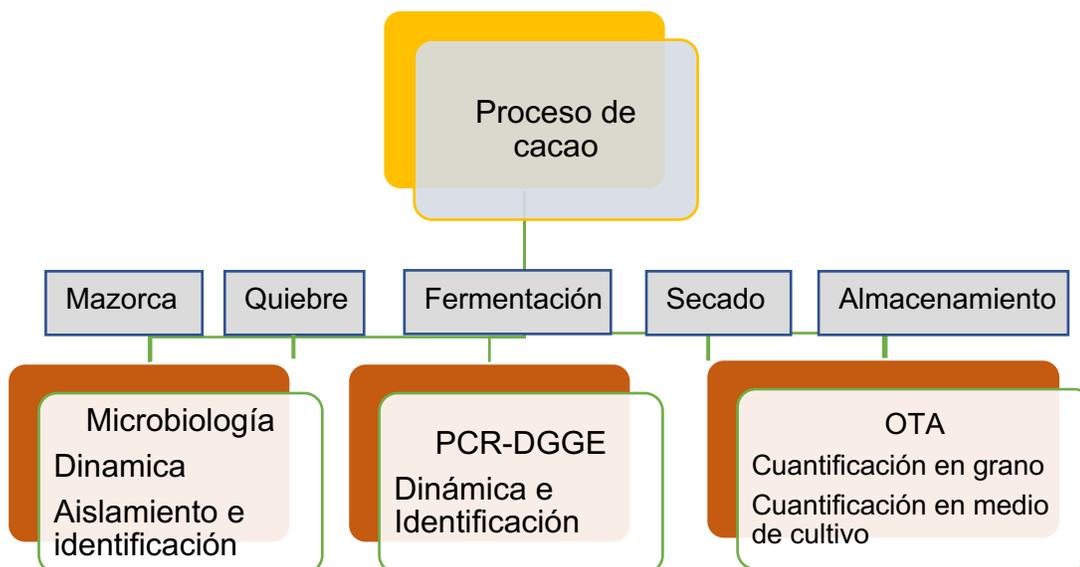


FIGURA 4. Diagrama de metodología general

6.1 Materiales

6.1.1 Material biológico

Las muestras de mazorca y granos de cacao, *Theobroma cacao*, fueron recolectadas de una cosecha en 2013 y dos cosechas en 2014 en una región productora del estado de Tabasco (México) conocida como Tulipán, en el distrito de Cunduacán a una Latitud: 18.1167 y Longitud: -93.3.

Para este estudio se eligieron dos fincas productoras de cacao de dicha región, con diferentes prácticas de manufactura y procesos post-cosecha. Las cuales llamaremos finca A y finca B.

Se tomaron muestras de mazorca y granos de cacao durante las etapas de cosecha y post-cosecha respectivamente.

MAZORCA

Dos muestras de mazorca en árbol (madura) y mazorca cosechada fueron tomadas de cada una de las fincas productoras y depositadas en bolsas herméticas estériles. Esto se realizó en condiciones asépticas.

GRANO DE CACAO

Se tomó una muestra de granos de cacao *Theobroma cacao*, de cada una de las etapas post-cosecha de las fincas seleccionadas, desde el grano natural sin fermentar hasta el almacenamiento. La recolección se realizó de forma manual y en condiciones asépticas, utilizando guantes de látex estériles, cuidando las medidas de seguridad para evitar contaminaciones de fuentes externas al proceso.

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

6.1.2 Equipo de laboratorio

HPLC-Detector fluororimétrico

Para la cuantificación de OTA se utilizó un equipo de HPLC Shimadzu LC610ADVP System (Shimadzu Corporation, Japan) con un detector de fluorescencia utilizando las siguientes condiciones: volumen de inyección: 100µL, columna C18 de ODS fase reversa (1 a 5µm) con un termostato a 35°C; como fase móvil se utilizó: acetonitrilo, agua y ácido acético glacial (48:51:1, v/v/v) (Marca Aldrich y 99.9% de pureza, grado HPLC) con un fluido isocrático de 1mL/min. La longitud de onda de excitación usada en el equipo fue de 333nm y de emisión de 460 nm. Los tiempos de retención de OTA se encontraron comprendidos entre 12.5-13.5 minutos.

6.1.3 Equipo de biología molecular

Termociclador

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

Espectrofotómetro UV-Visible

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

Cuba de electroforesis para DGGE

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

Transiluminador UV

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

6.2 MÉTODOS

6.2.1 Condiciones de cultivo y tratamientos post-cosecha aplicados en la Finca A

En la Finca A, se cultiva el cacao criollo, un clon desarrollado por los dueños de la finca, conocido como “Carmelo 1” o C1. El cuidado del cacao inicia desde el cultivo, y continúa hasta el almacenamiento. A continuación, una breve descripción de las etapas post-cosecha que acompañan esta hacienda.



FIGURA 5. Cultivo Finca A

CULTIVOS Y COSECHA

Estos cultivos reciben un control de plagas con sulfatos, antes y después de las temporadas de lluvia y constantemente se realizan inspecciones visuales para retirar las mazorcas dañadas por aves, roedores u otros animales de la región, pero principalmente por un hongo fitopatógeno (*Moniliophthora roreri*) que produce la enfermedad conocida como moniliasis. Para evitar la podredumbre de mazorcas que caen al suelo y verificar que los arbustos se encuentren saludables, los arbustos de cacao reciben mantenimiento diario.

Estos campos son irrigados artificialmente en caso de ser necesario, o por agua fluvial en temporada de lluvias.

Una vez que la mazorca alcanza su estado de madurez, es decir, cuando presenta una coloración amarilla y al golpearla suena hueca, está lista para ser cosechada.

En esta etapa inicia un filtro de selección con los criterios anteriores, donde la mazorca que presenta defectos es retirada y desechada en otro campo alejado de los cultivos de cacao.

QUIEBRE

El quiebre se realiza abriendo la mazorca con el golpe de un machete, esta actividad es realizada por los mismos trabajadores que cosechan la mazorca. Los granos son retirados de la mazorca de forma manual, y posteriormente son depositados en una superficie de madera llamada “barcaza”, la cual contiene restos de pulpa de quiebres anteriores.

Las mazorcas dañadas o contaminadas que no fueron detectadas de manera temprana durante la inspección de cultivos o la cosecha, son retiradas.

Este proceso dura un día y se realiza en las instalaciones destinadas para la fermentación, la cual se efectúa inmediatamente después del quiebre.

FERMENTACIÓN

La fermentación inició inmediatamente después del quiebre. Esta finca utiliza el método de fermentación en cajón. El cacao se deposita en cajones de madera de 1m³.

Estos cajones tienen en la base 40 orificios de 1cm de diámetro que permitirá que el mucilago degradado escurra durante la fermentación.



FIGURA 6. Fermentación Finca A

Las primeras 24 h el cacao permanece en reposo y posteriormente se remueve cada 24 horas, pasándolo de un cajón a otro, el proceso dura 5 días, al cabo de los cuales el cacao se traslada en una carretilla a las mallas de secado.

SECADO

Al finalizar la fermentación, los granos de cacao se trasladan en una carretilla con restos de pulpa de otras fermentaciones al área de secado. Esta es un área que fue especialmente diseñada para mejorar el proceso, evitando la incidencia de lluvias o brisas sobre el grano de cacao.



FIGURA 7. Secado Finca A

Las mallas donde se deposita el cacao se encuentran a 1m de altura del suelo, y están cubiertas con un cielo de plástico. En la parte inferior de la estructura (bajo las mallas), no hay cubiertas plásticas, lo que permite una ventilación regular.

En temporada de calor se registra una temperatura que oscila entre 65-73 °C y una humedad entre 75-80%, y en temporada de lluvias las temperaturas van de 27-33°C y una humedad entre 55-65%.

El secado dura entre 9 y 12 días de acuerdo a las condiciones de temperatura y humedad en el ambiente.

Una vez finalizada esta etapa, el grano de cacao se guarda en sacos para su almacenamiento.

ALMACENAMIENTO

Al finalizar la etapa de secado, el grano de cacao es almacenado en sacos de yute identificados con el nombre de la finca y se depositan sobre una tarima en un pequeño almacén oscuro. Sin embargo, no hay condiciones de limpieza que garanticen un almacenamiento adecuado.

El almacenamiento del grano de cacao dura entre 7 y 14 días máximo, ya que se procesa rápidamente para ser comercializado en forma de pasta.



FIGURA 8. Almacenamiento de granos de cacao Finca A

Dada la calidad sensorial del grano de cacao *criollo*, esta finca exporta la pasta de cacao a mercados europeos, particularmente el mercado italiano.

6.2.2 Condiciones de cultivo y tratamientos post-cosecha aplicados en la inca B

En esta finca se cultiva principalmente el cacao *forastero*, aunque también es posible encontrar otras especies o mezclas de estas. Esta finca también es parte de una asociación de productores, por lo que, al no cubrir la demanda del cliente, como ocurre a menudo, compra el cacao en baba (grano obtenido después del quiebre) de otros pequeños productores, de esta manera se obtiene volumen, pero se pierde control en el tipo de grano utilizado como materia prima.



FIGURA 9. Cultivo de cacao Finca B

Estos pequeños productores transportan el cacao en baba utilizando morrales, bolsas plásticas, cubetas, carretillas, etc.

Esto origina una mayor manipulación por los intermediarios desde la cosecha en el campo hasta el inicio de la fermentación en los cajones de madera.



FIGURA 10. Grano de cacao natural transportado por pequeños productores

FERMENTACIÓN

En la finca B la etapa de fermentación se realiza por el método de caja, dichas cajas son de madera y con características similares a la finca A, sus dimensiones son de 1m³, y con orificios en la base, los cuales generalmente están tapados por la solidificación de restos de pulpa, de tal forma que la baba escurre entre las pequeñas aberturas de las tablas. El cacao a fermentar lo aportan pequeños productores de la región, este se acumula en las cajas de fermentación en el transcurso del día, por lo que el inicio de la fermentación no es homogéneo.

El cacao reposa 24h y posteriormente se remueve de una caja a otra diariamente hasta cumplir 3 días, posteriormente se lava con agua corriente, para después proceder a la etapa de secado.



FIGURA 11. Fermentación en caja Finca B

Es importante mencionar que cuando el cliente principal de esta finca no realiza ningún pedido, ésta produce cacao con 5 días de fermentación sin lavar. Este grano es mezclado con otros para completar el pedido que en algún momento pudiera surgir. Esto se realiza de manera esporádica y su principal objetivo es evitar la etapa de lavado para reducir tiempos y costos.

SECADO

El cacao con 3 días de fermentación se lava antes de someterlo al secado. Este proceso dura 4 días independientemente del clima y consiste en un tendido al sol sobre el piso de un patio pavimentado expuesto al ambiente y al tránsito del personal que labora en la instalación.

Este se transporta en cubetas al patio de secado y se extiende con la ayuda de rastrillos. El cacao se mueve cada hora y se vuelve a “amontonar”, es decir se junta nuevamente formando líneas, para permitir que el piso se seque, posteriormente se vuelve a extender y se repite la operación en intervalos de 2 a 3 horas. Una vez seco, el cacao se almacena para su posterior comercialización.



FIGURA 12. Secado al sol en Finca B

ALMACENAMIENTO

El almacenamiento del grano de cacao se realiza después del 4 día de secado, se deposita en sacos de yute y/o rafia para su posterior comercialización.

El área destinada al almacenamiento es dentro de las instalaciones del beneficiado, sin embargo, no existe control entre los granos almacenados, su origen o el tratamiento que previamente recibieron, por lo que se pueden observar granos de diferentes coloraciones.

En ocasiones, el grano de cacao es sometido a un secado artificial en Samoa antes de ser enviado al cliente. En este proceso los granos se depositan sobre las mallas para recibir el aire caliente que retirará la humedad del grano. Esta práctica permite al proveedor presentar un grano con menor cantidad de humedad, sin embargo, no considera las afectaciones originadas al almacenar granos en condiciones de humedad y que van en detrimento de sus características sensoriales y/o de inocuidad.



FIGURA 13. Mezcla de granos de cacao de diferentes tratamientos

El almacenamiento del grano no dura más de 21 días ya que la comercialización se realiza casi inmediatamente. Esta finca adjunta a la asociación, tiene el mercado nacional como principal fuente de ingresos. El grano de cacao producido, es decir la “almendra” de cacao, es la materia prima utilizada por empresas productoras de chocolate en México.

Estas dos fincas productoras, A y B, fueron elegidas dado que presentaban diferencias desde la manipulación de los cultivos, hasta las etapas post-cosecha de fermentación, secado y almacenamiento, a pesar de pertenecer a la misma región productora en Tabasco.

6.2.3 Muestreo

Las muestras de cacao *Theobroma cacao*, fueron tomadas del centro, bordes y a diferentes profundidades de las cajas de fermentación de las fincas pertenecientes a las cosechas y las regiones anteriormente mencionadas, y consistieron en aproximadamente 300g de granos de cacao. En la siguiente tabla se detalla el plan de muestreo por finca.

TABLA 2. Plan de muestreo en Fincas A y B

| Finca A | | | | | | | 6.2.4 Aislamiento o y numeración |
|----------------|-------------------|-------------------|----------------|----------------------------|----------------------|------------------------------|---|
| Etapas | Cosecha | | Quiebre | Fermentación (días) | Secado (días) | Almacenamiento (días) | |
| Muestra | Mazorca árbol | Mazorca cosechada | Grano natural | 1 2 3 4 5 | 0 3 6 9 | 7 14 21 30 | |
| Finca B | | | | | | | |
| Etapas | Cosecha | | Quiebre | Fermentación (días) | Secado (días) | Almacenamiento (días) | |
| Muestra | Mazorca cosechada | | Grano natural | 0 1 2 3 | 0 1 2 3 4 | 7 14 21 30 | |

de hongos

Para el aislamiento e identificación de especies fúngicas asociadas a cacao, partículas de las muestras de cacao (grano y mazorca) de tamaño homogéneo de diferentes etapas en el proceso fueron estudiadas por el método de siembra directa en placas de Petri con Agar Glicerol-Dicloran 18% (DG18: Glucosa 10g, peptona 5g, KH_2PO_4 1g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g, agar 15g, glicerol 220g y 1mL etanol 0.2%, cloranfenicol 0.1g, dicloran 2mg, agua destilada QS 1L) (Hocking & Pitt, 1980), sin desinfección superficial. Las placas fueron incubadas a 25°C por 7 días, los resultados fueron expresados como un porcentaje de infección de hongos filamentosos, y como un porcentaje de infección ocratoxigénica relativa a la cuenta total de hongos. Las cepas ocratoxigénicas fueron aisladas y resembradas en Agar Extracto de Malta (MEA) e identificadas de acuerdo a las claves taxonómicas para hongos comunes en alimentos (Samson *et al.*, 2004), su identidad fue confirmada por biología molecular.

Para el caso de las mazorcas, con ayuda de un bisturí estéril se realizaron cortes de aprox. 0.5 cm x 0.5 cm x 0.2 cm de la superficie y estos fueron sembrados en las condiciones anteriormente descritas para granos de cacao.

Se depositaron 40 partículas por muestra sobre la superficie de placas con medio DG18. Este método facilita la detección de hifas que están presentes en el grano y no únicamente las esporas de su superficie.

20 cepas presuntamente toxigénicas, fueron seleccionadas por su incidencia y representatividad del proceso. Estas fueron aisladas en agar extracto de malta (MEA) a 25°C.

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

6.2.5 Aislamiento, numeración y conservación de poblaciones microbianas

Esta técnica se realizó inmediatamente después del muestreo. Para los granos de cacao, se pesaron 20 gramos y se añadieron a un matraz con 180 ml de agua peptonada 0.1% (p/v), agitando por 3 minutos manualmente, para obtener una solución homogénea.

Para el caso de las mazorcas, estas fueron enjuagadas con 40 ml de agua peptonada en una bolsa hermética estéril, durante 3 minutos. Del agua de enjuague se tomaron 20 ml y se depositaron en 180 ml de agua peptonada 0.1% (p/v) y se agitaron por 3 minutos manualmente, para obtener una solución homogénea.

Alícuotas de 1ml fueron serialmente diluidas 10 veces en agua peptonada 0.1% (p/v), 0.1ml de cada una de estas soluciones fueron sembradas por duplicado en diferentes medios selectivos a diferentes temperaturas, con la finalidad de registrar el número de unidades formadoras de colonias (UFC) de grupos específicos de microorganismos presentes en los procesos de cosecha y post-cosecha.

Los medios utilizados y las condiciones de cultivo se detallan a continuación.

Agar extracto de malta (MEA; Dibco) adicionado con 200mg/litro de cloranfenicol para levaduras, las placas se incubaron a 28°C

Medio ácido acético (MAA; Glucosa: 10 g, etanol: 5 g, ácido acético: 3 g, peptona bacteriológica: 5g, extracto de levadura: 8 g, Agar bacteriológico: 15 g y agua destilada: cbp 1 litro) adicionado con 100 mg/litro de ciclohexamida, para bacterias ácido acéticas, las placas se incubaron a 35°C.

Agar Man Rogosa-Sharpe (MRS) adicionado con 100 mg/litro de ciclohexamida para bacterias ácido lácticas, las placas se incubaron a 35°C en condiciones de anaerobiosis.

Las colonias obtenidas de cada población microbiana, fueron aisladas por el método de estría cruzada. En el caso de bacterias se les realizó tinción de Gram y fueron sometidas a la prueba de catalasa. Posteriormente fueron conservadas en tubos con los mismos medios de donde fueron aisladas, pero sin adición de antibióticos.

6.2.6 Extracción y purificación de ocratoxina A en grano de cacao

Las muestras de cacao (sin fermentar, fermentado, seco y almacenado) fueron congeladas a -80°C , posteriormente se molieron 100g con ayuda de un molino (Laboratory Mill 3600, Perten). Se tomaron 50g de muestra molida y se colocaron en una licuadora con 200ml de solvente de extracción (acetonitrilo/ H_2O , 60:40) y 4 g de NaCl, todo se licuó durante 2 min a velocidad máxima.

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

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

El fundamento de la columna de purificación se basa en el reconocimiento del antígeno en este caso ocratoxina A por los anticuerpos contenidos en la columna. La columna de inmunoafinidad (Ochraprep®, R-Biopharm, France) contiene una suspensión en gel de anticuerpos monoclonales específicos para la ocratoxina A.

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

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

eluyó una primera vez con 2ml de metanol (grado HPLC) con una velocidad de 1gota/s, después se agregó 1ml más de metanol a la misma velocidad, una vez que el último mililitro de metanol empezó a atravesar la columna se hizo un “backflash” con una jeringa, aspirando el metanol por la columna de inmovilización en sentido inverso y después se dejó pasar normalmente, hasta que terminó de caer la última gota. La solución eluída se recuperó en un vial ámbar y se secó a 70°C con una corriente de nitrógeno. El residuo se resuspendió en 1ml de la solución de fase móvil (H₂O/acetonitrilo/ácido acético, 51:48:1) en el mismo vial, finalmente se analizó por HPLC. Este método fue estandarizado por el equipo técnico del CIRAD y se basa en la técnica desarrollada anteriormente por Amézqueta *et al.*, (2005).

6.2.7 Producción de Ocratoxina A por presuntas cepas ocratoxigénicas

Las cepas seleccionadas anteriormente y provenientes de los tratamientos post-cosecha de las haciendas estudiadas, fueron propagadas en un tubo con medio MEA e incubadas a 28°C durante 7 días. Se agregaron 3 ml de agua peptonada (1% peptona/NaCl 8%) estéril al tubo y se raspó vigorosamente con un asa bacteriológica hasta observar turbidez en la solución. Se realizó un conteo de esporas de la solución en una cámara de toma.

La suspensión se ajustó a una concentración de 10⁶ esporas/ml, una alícuota de 0.1ml de esta suspensión fue depositada en el centro de una placa con MEA por duplicado para cada cepa. Las placas fueron incubadas a 28°C y al cabo de 7 días se realizó la extracción y purificación de OTA presente en el medio de cultivo, por el método de Bragulat *et al.*, (2001) y modificado por Suárez-Quiroz *et al.*, (2004).

Se tomaron 3 discos de medio de 5mm de diámetro del centro y orilla de las colonias desarrolladas sobre las cajas de Petri y se pesaron y colocaron en un vial ámbar. La OTA fue extraída con 2.5 ml de solvente (metanol/ácido fórmico, 25:1) durante 15 min en un baño ultrasónico; los extractos fueron filtrados con microfiltros Millex 25 con tamaño de poro de 0.45 µm (Agilent Technologies), los extractos fueron analizados por HPLC en las condiciones que se describen a continuación. Los resultados fueron expresados en µg de OTA / kg de medio de cultivo.

6.2.8 Análisis de ocratoxina A por HPLC: Condiciones de operación

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

6.2.9 Biología Molecular

6.2.9.1 Acondicionamiento de las muestras para extracción de ADN

Grano de cacao y mazorca

El propósito de esta técnica fue recuperar los microorganismos presentes en la superficie de las muestras de grano de cacao y mazorcas.

Se depositaron 20 g de cacao de cada muestra en un tubo falcón y se agregaron 20 ml de agua peptonada (1% peptona, 8% NaCl) para lavar la superficie de los granos. Las muestras se colocaron en una incubadora a 25°C con agitación media durante 1 hora. El agua de lavado fue recuperada para ser utilizada en un protocolo de extracción de ADN.

En el caso de la mazorca, se tomaron directamente 20 ml del agua de enjuague utilizada para el análisis microbiológico en el apartado 2.5.

Cepas de hongos toxigénicos

Las esporas y el micelio crecidos en medio MEA fueron cosechadas con un asa bacteriológica y suspendidas en agua peptonada (1% peptona, 8% NaCl) dentro de un tubo Eppendorf, para continuar con el protocolo de extracción de ADN.

6.2.9.2 Extracción de ADN de bacterias

La extracción de ADN de bacterias se basó en los métodos utilizados por (Le Nguyen *et al.*, 2008; Leesing, 2005; Omar y Ampe, 2000)

Se tomaron 2 ml de la solución de lavado de los granos de cacao y mazorca y se colocaron en un tubo Eppendorf de 2.5 ml.

Esta solución se centrifugó a 12 000 x G durante 10 min y se eliminó el sobrenadante. El pellet celular se resuspendió en 100 μ l de solución de TE (10 Mm Tris-HCl, 1Mm EDTA pH 8, promega, France) y se agitó manualmente, después se agregaron 100 μ l de lisozima (25 mg.ml⁻¹, Eurobio, France) y 50 μ l de proteinasa K (20 mg.ml⁻¹, Eurobio, France) de nuevo se agitó manualmente. Esta mezcla se incubó a 42°C durante 30 min. Después se adicionaron 50 μ l de SDS 20% (Sodio dodecil sulfato) y nuevamente se incubó a 42°C por 10 min después de una agitación manual.

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

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

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

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

Se adicionó un volumen de 500 μ l de etanol al 70% y se centrifugó a 12 000 x g durante 10 min. Finalmente se eliminó la fase acuosa y se dejó secar el pellet depositado en el fondo del tubo a temperatura ambiente (2-3h). Al finalizar esta etapa se agregaron 50 μ L de agua ultra pura (molecular) para resuspender el pellet, se dejó solubilizar durante 3 h y se conservó en el congelador a -20°C hasta su

análisis. Se verificó el ADN en gel de agarosa 0.8% y ADN leader 1Kb. El ensayo se llevó a cabo por duplicado para cada muestra.

6.2.9.3 Extracción de ADN de hongos y levaduras

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

2 ml de la solución de lavado de granos de cacao y mazorcas (o de suspensión de esporas cosechadas de medios de cultivo) fueron colocados en un tubo eppendorf de 2 ml con 0.3g de perlas de vidrio de 425-600 μm de diámetro (SIGMA). Se utilizaron dos series de tubos marcados como A y B, los cuales fueron agitados en vortex durante 30 min a velocidad máxima y centrifugados a 12000 x g, durante 15 min, el sobrenadante fue desechado y el residuo se resuspendió en 300 μL de Tampón de Lisis (2% Tritón X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA pH 8), y los tubos fueron agitados manualmente.

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

Y el protocolo continuó de manera idéntica al protocolo de extracción de ADN de bacterias descrito anteriormente.

6.2.9.4 Verificación de ADN en gel de agarosa

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

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

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

6.2.9.5 Verificación por espectrofotómetro UV-Visible

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

Para efectuar la lectura en este equipo se requieren 2µl del extracto de ADN, se debe utilizar un blanco de agua ultrapura grado biología molecular, libre de ácidos nucleicos u otros contaminantes.

6.2.9.6 Amplificación por PCR

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

Bacterias

La región V3 del ADNr 26S fue amplificada con el par de *primers* GC-338f y 518r. Este par de *primers* cubren la región polimorfa V3 entre las posiciones 338 y 518 del gen del ARN 16S del ribosoma de *E. coli* (Le Nguyen *et al.*, 2008; Leesing, 2005; Omar y Ampe, 2000). La talla esperada de los productos de PCR es de 236 pares de bases (pb).

Levaduras

La región D1/D2 del ADNr 26/28S fue amplificado utilizando los *primers*, GC-NL1f y LS2r. Este par de *primers* cubre la región polimorfa D1/D2 desde las posiciones 27 a 50 para NL1f y 266 a 285 para LS2 del gen del ARN 26S del ribosoma de

Saccharomyces cerevisiae (M19229 GenBank). Estas dan origen a un amplicón de 258 pb.

Hongos

Para los hongos, el par de *primers* utilizados para la PCR-DGGE fueron GC-U1f y U2r. El *primer* U1 corresponde de 403 a 422, y el *primer* U2 corresponde de 645 a 662 de un ADNr de referencia del gen del ARN 28S de *S. cerevisiae* (J01355 GenBank). Este par de *primers* dan un amplicón de 260 pb.

TABLA 3. Secuencia de primers utilizados para PCR-DGGE para análisis de ADN de bacterias, levaduras y hongos.

| Población | Primers | Posición | Secuencia |
|------------------|---------------------------|-----------|---|
| Bacterias | GC338f (Sigma, France) | 338-357 | 5'- CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAC TCC TAC GGG AGG CAG CAG – 3' |
| | 518r (Sigma, France) | 518-534 | 5'- ATT ACC GCG GCT GCT GG – 3' |
| Levaduras | GCNL1f (Sigma, France) | 27 – 50 | 5'- CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCC ATA TCA ATA AGC GGA GGA AAA G – 3' |
| | LS2r (Sigma, France) | 266 – 285 | 5'- ATT CCC AAA CAA CTC GAC TC – 3' |
| Hongos | GCU1f (Sigma, France) | 403 – 422 | 5'- CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GTG AAA TTG TTG AAA GGG AA – 3' |
| | U2r (Sigma, France) | 645 – 662 | 5'- GAC TCC TTG GTC CGT GTT – 3' |

TABLA 4. Secuencia de primers utilizados en PCR para cepas puras de hongos.

| Población | Primers | Secuencia |
|---------------------------------|--------------------------|--|
| Hongos (Cepas puras) | Tub F (Sigma, France) | 5'- CTC GAG CGT ATG AAC GTC TAC -3' |
| | Tub R (Sigma, France) | 5'- AAA CCC TGG AGG CAG TCG C- 3' |

Para las cepas puras de hongos se utilizaron los *primers* diseñados a partir del gen de la β -tubulina, los cuales amplifican fragmentos de ADN de 340 pb (El Khoury y Atoui, 2010).

6.2.9.7 Mezcla de reactivos para PCR

La amplificación por PCR se realizó en una placa de 96 pozos Sorenson TM (BioScience, USA). Para el ADN de bacterias, la mezcla de reactivos fue preparada como lo describió Le Nguyen *et al.*, (2008) para el ADN de levaduras la mezcla se preparó como lo describió El Sheikha *et al.* (2009), para el ADN de hongos la mezcla de reactivos fue preparada como lo describió El Sheikha y Montet (2011). Sin embargo, se modificó el mix con el propósito de mejorar la reacción. Se utilizó TopTaq en lugar de ATaq, y únicamente para el caso de hongos, se utilizó una la solución de MgCl₂.

6.2.9.8 Condiciones de PCR

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

BACTERIAS

Para el ADN de bacterias, la amplificación por PCR se realizó con una desnaturalización inicial a 94°C durante 3 min, después 10 ciclos de “touch-down” con una desnaturalización a 94°C por 30s, una hibridación a 65°C por 30 s (esta

temperatura disminuye 1°C en cada ciclo, hasta llegar a 55°C) y una elongación a 72°C durante 30 s.

TABLA 5. Mezcla de reactivos y programa para PCR de bacterias.

| Reactivos | Volumen por muestra μ l | Programa PCR |
|-------------------------------------|-----------------------------|---------------------|
| Agua pura (Eppendorf, Allemagne) | 21.75 | 1. 94°C 03:00 min |
| Primer GC 338f (Sigma, France) | 10 | 2. 94°C 00:30 seg |
| Primer 518r (Sigma, France) | 10 | 3. 65°C 00:30 seg |
| dNTPs 10Mm (Promega, France) | 1 | -1°C por ciclo |
| Buffer Top taq | 5 | 4. 72°C 10:00 min |
| Top taq polimerasa | 0.25 | 5. Ir a 2, 10 veces |
| Extracto de ADN | 2 | 6. 94°C 00:30 seg |
| | | 7. 55°C 00:30 seg |
| | | 8. 72°C 00:30 seg |
| | | 9. Ir a 6, 35 veces |
| | | 10. 72°C 10:00 min |
| | | 11. 16°C |

Después se realizan 20 ciclos que incluyen una desnaturalización a 94°C durante 30 s, una hibridación a 55°C por 30 s y una elongación a 72°C durante 3 minutos. Finalmente se realiza una elongación final a 72°C durante 10 min (Tabla 5).

LEVADURAS

La amplificación por PCR fue realizada de acuerdo a los métodos de Hesham *et al.*, (2006) y mejoradas por El Sheika *et al.*, (2011). La desnaturalización inicial se realizó a 94°C durante 3 min, seguido de 10 ciclos de “touch down” con una desnaturalización a 94°C durante 30 s, una hibridación a 62°C por 30 s (esta temperatura disminuye 1°C en cada ciclo, hasta llegar a 52°C) y una elongación a 72°C por 1 min.

Después se realizan 40 ciclos con una desnaturalización a 94°C por 30 s, una hibridación a 52°C por 30 s, una elongación a 72°C por 1min y una elongación final a 72°C por 10 min (Tabla 6).

TABLA 6. Mezcla de reactivos y programa para PCR de levadura.

| Reactivos | Volumen por muestra μ l | Programa PCR |
|--|-----------------------------|------------------------------|
| Agua pura (Eppendorf, Allemagne) | 18.75 | 1. 94°C 3 min |
| <i>Primer GC 338f</i> (Sigma, France) | 10 | 2. 94°C 30 s |
| <i>Primer 518r</i> (Sigma, France) | 10 | 3. 62°C 30 -1°C por ciclo |
| dNTPs 10Mm (Promega, France) | 1 | 4. 72°C 10 min |
| Buffer Top taq | 5 | 5. Ir a 2, 10 veces |
| Top taq polimerasa | 0.25 | 6. 94°C 30 s |
| Extracto de ADN | 5 | 7. 52°C 30 s |
| | | 8. 72°C 1 min |
| | | 9. Ir a 6, 40 veces |
| | | 10. 72°C 10 min |
| | | 11. 16°C |

HONGOS

Para el caso de ADN de hongos (Tabla 7), tanto cepas puras como extractos de ADN total de las muestras, la amplificación se llevó a cabo de acuerdo a las condiciones publicadas por El Khoury *et al.*, (2011).

Una desnaturalización inicial a 94°C durante 4 min, después 35 ciclos con una desnaturalización a 94°C por 40 s, una hibridación a 58°C durante 40 s y una elongación a 72°C por 1 min, finalizados los 35 ciclos, una elongación final durante 10 min.

TABLA 7. Mezcla de reactivos y programa para PCR de hongos.

| Reactivos | Volumen por muestra μl | Programa PCR | |
|--|-----------------------------------|--------------|----------|
| Agua pura (Eppendorf, Allemagne) | 12.75 | | |
| <i>Primer</i> GC 338f (Sigma, France) | 10 | 1. 94°C | 4 min |
| <i>Primer</i> 518r (Sigma, France) | 10 | 2. 94°C | 40 s |
| MgCl ₂ | 7 | 3. 58°C | 40 s |
| dNTPs 10Mm (Promega, France) | 3 | 4. 72°C | 1 min |
| Buffer Top taq | 5 | 5. Ir a 2, | 35 veces |
| Top taq polimerasa | 0.25 | 6. 72°C | 10 min |
| Extracto de ADN | 2 | 7. 16°C | |

6.2.10 Electroforesis en Gel de Acrilamida con Gradiente Desnaturalizante (DGGE)

Los fragmentos de ADNr amplificados por PCR fueron analizados por DGGE en un gel de acrilamida/bisacrilamida 8% (37.5/1, v/v, Promega, France) con un gradiente desnaturalizante que se extiende de 30% a 60% para el ADN de bacterias (Le Nguyen *et al.*, 2008) y levaduras (El Sheika *et al.*, 2010) (Tabla 8) y de 40% a 70% para los ADN de hongos (El Sheika y Montet, 2011) (Tabla 9).

6.2.10.1 Composición del gel DGGE

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

TABLA 8. Composición de gel para DGGE con gradiente desnaturizante de 30% a 60%

| Reactivos | Solución desnaturizante 30% (A) | Solución desnaturizante 60% (B) |
|-----------------------|--|--|
| 40% acrilamida | 20 ml | 20ml |
| Formamida | 12ml | 24ml |
| Urea | 12.6g | 25.2 |
| TAE 50X | 2ml | 2ml |
| H₂O | cbp 100 ml | cbp 100 ml |

TABLA 9. Composición de gel para DGGE con gradiente desnaturizante de 40 a 70%

| Reactivos | Solución desnaturizante 40% (A) | Solución desnaturizante 70% (B) |
|-----------------------|--|--|
| 40% acrilamida | 20 ml | 20ml |
| Formamida | 16 ml | 28ml |
| Urea | 16.8 g | 29.4 g |
| TAE 50X | 2ml | 2ml |
| H₂O | cbp 100 ml | cbp 100 ml |

6.2.10.2 Preparación del gel DGGE

Las soluciones A y B fueron preparadas en dos tubos falcon (50 ml) diferentes antes de ser depositados en el compartimento A y B (Figura 14) correspondientes a la

preparación del gradiente en un equipo (Bio-Rad Modelo 485, USA) especial para mezclar los componentes de este gel. Una vez preparadas y depositadas las soluciones en sus respectivos compartimentos, se les agregó 50 μ l de per sulfato de amonio (Promega, France) 10% (p/v) y 50 μ l de Tetrametiletilendiamina (TEMED) (Promega, France).

El gel se colocó en un espacio de 0.75mm de espesor entre dos placas de vidrio de 10 mm de ancho. Se transfirió el gel de la preparación del gradiente hasta el espacio entre las dos placas de vidrio con ayuda de una bomba Percom-I (Watson-Marlon, USA) con una velocidad de agitación ajustada a 20 rpm.

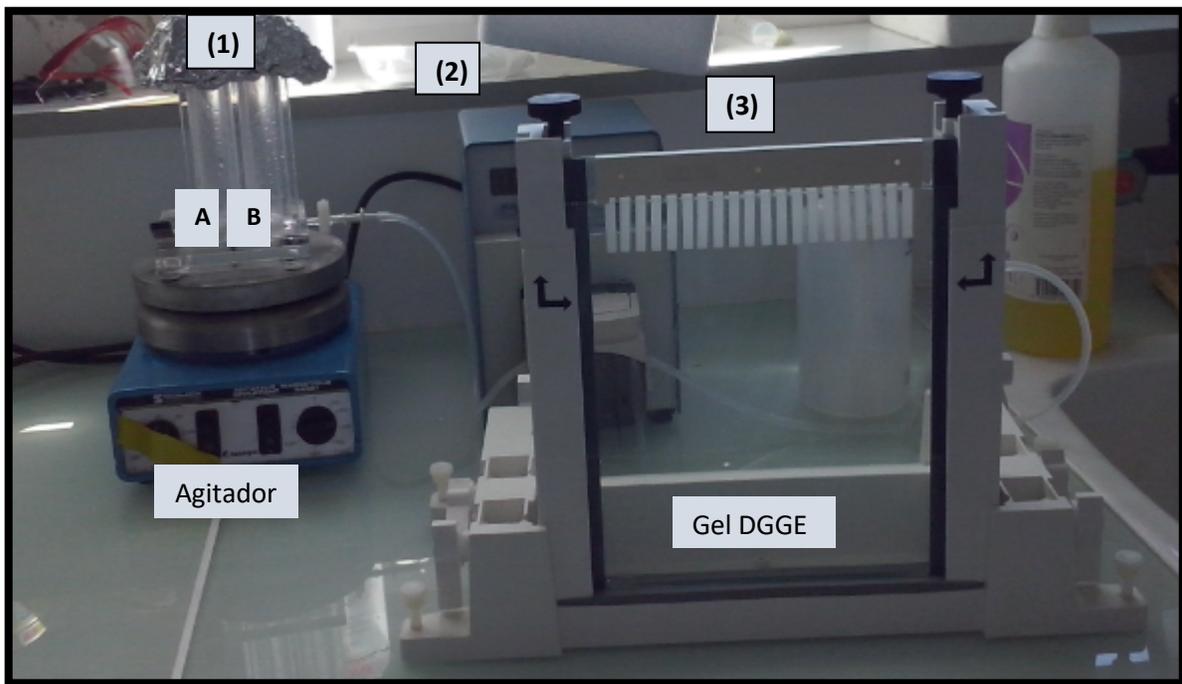


FIGURA 14. Condiciones de preparación de DGGE

(1) Fabricación del gradiente, A=Solución de alta concentración desnaturizante, 60% para el ADN de Bacterias y Levaduras o 70% para hongos. B= Solución de baja concentración desnaturizante, 30% para ADN de Bacterias y Levaduras y 40%

para ADN de Hongos. (2) Bomba peristáltica. (3) Molde (sándwich de dos placas de vidrio) y peine plástico para el gel DGGE.

Una vez que se llenó el molde, se colocó un “peine” plástico con 20 “dientes” sobre la superficie del espacio creado por las dos placas de vidrio, estos corresponden a 20 pozos, donde se depositaran las muestras a analizar. Se dejó reposar el gel una hora para una buena polimerización.

6.2.10.3 Condiciones de electroforesis de la DGGE

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

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

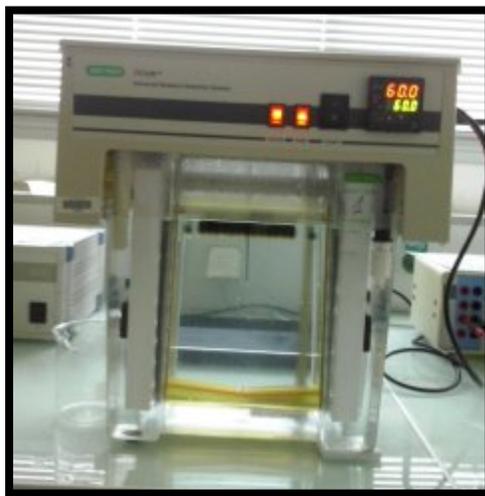


FIGURA 15. Cuba de electroforesis para DGGE

La electroforesis se realizó primero a 20V durante 10 min y después a 80V durante 12 h para el ADN de bacterias y levaduras y 16h para el ADN de hongos.

Después de la migración el gel fue retirado delicadamente de las placas de vidrio y sumergido en una solución de Bromuro de etidio (Promega, France) a 0.1 $\mu\text{l/ml}$ durante 30 min y después fue lavado con TAE 1X durante 20 min. El gel se observó inmediatamente sobre el trans-iluminador UV a 318 nm. Y fue fotografiado por una cámara digital dirigida por el programa Gel Smart 7.3.

6.2.10.4 Tratamiento estadístico de la imagen y perfiles DGGE

La imagen capturada por la cámara se guardó en formato TIFF (8 bits) en negativo, es decir, con las bandas de ADN oscuras y el fondo claro. Las imágenes fueron estudiadas por el programa ImageQuantTL® Versión 2003 (Amersham Biosciences, USA)

El análisis de estas imágenes permitió la comparación de bandas de ADN de cada población estudiada, en virtud de su posición después de la migración y con respecto a otras bandas.

La posición relativa (PR) de cada banda fue calculada de acuerdo a la fórmula:

$$PR(X) = \frac{d}{DT_e}$$

De tal forma que cada banda de ADN fue caracterizada por su posición relativa en el gel.

Los perfiles DGGE difieren en el número, la posición o intensidad de bandas presentes en cada carril (columna) correspondiente a los depósitos de productos de PCR obtenidos a partir del extracto de ADN. Por lo que para cada carril se codificó la presencia o ausencia de una banda a una posición particular, otorgando un valor de 1 (presencia) o 0 (ausencia). Esto permitió calcular el número de bandas en común entre cada muestra y construir una matriz binaria a partir de la cual se originó un dendograma (Schäfer y Muyzer, 2001; Fromin *et al.*, 2002) de acuerdo a las distancias.

Esto permitió una clasificación numérica de las muestras, utilizando el coeficiente de similitud de Dice.

El conjunto de estos análisis fue realizado, utilizando el programa Statistica versión 7.1 (StatSoft, France).

El coeficiente de similitud de Dice (Heyndrickx *et al.*, 1996) fue calculado de acuerdo a la formula siguiente:

$$S_{\text{Dice}} = (100)(2) \frac{(N_{AB})}{(N_A + N_B)}$$

Donde:

N_{AB} = Número de bandas en común entre las muestras.

N_A = Número de bandas en la muestra A

N_B = Número de bandas en la muestra B

6.2.10.5 Secuenciación de fragmentos de ADN a partir de bandas DGGE

Las bandas que presentaron mayor intensidad y repetición en el gel, fueron cortadas con un escalpelo estéril. Cada banda fue depositada en un tubo eppendorf con 100 μ l de TE y se refrigeró a 4 °C por 12 h. Las muestras de 100 μ l de ADN, fueron purificadas posteriormente.

Estas muestras de ADN fueron amplificadas por PCR en las condiciones descritas anteriormente pero utilizando primers sin GC clamps para facilitar la secuenciación. Estos amplicones fueron enviados a secuenciar a laboratorios GATC Biotec (Alemania).

Las secuencias obtenidas, fueron comparadas con las secuencias registradas en el GenBank de NCBI (Centro Nacional de información de bases de datos para Biotecnología) utilizando el programa BLAST para determinar las secuencias conocidas más próximas.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Dinámica de poblaciones microbianas y su efecto sobre la producción de ocratoxina A en granos de cacao.

En este proyecto se planteó estudiar las poblaciones microbianas del cacao y sus cambios durante los diferentes tratamientos post-cosecha de dos fincas productoras de cacao en México, durante un periodo de cosecha en 2013 y dos periodos de cosecha en 2014, utilizando herramientas de biología molecular. Y por otra parte, establecer relaciones entre estas dinámicas y la presencia de OTA en grano de cacao de dos fincas productoras, las cuales utilizan tratamientos post-cosecha diferentes.

A pesar de que la técnica PCR-DGGE ha sido utilizada con anterioridad en cacao, la información al respecto aún es escasa, en comparación a la reportada para otras matrices alimentarias. Por lo que ésta, debe ser evaluada en términos de representatividad y sensibilidad. De ahí que este estudio, haya abordado también una perspectiva microbiológica.

Lo anteriormente descrito permitió establecer una correlación entre la flora fúngica y la presencia de OTA en las muestras de cacao.

7.2 Estudio de la dinámica microbiana en mazorca y grano de cacao

La cuantificación de la flora presente en los granos de cacao y la superficie de las mazorcas de las dos fincas muestreadas en Tulipán, Tabasco, se realizó utilizando la técnica de diluciones y vaciado en placa en medios selectivos, suplementados con antibióticos, como se describió en la sección **2.5** de métodos y materiales.

7.2.1 Dinámica microbiana en el proceso de cacao de la finca A

El procesamiento de cacao, inicia con la cosecha de las mazorcas, las cuales presentan una carga microbiana aún antes de ser manipuladas y la cual incrementa

en el grano natural una vez que la mazorca es abierta y la pulpa del grano de cacao es expuesta, iniciando así, el proceso de fermentación. En la figura 16 se observan las cuentas totales de las poblaciones estudiadas a lo largo del proceso de la finca A en las cosechas de los años 2013 y 2014.

La carga inicial en la superficie de la mazorca en árbol se encontró principalmente constituida por levaduras en una concentración inicial de entre 3.3 y 5.8 Log UFC g⁻¹. Mientras que, en la mazorca cosechada, los valores van de 2.2 a 5.7 Log UFC g⁻¹. A pesar de la manipulación que presentaron las mazorcas en la recolección y transporte, los datos obtenidos de las mazorcas cosechadas, no reflejaron un aumento en la presencia de levaduras. En las BAL encontramos un valor de 0.6 Log UFC g⁻¹ en mazorca en árbol y un aumento a 5.3 Log UFC g⁻¹ en mazorca cosechada, esto puede implicar que tanto en las manos de los trabajadores que cosecharon, como en los instrumentos utilizados para la cosecha se encontraban BAL que migraron a la superficie de la mazorca. Una vez que la pulpa del grano de cacao es expuesta a las condiciones ambientales, las levaduras y las bacterias lácticas son las primeras en incidir sobre el sustrato.

Independientemente del año y la cosecha, las bacterias lácticas y acéticas fueron más dominantes (8.7-7.1 log UFC g⁻¹) durante la etapa de fermentación, lo cual coincide con lo reportado por varios autores (Ardhana y Fleet, 2003; Camu *et al.*, 2007; Moreira *et al.*, 2013).

En el caso de las levaduras (LEV), su presencia al inicio de la fermentación (5.3 – 5.8 log UFC g⁻¹) obedece a la afinidad que presentan con el sustrato rico en pectinas y el pH relativamente bajo, característicos en grano natural. Estas condiciones permiten que las levaduras lleven a cabo una fermentación alcohólica.

Por otro lado, las bacterias ácido lácticas (BAL), también presentan afinidad por los azúcares presentes en la pulpa, ya que pueden metabolizarlos ya sea por la ruta homofermentativa o heterofermentativa. Aunque se han reportado especies de BAL capaces de metabolizar el ácido cítrico presente en la pulpa (Schwan y Wheals,

2004b; Thompson *et al.*, 2001). Por lo que no es una sorpresa encontrar valores de 4.2 – 5.8 log UFC g⁻¹ desde el inicio de la fermentación.

Desde el inicio de la fermentación se observó una carga de bacterias ácido acéticas (BAA), entre 4.4 y 5.3 log UFC g⁻¹. Esto no es del todo congruente con la teoría de sucesión microbiana (Schwan y Wheals, 2004b), que sostiene que las LEV y en algunos casos las BAL, son predominantes en las primeras 12-24 h de la fermentación, cediendo el paso posteriormente a las BAA.

Las BAA, LEV y BAL, presentaron valores similares desde el inicio de la fermentación, de tal forma que no se observó una población dominante en esta etapa.

La presencia de BAA en cantidades similares a BAL y LEV en etapas tempranas de fermentación, puede ser debido a que existen BAA que son capaces de degradar azúcares y ácidos orgánicos (Drysdale y Fleet, 1998) compuestos presentes en la pulpa fresca de cacao.

Es importante destacar que LEV presentan su máximo en las primeras 24 horas, esto coincide con lo anteriormente reportado por Ardhana y Fleet, (2003) posteriormente se mantiene durante la fermentación en valores que van de 3.2 a 5.6 log UFC g⁻¹.

Por otro lado, BAL presentan su máximo valor en el día 2 de fermentación, 8.7 log UFC g⁻¹, esto coincide con lo reportado por (Ardhana y Fleet, 2003; Camu *et al.*, 2007) quienes observaron el valor máximo de BAL durante las primeras 48h de fermentación. Con respecto a las BAA su valor máximo (7.2 log UFC g⁻¹) se encontró a las 72h, esto difiere con lo reportado por Ardhana y Fleet, (2003), quienes asociaron la presencia de BAA con las primeras horas de fermentación (12-36 h).

Dicho comportamiento y diferencias, pueden deberse al origen de los granos estudiados en estas publicaciones, ya que este factor determina las características bioquímicas del grano y la composición de la pulpa, es decir el sustrato. Por otro lado, el factor genético también ejerce un papel importante en la calidad del sustrato y por lo tanto en la presencia y desarrollo de microorganismos.

Esto coincide con un estudio que realizó Moreira *et al.*, (2013), durante la fermentación de tres híbridos de cacao y de origen brasileño, ellos encontraron que las diferencias en la composición de la pulpa del grano de cacao en los tres híbridos originó una dinámica microbiana diferente entre estos.

Por otro lado, los tratamientos post-cosecha a los que son sometidos, no suelen ser exactamente iguales entre las fincas de diferentes países. Y en vista de que Ardhana y Fleet, (2003) trabajaron en fermentaciones de cacao en Indonesia, Camu *et al.*, (2007) con fermentaciones de cacao en Ghana y este proyecto se desarrolló en fermentaciones de cacao en México, las diferencias anteriormente descritas, eran esperadas.

Posterior a la etapa fermentativa, se observó un descenso en los valores de BAL y BAA, esto puede obedecer a la falta de sustrato y la disponibilidad de oxígeno. Estos factores aumentan considerablemente al final de la fermentación, punto particularmente limitante para el caso de BAL que en su mayoría son anaerobias obligadas.

Con respecto a LEV, se observa que estas se mantienen presentes a lo largo de las etapas de secado y almacenamiento con valores entre 1.4 y 6.5 log UFC g⁻¹, su presencia seguramente se debe a las condiciones de aerobiosis durante estos periodos y los restos de mucilago adherido al grano de cacao y que representa un sustrato al que las LEV pueden adaptarse fácilmente.

7.2.2 Dinámica microbiana en el proceso de cacao de la finca B

La carga inicial contenida en la mazorca en árbol de la finca B, estuvo principalmente representada por LEV, con valores de 2.2 a 5.2 log UFC g⁻¹ (Figura 17), menores a los encontrados en la finca A.

Esto puede explicarse por la composición del grano, ya que el grano de la finca A es un cacao criollo rico en azúcares y otros nutrientes, mientras que el grano de la finca B es un grano de diversas plantaciones cuya calidad se está en función de su origen, el cual es desconocido.

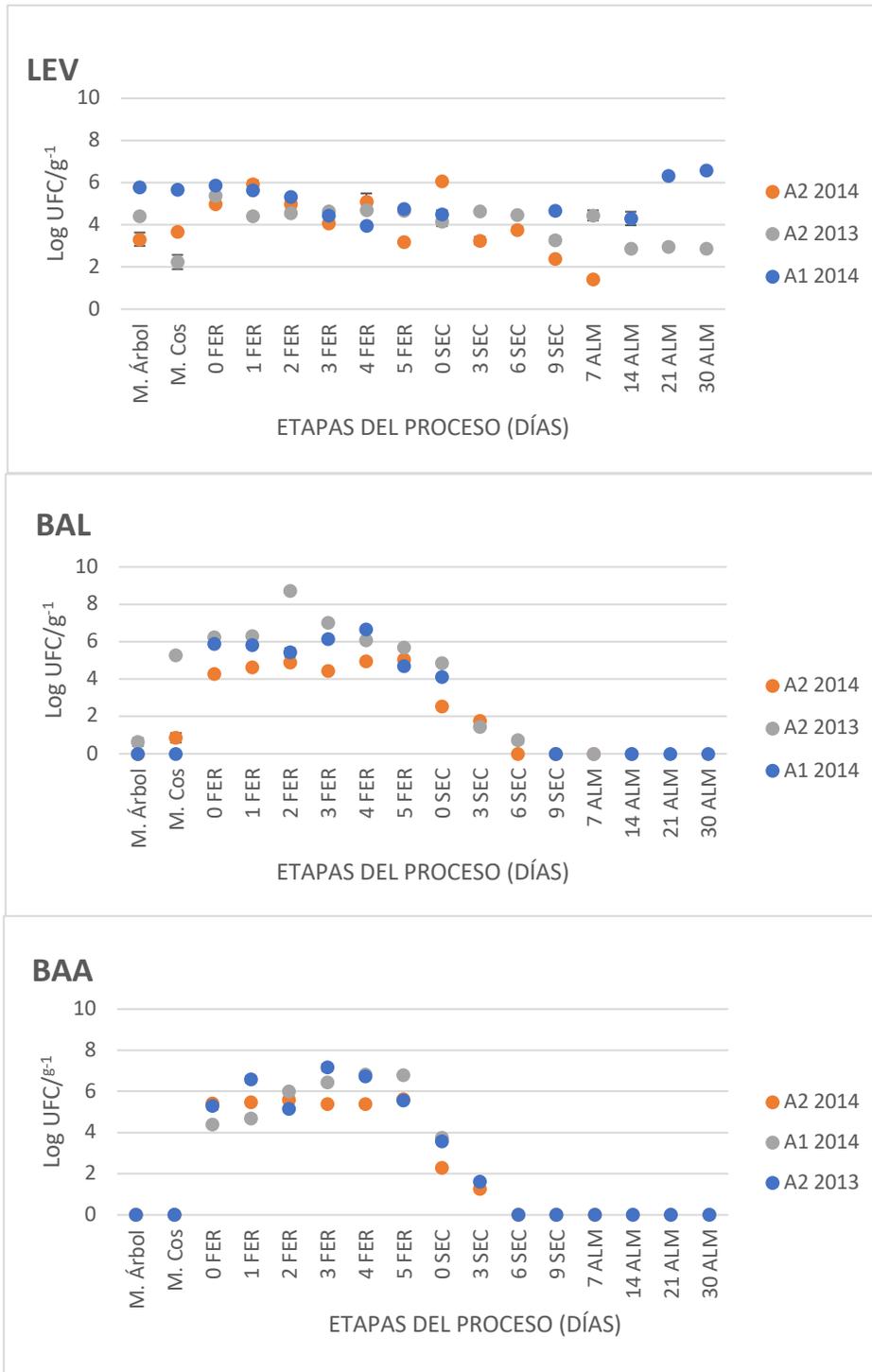


FIGURA 17. Dinámica de levaduras (LEV), Bacterias Lácticas (BAL) y Acetobacterias (BAA) en Finca B durante 2013 y 2014.

En este proceso se encontró que LEV presentó dos puntos máximos en el proceso, el primero fue detectado al inicio de la fermentación ($6.7 \log \text{ UFC g}^{-1}$). Esto puede deberse a la amplia manipulación que recibe el grano después del quiebre y la cual se traduce en una transferencia de cargas microbianas al grano, ya que este grano natural (en baba) es obtenido de mazorcas que fueron abiertas horas antes de que el grano sea depositado en las cajas de fermentación, adicional a esto es transportado sin refrigeración ni controles sanitarios a la finca que va a procesarlo. Este valor desciende durante la fermentación y al inicio del secado, debido posiblemente al lavado que se realiza antes de tender el grano en el suelo para secarlo. Sin embargo, al día 4 de secado se observa otro incremento ($6.2 \log \text{ UFC g}^{-1}$), esto pudiera deberse a la presencia de restos de mucílago en el suelo donde se realiza el secado y donde pueden proliferar diversas levaduras.

De manera general todas las poblaciones presentaron un decremento muy marcado al inicio del secado, esto puede atribuirse al lavado que se le realiza al grano antes de secarlo al sol. Este lavado parece eliminar la carga microbiana de BAL y BAA en las siguientes etapas.

En ambas fincas, las levaduras continúan presentes durante las etapas de secado y almacenamiento.

7.2.3 Efecto del periodo de cosecha y de las prácticas post-cosecha sobre las poblaciones microbianas

Levaduras (LEV)

Las LEV fueron la única población que estuvo presente desde la superficie de la mazorca y se mantuvo hasta la etapa de almacenamiento. En el caso de la finca B, el lavado posterior a la fermentación, tuvo un efecto negativo en la presencia de LEV, reduciendo los valores a $1.7\text{-}3.4 \log \text{ UFC g}^{-1}$ al inicio del secado.

En el caso de la cosecha 2013 de la finca B, se observó que tras la reducción al inicio del secado a $2.3 \log \text{ UFC g}^{-1}$, hubo un incremento a $6.3 \log \text{ UFC g}^{-1}$ en el 4º día de secado y posteriormente este valor decrece en la etapa siguiente pero no desaparece. Este comportamiento no fue observado en las cosechas de la finca B estudiadas en 2014, esto puede deberse a la amplia recepción de materia prima de diversos orígenes y la falta de control en este punto.

Este estudio es microbiológico, el hecho de encontrar estos valores, no implica que hay una amplia variedad de microorganismos. De hecho, puede ser un solo microorganismo o 2 que se encuentran adaptados a todos los cambios que se presentan a lo largo del proceso. Sin embargo, el estudio microbiológico no permite definir cuántos y cuáles.

Con respecto a la finca A, los comportamientos de las cosechas estudiadas fueron similares entre sí, esto refleja por un lado el control que existe durante todo el proceso, de tal forma que la población de LEV presenta el mismo comportamiento independientemente del año y la temporada de la cosecha. A diferencia de la finca B, se observa que al prolongarse el almacenamiento esta población continúa incrementando.

BACTERIAS ACIDO LÁCTICAS (BAL)

Para el caso de BAL, los comportamientos fueron similares en las cosechas, mostrando algunas diferencias entre los años 2013 y 2014.

En la finca B la disminución de la carga de BAL inicia durante las primeras 24 h de la etapa de secado en la cosecha 2014, mientras que en 2013 esta disminución se observó a las 48 h. Esto puede deberse a la presencia de alguna o algunas BAL que son capaces de sobrevivir aún 48 h después de iniciar la etapa de secado. Desafortunadamente con la técnica de microbiología tradicional no es posible definir si es una sola la especie que es capaz de sobrevivir las condiciones de secado a las 48, o si son varias especies las que se encuentran presentes durante esta etapa.

Con respecto a las cosechas estudiadas en 2014 en la finca B, los comportamientos de BAL durante el proceso son similares.

La población de BAL en la finca A presentó valores muy cercanos entre si durante los años estudiados, con una tendencia a aumentar durante la fermentación para después desaparecer durante los últimos días de secado. Aunque, cabe mencionar que en la cosecha estudiada del 2013 se presentó la cuenta más elevada (8.71 log UFC g⁻¹) en el 2º día de fermentación. En las cosechas del 2014, las cuentas más elevadas se observaron en el 4º y 5º día de fermentación. Es posible que las diferencias en la composición del grano entre el día 2 de fermentación y los últimos días de esta etapa, determinen o influyan considerablemente en la presencia y/o ausencia de ciertas especies y su abundancia, esto explicaría estas diferencias.

Lo anteriormente descrito, conduce a la idea de que las cosechas estudiadas durante el mismo año no presentan una marcada variabilidad en el número de microorganismos presentes en los procesos estudiados. Sin embargo, si se observan diferencias entre las cosechas de años diferentes.

ACETOBACTERIAS (BAA)

Los comportamientos observados entre cosechas y años, fueron similares en ambas fincas. Su presencia se encuentra desde el grano sin fermentar y se desarrolla durante la etapa de la fermentación para finalmente desaparecer a inicios de la etapa de secado.

Si bien los comportamientos fueron similares entre años y entre fincas, se observaron pequeñas diferencias entre los diferentes puntos estudiados de la etapa fermentativa. Estas pequeñas variaciones, pueden deberse a posibles cambios en la composición del grano, es decir el sustrato de las poblaciones microbianas. Particularmente la cantidad de alcohol disponible durante la etapa fermentativa, debido al consumo de azúcares fermentables por LEV (Schwan y Wheals, 2004a) por lo que las BAA tuvieron disponible este sustrato durante esta etapa gracias a la actividad de LEV, las cuales al parecer produjeron suficiente alcohol para las BAA y . En la finca A se observa la presencia de BAA durante los primeros 3 días de secado, mientras que en la finca B estas se observan solo durante el primer día de secado. Esto puede ser atribuido al hecho de que en la finca B se realiza un lavado al grano

fermentado, antes de tenderlo al sol para secarlo. Esta actividad elimina no solo el mucilago de las paredes del grano, sino también los residuos de alcohol producido por LEV, ocasionando que las BAA pierdan su principal sustrato disponible y por lo tanto desaparezcan más rápido que en el caso de la finca A.

7.3 Incidencia de hongos filamentosos y ocratoxigénicos sobre mazorcas y grano de cacao.

Se estudió la presencia de hongos toxigénicos y no toxigénicos, presentes en la superficie de las muestras de mazorcas en árbol y cosechadas, y de granos de cacao de las etapas post-cosecha de cada hacienda. Se depositaron partículas de tamaño homogéneo sobre placas con medio de cultivo DG18y se incubaron a 25-28°C y se observó su evolución durante 5 días.

Durante la cosecha estudiada en 2013, ambas fincas presentaron altos porcentajes de infección total en grano natural, es decir sin fermentar (Tabla 10). Sin embargo, al transcurrir la fermentación, estos valores disminuyeron, probablemente a causa de la actividad microbiana que se desarrolló en esta etapa.

Un comportamiento similar fue observado durante el año 2014 en las cosechas estudiadas. Esto ratifica la teoría de la competitividad microbiana la cual genera metabolitos capaces de inhibir el crecimiento de hongos toxigénicos.

TABLA 10 . Infección por hongos filamentosos y ocratoxigénicos en mazorca y granos de cacao en diferentes etapas del proceso de la cosecha en las fincas A y B en 2013.

| Finca | Mazorca | | Grano natural (Fresco) | | Fermentación | | Secado | | Almacenamiento | |
|----------|---------|--------|------------------------|-----------|--------------|-----------|--------|-----------|----------------|-------------|
| | IT (%) | IO (%) | IT (%) | IO (%) | IT (%) | IO (%) | IT (%) | IO (%) | IT (%) | IO (%) |
| A | 100 | 0-2 | 91 | 0.3-3.9 | 28.1 | 2.0 – 45 | 92.2 | 68.8 – 88 | 98.4 | 68.0 - 72.5 |
| B | 100 | 0 | 51.7 | 0.1- 36.1 | 22.8 | 1.2 - 5.5 | 17.1 | 0 - 15.3 | 86.7 | 24.0 – 50 |

IT: Infección por hongos filamentosos , **IO:** Infección por hongos ocratoxigénicos

Específicamente la posible presencia de especies de BAL, tales como, *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus brevis* durante la fermentación de cacao (Camu *et al.*, 2007), pueden inhibir el desarrollo de hongos como especies antifúngicas (Champion Martínez, 2008), ya sea por competición por nutrientes, o por la producción de metabolitos tales como, ácido propiónico, peróxido de hidrógeno y diacetil (Lindgren y Dobrogosv, 1990), los cuales han sido reportados como compuestos antifúngicos.

En 2013, al final de la fermentación en la finca A se observa un porcentaje de infección elevado (45%), esto puede deberse a que aún hay mucílago sin degradar, el cual actúa como sustrato para especies fúngicas, este valor incrementa en las etapas de secado y almacenamiento. Esto coincide con lo observado por Mounjouenpou *et al.*, (2008), quien reporta un incremento en hongos filamentosos después de la fermentación. Este valor continúa incrementando en las etapas de secado y almacenamiento.

En 2014 esta situación se repite en la finca A1 (Tabla 11), aunque el rango de valores de 5- 80%, no incrementa, sino que disminuye en la etapa de secado 12.5- 57.5%. En el caso de la Finca A2 el rango máximo de infección encontrado fue de 5- 32% y a diferencia de la finca A1, el valor incrementó en la etapa del secado 12.5- 90%. Esto implica que las infecciones por especies ocratoxigénicas varían de acuerdo a los años y las cosechas, esto coincide con lo reportado por Gilmour y Lindblom, (2005).

Con respecto a la Finca B los porcentajes de infección durante la fermentación, secado y almacenamiento fueron menores que en la Finca A, es posible que la etapa de lavado previa a la etapa de secado, genere una reducción en la carga de hongos, adicionalmente, este lavado también retira restos de mucílago adherido a la superficie de los granos, disminuyendo así el sustrato disponible.

TABLA 11. Infección por hongos filamentosos y ocratoxigénicos en mazorca y granos de cacao en diferentes etapas del proceso de las cosechas en las fincas A y B en 2014.

| Finca | Mazorca | | Grano natural (Fresco) | | Fermentación | | Secado | | Almacenamiento | |
|-----------|-----------|-----------|---------------------------|------------|--------------|------------|-----------|-------------|----------------|-----------|
| | IT (%) | IO (%) | IT (%) | IO | IT (%) | IO (%) | IT (%) | IO (%) | IT (%) | IO (%) |
| A1 | 100 | 2-12 | 67 | 0 - 8 | 37.4 | 5 - 80 | 88.5 | 12.5 - 57.5 | 100 | 47.5 - 90 |
| A2 | 100 | 32 - 55 | 45 | 0 - 5 | 32.8 | 5 - 32 | 94.8 | 12.5 - 90 | 94 | 0 - 50 |
| B1 | 100 | 12-77.5 | 63.5 | 7.5 - 77.5 | 37.3 | 2.5 - 32.5 | 20.8 | 2.5 - 30 | 77 | 43 - 75 |
| B2 | 100 | 10 - 9.8 | 65 | 0 - 9.8 | 14 | 0 - 27.8 | 10 | 15 - 50 | 100 | 0 - 10 |

IT: Infección por hongos filamentosos **IO:** Infección por hongos ocratoxigénicos

Las cajas Petri, en donde se depositaron las muestras para determinar el porcentaje de infección de cada etapa estudiada, muestran de manera visual el efecto de cada etapa post-cosecha sobre la infección total de especies fúngicas y sobre la infección de especies ocratoxigénicas.

Se observa una contaminación primaria en la superficie de las mazorcas en ambas fincas, posteriormente en el grano natural, el cual es estéril por naturaleza al ser removido de la mazorca, no se observa una gran contaminación en la finca A, en la finca B, por el contrario, se observa una fuerte contaminación por especies de *Aspergillus* de la sección *Nigri*. Esto puede deberse a la amplia manipulación del grano natural antes de colocarlo en las cajas de fermentación. Sin embargo, ambas fincas muestran que la contaminación por hongos filamentosos se ve restringida

durante la fermentación, pero al final de esta etapa la contaminación se presenta nuevamente.

En la finca B (Figura 18) esta contaminación se ve reducida al inicio del secado, debido al lavado que se aplica al grano al finalizar la fermentación. Por lo que se observa una menor contaminación en las cajas con las muestras de secado y almacenamiento en comparación con la finca A (Figura 19).

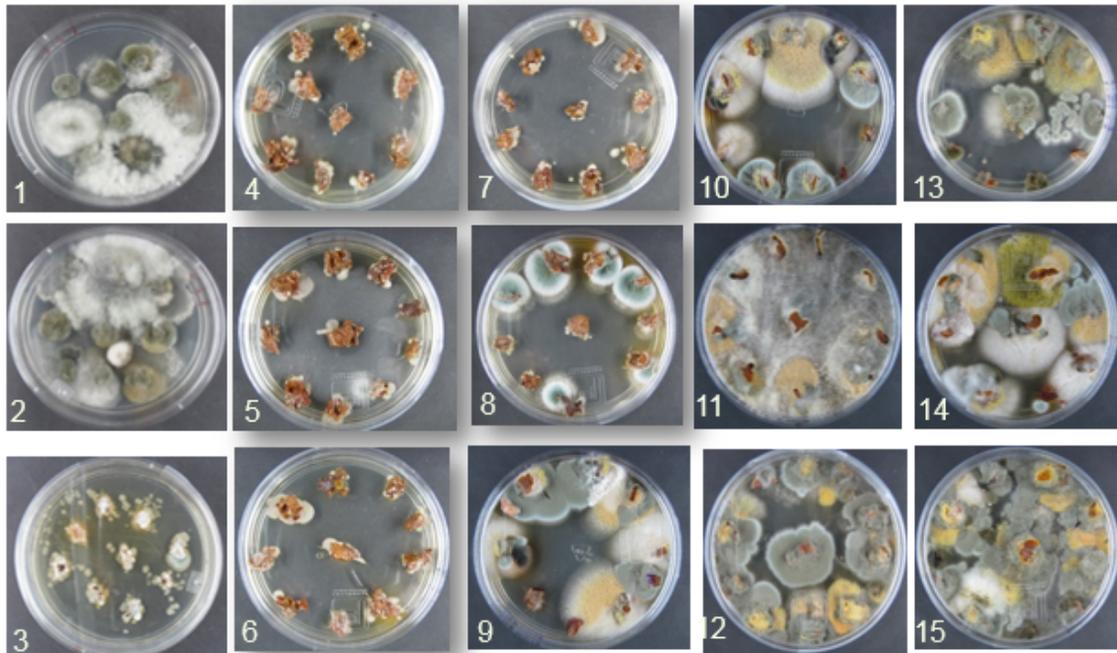


FIGURA 18. Infección por hongos en Finca A: 1) Árbol 2) Cosecha 3) Grano Natural 4) Fer 1d 5) Fer 2d 6) Fer 3d 7) Fer 4d 8) Fer 5d 9) Sec 0d 10) Sec 3d 11) Sec 6d 12) Sec 9d 13) Alm 7d 14) Alm 21d 15) Alm 30d.

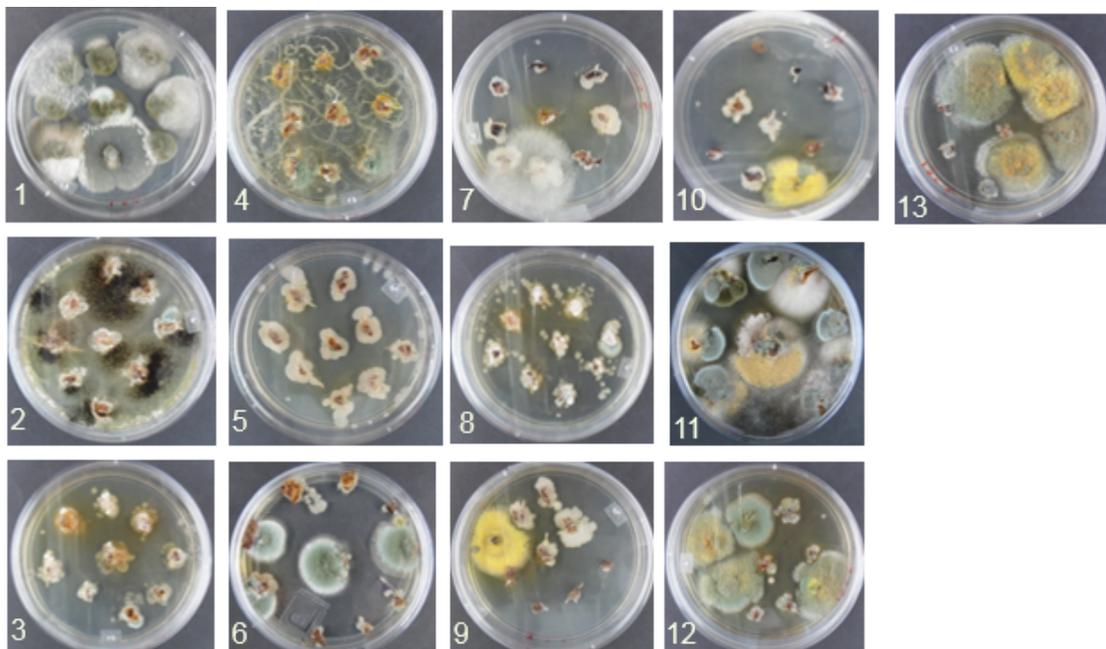


FIGURA 19. Infección por hongos en Finca B: 1) Árbol 2) Grano natural 3) Fer 0d 4) Fer 1d 5) Fer 2d 6) Fer 3d 7) Sec 0d 8) Sec 1d 9) Sec 2d 10) Sec 3d 11) Sec 4d 12) Alm 7d 13) Alm 30d.

7.4 Caracterización molecular de hongos toxigénicos y su habilidad productora de OTA.

A partir de las placas con medio DG18, utilizadas para calcular los porcentajes de infección, se realizó el aislamiento de hongos toxigénicos por inspección visual de acuerdo a las claves taxónomicas de Samson (1992) y Pitt (2000).

Los aislamientos se realizaron por punción en MEA, ya que es un medio que permite el óptimo desarrollo de hongos filamentosos. Las condiciones de cultivo fueron las mismas que para el primer aislamiento en DG18.

Uno de los principales objetivos de este estudio fue aislar hongos productores de OTA e identificarlos a nivel especie. En 2013, se aislaron 71 cepas de hongos, de los cuales 20 fueron seleccionados como representativos del proceso completo. Estos fueron identificados a nivel molecular por secuenciación del gen de β -tubulina y su habilidad productora de OTA fue evaluada en medio MEA. Los resultados fueron expresados en $\mu\text{g}/\text{kg}$ de medio. La tabla 12 muestra los resultados de la identificación molecular y la habilidad de cada cepa para producir OTA en MEA.

En la finca A se observó una gran diversidad de especies ocratoxigénicas, tales como *Aspergillus ochraceus*, *A. westerdijkiae*, *A. steynii*, *A.chevalieri*, *A. wentii*, *A. giganteus* y *A. tamarii*. Pero solo *Aspergillus westerdijkiae* (417.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$) y *A. steynii* (1482.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$) fueron altamente productores de OTA. *A. steynii* mostró ser la principal cepa productora de OTA, del genero *Aspergillus*. Un estudio previo mostró que algunos aislados de *Aspergillus ochraceus*, considerado por varios años como el principal productor de OTA en varias matrices alimentarias (Bellí *et al.*, 2004; Suárez-Quiroz *et al.*, 2004; Taniwaki *et al.*, 2003), realmente correspondían a *A. westerdijkiae* (Marino *et al.*, 2009). Actualmente *A. westerdijkiae* es considerada la principal especie productora de OTA en zonas tropicales. Sin embargo, un estudio realizado por Gil-Serna *et al.*, (2011), mostró que mientras *A. westerdijkiae* tiene una

alta capacidad de producción de OTA, *A. steynii* (Frisvad y Frank, 2004) es la especie que debe ser considerada como el principal riesgo de contaminación. Aunque el resto de especies productoras de OTA, pertenecientes a esta sección, no deben ser ignoradas.

En la finca B, solo 2 especies con habilidad productora de OTA fueron identificadas; *A. chevalieri* (13.8 µg/kg) y *A. carbonarius* (14307.5 µg/kg). La principal especie productora de OTA en el año 2013, fue *A. carbonarius* aislada del grano de cacao fresco (sin fermentar), la cual puede crecer y producir OTA en un amplio rango de A_w , a bajas o altas temperaturas (Esteban *et al.*, 2006). La presencia de *A. carbonarius* como la principal productora de OTA y la ausencia de otras especies en grano natural, puede deberse a sus esporas negras, las cuales proveen protección a la luz solar y los rayos UV, otorgándole una ventaja competitiva sobre otras especies (Pitt y Hocking, 1997). Esto respalda la importancia de *A. carbonarius* como la principal fuente de OTA en grano de cacao y coincide con el estudio realizado por Mounjouenpou *et al.*, (2008), el cual asocia la presencia de granos sin fermentar con mazorcas dañadas y un almacenamiento de mazorcas por un periodo prolongado antes del quiebre, condiciones características de la finca B. *Aspergillus carbonarius* ha sido también reportado como la principal fuente de OTA en uvas y sus derivados (Abarca *et al.*, 2003) y café robusta (Joosten *et al.*, 2001).

Un total de 7 cepas del genero *Penicillium* fueron aisladas en este estudio, 3 de ellas fueron aisladas de la superficie del grano de cacao durante el secado y almacenamiento, mostrando habilidades similiares para producir OTA (12.9, 12.7 y 11.2 µg/kg), así como sus características moleculares (porcentaje de identidad en comparación de secuencias de ADN). Esto implica la posibilidad de que estas pertenecen a la misma especie, la cual migro del secado al almacenamiento. Otra cepa con un nivel de OTA similar, fue *P. herquei* (11.3 µg/kg), aislada del grano de cacao fresco. Una cuarta cepa de *Penicillium sp.*, aislada de la superficie de la mazorca cosechada, mostró ser la principal productora de OTA (8495.2 µg/kg) de este género.

TABLA 12. Caracterización molecular de cepas puras de hongos presumibles toxigénicos y su capacidad productora de OTA en MEA (2013)

| Finca | Etapas del proceso | Identificación | % ID | OTA (µg/kg) |
|-------|--------------------|----------------------------------|------|----------------|
| A | Secado | <i>A. flavus</i> | 99 | 1.1 |
| B | Grano natural | <i>A. carbonarius</i> | 99 | 14307.5 |
| A | Secado | <i>A. ochraceus</i> | 99 | 2.1 |
| A | Almacenamiento | <i>A. chevalieri</i> | 100 | 12.1 |
| A | Mazorca cosechada | <i>Penicillium sp.</i> | 90 | 8495.2 |
| A | Secado | <i>A. westerdijkiae</i> | 100 | 47.4 |
| A | Secado | <i>A. steynii</i> | 99 | 1482.2 |
| A | Almacenamiento | <i>Cladosporium halotolerans</i> | 100 | ND |
| A | Almacenamiento | <i>A. wentii</i> | 99 | ND |
| B | Secado | <i>A. chevalieri</i> | 100 | 13.8 |
| A | Almacenamiento | <i>Penicillium sp.</i> | 99 | 12.9 |
| A | Secado | <i>Penicillium sp.</i> | 99 | 12.7 |
| A | Grano natural | <i>P. herquei</i> | 93 | 11.3 |
| A | Mazorca cosechada | <i>P. lividum</i> | 97 | 6364.3 |
| A | Almacenamiento | <i>P. sizovae</i> | 94 | 5933.4 |
| A | Grano natural | <i>A. giganteus</i> | 99 | 3.4 |
| A | Secado | <i>A. ibericus</i> | 94 | 1.5 |
| A | Secado | <i>Penicillium sp.</i> | 99 | 11.2 |
| A | Almacenamiento | <i>A. tamarii</i> | 99 | 0.6 |
| A | Almacenamiento | <i>A. niger</i> | 98 | ND |

ND: No detectable

Sin embargo, el porcentaje de identidad obtenido por la BLAST fue relativamente baja (90%) en comparación con otras cepas identificadas. *Penicillium lividum* y *P. sizovae* también mostraron una alta capacidad para producir OTA (6364.3 y 5933.4 µg/kg). Sin embargo, de acuerdo a Frisvad *et al.*, (2006) las únicas especies productoras del género *Penicillium* corresponden a *P. verrucosum* y *P. nordicum*. Por lo tanto, sería conveniente confirmar estos resultados utilizando *primers* específicos para estas especies, o alguna otra herramienta molecular para evitar cualquier duda.

Por otro lado, la identificación de estos hongos de acuerdo a las claves taxonómicas para hongos (Samson *et al.*, 2004) corresponde al género *Penicillium*. Esta es la primera vez que especies de *Penicillium* altamente productoras de OTA son aisladas durante el procesamiento de cacao.

En 2014, 59 hongos filamentosos fueron aislados de granos de cacao y mazorcas, de los cuales 4 fueron seleccionados por su frecuencia en el proceso y 35 como posibles ocratoxigénicos, de acuerdo a las claves taxonómicas. Del total, 38 especies fueron identificadas por secuenciación de la región ITS y solo una por 28s. La habilidad para producir OTA fue probada en medio MEA. Los resultados fueron expresados en $\mu\text{g}/\text{kg}$ de medio. La Tabla 13 muestra los resultados de la identificación molecular y la habilidad de cada cepa para producir OTA.

En la finca A, 2 especies del género *Penicillium* presentaron una baja producción de OTA ($\text{ND}-5.78 \mu\text{g}/\text{kg}$). *Penicillium paneum* fue encontrado en grano natural (sin fermentar) en enero y junio. Se observó que existe una migración de la etapa de grano natural a la etapa de fermentación. Esto coincide con Copetti *et al.*, (2011) quienes encontraron *P. paneum* en granos de cacao fermentados de Brasil. Ellos también reportaron esta especie como tolerante al ácido acético, lo que le proporciona una ventaja sobre otros hongos en la fermentación. Se observó otra migración de la superficie de la mazorca en árbol hasta el grano fermentado, por parte de *Penicillium citrinum*. Esto demuestra que desde la mazorca en árbol existe una contaminación primaria. Esta especie no se observó en la finca B. En 2003, Ardhana y Fleet reportaron la presencia de esta especie en granos fermentados de Indonesia, así como su importancia como hongo fuertemente pectolítico, el cual puede contribuir a la degradación de la pectina en pulpa. Ellos también reportaron a *P. citrinum* como productor de enzimas proteolíticas las cuales pueden influenciar la composición de proteínas en grano y pulpa. Especies del género *Aspergillus* tales como *A. clavatus*, *A. niger*, *A. tamarii*, *A. aculeatus* y *A. ochraceus* fueron observados en el proceso de la finca A, mostrando una baja producción de OTA ($0.07- 3.79 \mu\text{g}/\text{kg}$). Además, *Aspergillus giganteus* fue encontrada en granos fermentados de la finca A en junio. Esta especie ha sido reportada como productora

de una proteína básica de bajo peso molecular conocida como Proteína antifúngica AFP.

TABLA 13. Caracterización molecular de cepas puras de hongos presumibles toxigénicos y su capacidad productora de OTA en MEA (2014)

| Finca | Etapas del proceso | Identificación | % ID | OTA (µg/kg) |
|-------|--------------------|----------------------------|------|----------------|
| B 1 | Grano natural | <i>Rhizopus stolonifer</i> | 99 | 0.4 |
| A 2 | Mazorca en árbol | <i>A. niger</i> | 100 | 0.07 |
| B 1 | Fermentación | <i>A. wentii</i> | 100 | 0.12 |
| A 2 | Mazorca en árbol | <i>A. tubingensis</i> | 100 | 0.33 |
| B 1 | Fermentación | <i>A. tubingensis</i> | 100 | 0.13 |
| A 2 | Mazorca en árbol | <i>A. aculeatus</i> | 99 | 0.20 |
| A 1 | Almacenamiento | <i>A. ochraceus</i> | 99 | 0.56 |
| B 1 | Grano natural | <i>A. aculeatus</i> | 99 | 1.42 |
| B 1 | Almacenamiento | <i>A. niger</i> | 100 | 0.93 |
| A 1 | Almacenamiento | <i>A. aculeatus</i> | 100 | 0.89 |
| B 1 | Almacenamiento | <i>A. tubingensis</i> | 100 | 0.20 |
| B 1 | Almacenamiento | <i>A. aculeatus</i> | 100 | 0.12 |
| B 1 | Almacenamiento | <i>A. aculeatus</i> | 99 | 0.19 |
| A 1 | Secado | <i>A. tamarii</i> | 99 | 0.06 |
| A 1 | Almacenamiento | <i>A. Steynii</i> | 99 | 5141.05 |
| A 1 | Almacenamiento | <i>A. ochraceus</i> | 100 | 1.19 |
| B 1 | Almacenamiento | <i>A. carbonarius</i> | 99 | 0.05 |
| A 1 | Secado | <i>A. niger</i> | 100 | 3.79 |
| A 1 | Secado | <i>A. tamarii</i> | 100 | 0.07 |
| A 1 | Secado | <i>A. clavatus</i> | 99 | 2.60 |
| B1 | Mazorca en árbol | <i>A. caelatus</i> | 99 | 0.15 |
| A 1 | Almacenamiento | <i>A. ochraceus</i> | 100 | 1.20 |
| A 1 | Mazorca cosechada | <i>A. flavus</i> | 99 | 0.12 |
| A 1 | Fermentación | <i>P. citrinum</i> | 100 | ND |
| A 1 | Mazorca en árbol | <i>P. citrinum</i> | 100 | ND |
| A 2 | Mazorca en árbol | <i>A. aculeatus</i> | 99 | 0.44 |
| A 2 | Fermentación | <i>P. citrinum</i> | 100 | ND |
| A 2 | Fermentación | <i>A. giganteus</i> | 99 | 0.22 |
| A 2 | Fermentación | <i>P. paneum</i> | 99 | 3.50 |
| A 2 | Fermentación | <i>P. paneum</i> | 99 | 5.78 |
| B 2 | Fermentación | <i>P. paneum</i> | 99 | 0.32 |
| B 2 | Grano natural | <i>A. niger</i> | 100 | 0.14 |
| B 2 | Grano natural | <i>A. tubingensis</i> | 100 | 0.31 |
| B 2 | Grano natural | <i>P. griseofulvum</i> | 99 | ND |
| B | Mazorca en árbol | <i>A. ochraceus</i> | 99 | 0.62 |

| | | | | |
|-----|------------------|---------------------------|-----|------|
| B 2 | Mazorca en árbol | <i>C. cladosporioides</i> | 100 | 0.05 |
| B 2 | Fermentación | <i>E. cristatum</i> | 100 | ND |
| A 2 | Fermentación | <i>P. paneum</i> | 100 | 0.30 |
| A 2 | Fermentación | <i>A. tamarii</i> | 100 | 0.07 |

Esta proteína es altamente efectiva restringiendo el crecimiento de los principales hongos patógenos en humanos y plantas, debido a su habilidad de inhibir la síntesis de quitina en hongos sensibles (Hagen *et al.*, 2007). Posiblemente esta especie jugó un rol en la inhibición de algunas especies durante la fermentación y etapas subsecuentes. Esta es la primera vez que *A. giganteus* es reportado en granos de cacao.

Aspergillus steynii el principal hongo productor de OTA (5141.05 µg/kg), fue encontrado en granos de cacao en almacenamiento. De acuerdo a los resultados de Gil-Serna *et al.*, (2011), *A. steynii* representa el riesgo de contaminación más importante, incluso más que *A. westerdijkiae*, el cual no fue encontrado en este año, pero es la principal especie productora de OTA en México, la cual fue aislada de granos de café por Suárez-Quiroz *et al.*, (2004).

En la finca B se encontró una baja diversidad de hongos. Dos especies del género *Penicillium* fueron encontradas exclusivamente en el periodo de junio. *Penicillium paneum*, aislado de la fermentación y *P. griseofulvum*, en grano natural (sin fermentar) y granos de cacao en almacenamiento. Ambas cepas mostraron una baja producción de OTA (ND- 0.32 µg/kg). El género *Rhizopus* estuvo presente con la especie *Rhizopus stolonifer*, aislado del grano natural en enero. Esta especie fue amplificada con *primers* de la región 28s. *Rhizopus stolonifer* puede degradar OTA hasta 95% en medio YES suplementado con 7.5 mg OTA/L después de 16 días de incubación a 25°C (Varga *et al.*, 2000). Esta especie puede actuar como un control natural para la contaminación de OTA durante el proceso de cacao. El género *Rhizopus* ha sido aislado anteriormente de granos de cacao, principalmente la especie *R. nigricans* (Mounjouenpou *et al.*, 2012). Por otro lado, especies del género *Aspergillus* también fueron aisladas. *Aspergillus wentii* estuvo presente en granos fermentados. Esta especie ha sido reportada como productora de enzimas proteolíticas las cuales influyen el contenido de proteínas en granos (Ardhana y

Fleet, 2003). *Aspergillus aculeatus* fue la especie dominante durante la etapa de secado en los periodos de enero y junio. *Aspergillus carbonarius* fue encontrada en granos de cacao de almacenamiento en enero. Esta especie ha sido reportada como la principal fuente de OTA en cacao y es comúnmente asociada a retrasos en los quiebres y a mazorcas dañadas (Mounjouenpou *et al.*, 2008). Sin embargo, en este estudio *A. carbonarius* mostró una baja producción de OTA (0.05 µg/kg). Lo anterior puede atribuirse al uso de fungicidas, los cuales reducen la infección por *Aspergillus* sección *Nigri* y la producción de OTA *A. carbonarius*, este fenómeno ha sido observado durante la deshidratación de uvas (Valero *et al.*, 2007).

Cladosporium cladosporioides, fue aislada de la superficie de la mazorca. Algunas especies del genero *Cladosporium*, han sido reportadas por algunos autores (Copetti *et al.*, 2011; Sánchez-Hervás *et al.*, 2008), sin embargo, esta es la primera vez que *C. cladosporioides* es reportada en mazorcas de cacao.

La mayoría de los hongos aislados en este trabajo, han sido reportados como incapaces de crecer a temperaturas arriba de 50° C, sin embargo, varios de los hongos aquí estudiados, fueron aislados de granos fermentados con una temperatura de fermentación cercana a 50°C. Esto puede ser debido a que las esporas producidas por estos hongos, pueden sobrevivir a estas temperaturas.

Las especies fúngicas encontradas en la finca A y B fueron diferentes entre sí, y estas diferencias se acentuaron aún más entre los periodos de enero y junio. Esto puede deberse a la naturaleza de la materia prima, en este caso la mazorca y granos de cacao, así como a las condiciones fitosanitarias del proceso y el clima. Algunos autores han reportado que estos aspectos son determinantes para el desarrollo de hongos (Almela *et al.*, 2007; Mounjouenpou *et al.*, 2008).

7.5 OTA en grano de cacao y hongos asociados a su producción.

El contenido de OTA en granos de cacao de las fincas A y B a diferentes etapas del procesamiento y la flora fúngica asociada en 2013 se muestran en la Tabla 14.

Una cantidad considerable de OTA fue observada en muestras de grano natural (22.2 µg/kg) en la finca B, este contenido podría estar asociado a la presencia de *A. carbonarius*, la principal especie productora de OTA, y al uso de mazorcas dañadas. Por el contrario, los granos de cacao fresco presentes en la finca A presentaron un contenido máximo de OTA de 1.3 µg/kg y ninguna especie altamente productora fue encontrada, esto puede deberse a la calidad de las mazorcas utilizadas y al hecho de que el quiebre se realiza dentro de las 48h posteriores a la cosecha. Esto concuerda con los resultados obtenidos por Mounjouenpou *et al.*, (2012) quien encontró una buena correlación entre la presencia de OTA en los granos de cacao y la presencia de especies ocratoxigénicas.

Con respecto a la fermentación, el contenido máximo de OTA observado en finca A fue 3.9 µg/kg, mientras que en la finca B fue 8 µg/kg, estos valores coinciden con el rango de infección ocratoxigénica encontrada en esta etapa y anteriormente discutida. Los niveles de OTA fueron menores durante la fermentación que en otras etapas. Esto puede ser debido a la presencia de microorganismos naturalmente presentes en fermentación, tales como bacterias ácido lácticas, acetobacterias (Camu *et al.*, 2007) y levaduras (Jespersen *et al.*, 2005), las cuales pueden generar metabolitos que inhiben el desarrollo de hongos ocratoxigénicos y por lo tanto la producción de OTA. De acuerdo a lo observado por Copetti *et al.*, (2012), la presencia y acción de ácidos orgánicos débiles, especialmente ácido acético en combinación con hongos ocratoxigénicos a bajo pH, juegan un rol importante en la acumulación de OTA en cacao, y sugiere que la práctica de la fermentación conduce a la formación de ácido acético y esto puede minimizar el problema de contaminación por OTA en cacao.

Cantidades significativas de OTA fueron encontradas en la finca B (22.2 µg/kg). Esto coincide con la presencia de *A. carbonarius* y un alto porcentaje de infección en esta etapa. Un comportamiento similar fue observado en la finca A en muestras de grano de cacao seco (10.4 µg/kg) y almacenado (304.6 µg/kg). Esto coincide con el estudio realizado por Copetti *et al.*, (2010) quienes encontraron que la etapa de secado es

una de las etapas críticas para la contaminación por hongos productores de OTA y la OTA. Esto puede ser explicado en términos de A_w , durante el secado el grano de cacao empieza a perder agua, y por lo tanto hay un decremento en el valor de A_w , restringiendo el desarrollo de la microflora competitiva debido a la alta sensibilidad de bacterias y levaduras en presencia de una baja disponibilidad de agua, ya que esta baja disponibilidad puede ser suficiente para el desarrollo de hongos (Beuchat, 1987). Por otro lado, periodos extendidos de almacenamiento en combinación con la presencia de especies altamente ocratoxigénicas dieron como resultado la presencia de altos contenidos de OTA en grano en la finca A (304.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$), esto coincide con otros estudios, donde se establece que el almacenamiento es una de las etapas críticas en el proceso de cacao en relación a la presencia de especies altamente toxigénicas (Amézqueta *et al.*, 2008; Copetti *et al.*, 2010).

Lavar los granos de cacao al final de la fermentación en la finca B es deseable dado que reduce la pulpa adherida al grano (sustrato disponible), por lo que la presencia de especies altamente productoras y el riesgo de contaminación por OTA en granos de cacao se reduce también en las siguientes etapas de secado y almacenamiento.

TABLA 14. Contenido de OTA en granos de cacao y hongos productores de OTA asociados a etapas post-cosecha en 2013

| | OTA ($\mu\text{g}/\text{kg}$) | | | |
|----------------------|--|---|--|--|
| | Grano natural | Fermentación | Secado | Almacenamiento |
| Cepas Finca A | 0.4-1.3 <i>P. herquei</i> <i>A. giganteus</i> <i>A. ibericus</i> | 1.7-3.9 <i>Penicillium sp</i> | 0.3-10.4 <i>A. westerdijkiae</i> * <i>A. steynii</i> * <i>A. flavus</i> <i>A. ochraceus</i> <i>A. chevalieri</i> <i>Penicillium sp.</i> | 4.9-304.6 <i>P. sizovae</i> * <i>P. citrinum</i> <i>Penicillium sp.</i> <i>A. niger</i> <i>A. chevalieri</i> |
| Cepas Finca B | 0.3-22.2 <i>A. carbonarius</i> * | 0.4-0.8 <i>Penicillium sp</i> | 0.3-4.4 <i>A. chevalieri</i> | 0.7-11.3 <i>Penicillium sp</i> |

En 2014 a pesar de estudiar dos cosechas diferentes, no se observó un contenido de OTA tan elevado como en 2013. El contenido más elevado se encontró en grano de cacao almacenado (28.8 µg/kg) de la finca A1, a la par de la única especie altamente ocratoxigenica en este año, *A. steynii* (Tabla 15). Esta especie ha sido reportada como el principal riesgo de contaminación (Gil-Serna *et al.*, 2011).

En el resto de las etapas estudiadas y en las cosechas de la finca B, no se encontraron cepas productoras de OTA, esto se refleja en el contenido de OTA en los granos estudiados.

TABLA 15. Contenido de OTA en granos de cacao y hongos productores de OTA asociados a etapas post-cosecha en 2014.

| OTA (µg/kg) | | | | |
|---------------------------|---|---|---------------------------------------|--|
| | Grano natural | Fermentación | Secado | Almacenamiento |
| Cepas Finca A1 | 0 | 0.01 – 0.04 | 0.06 – 0.18 | 0.01 – 28.8 |
| | <i>P. paneum</i> | <i>P. citrinum</i> | <i>A. tamaraii</i> | <i>A. steynii</i> * |
| | <i>Rhizopus stolonifer</i> | <i>A. tamaraii</i> <i>P. paneum</i> | <i>A. niger</i> <i>A. clavatus</i> | <i>A. ochraceus</i> <i>A. aculeatus</i> <i>A. tamaraii</i> |
| Cepas Finca A2 | 0.69 | 0.01 – 0.69 | 0.01 – 0.89 | 0.12 |
| | <i>P. paneum</i> | <i>P. citrinum</i> | <i>A.</i> | <i>A. acualeatus</i> |
| | | <i>A. giganteus</i> <i>P. paneum</i> | <i>aculeatus</i> | |
| Cepas Finca B1 | 0 – 0.24 | 0 – 0.54 | 0.01 – 0.18 | 0.02 – 0.35 |
| | <i>Rhizopus stolonifer</i> | <i>A. wentii</i> | <i>A.</i> | <i>A. tubingensis</i> |
| | <i>A. aculeatus</i> <i>A. niger</i> | <i>A. tubingensis</i> | <i>aculeatus</i> | <i>A. aculeatus</i> <i>A. carbonarius</i> |
| Cepas Finca B2 | 0.03 – 0.1 | 0.01 – 0.36 | 0 – 0.10 | 0.02 – 0.24 |
| | <i>A. niger</i> | <i>P. paneum</i> | <i>A.</i> | <i>P. griseofulvum</i> |
| | <i>A. tubingensis</i> <i>P. griseofulvum</i> | <i>E. cristatum</i> | <i>aculeatus</i> | |

Por el contrario, las especies presentes desde el inicio del proceso, fueron características por sus efectos inhibitorios al desarrollo de especies fúngicas, tales como *Rhizopus stolonifer* y *A. giganteus*. Particularmente *Rhizopus stolonifer* tiene la capacidad de degradar OTA (János Varga *et al.*, 2000). Estas especies se encontraron desde las primeras etapas, generando una posible protección al grano,

de tal forma que en las etapas posteriores la contaminación por especies ocratoxigénicas y OTA fue mínima.

Al igual que en la cosecha estudiada en 2013, la contaminación más elevada en 2014 fue aquella donde una cepa altamente productora, en este caso *A. steynii*, estuvo presente en un periodo prolongado de almacenamiento.

Wood (1985), reportó que los granos de cacao de países tropicales, deben ser almacenados en un periodo máximo de 2 o 3 meses, de lo contrario se presentará un problema de contaminación por hongos filamentosos.

En este trabajo, se encontró que ese periodo, no debe exceder el mes, y menos aun cuando las condiciones de almacenamiento no son las adecuadas.

Los granos de cacao son higroscópicos y pueden absorber humedad bajo condiciones de almacenamiento inapropiadas. Y en diversas condiciones tales como bajos Aw, las esporas de hongo pueden permanecer viables por largos periodos, incluso sin crecimiento vegetativo y sin desarrollar hifas.

En la etapa de almacenamiento de la finca A en 2013, se generaron las condiciones apropiadas para la germinación de esporas, el crecimiento de hongos y además la producción de OTA.

Para el caso de la Finca B, la etapa de lavado previa al secado, redujo considerablemente la carga de hongos filamentosos y por lo que, a pesar de encontrarlos en etapas subsecuentes, los niveles de infección fueron menores y la concentración de OTA a los 30 días de almacén fue 10 veces menor que la observada en la Finca A.

7.6 Estudio de las Dinámicas microbianas por DGGE.

A nivel mundial, el 95% del cultivo corresponde a la variedad Forastero, lo que debería otorgar cierta homogeneidad en cuanto a la ecología microbiana presente a lo largo del proceso de cacao. Sin embargo, los tratamientos post-cosecha que se llevan a cabo en cada uno de los países productores e incluso entre las regiones de

estos, son diferentes, lo que origina ecologías microbianas que también son diferentes, por lo que estas pueden caracterizarse como elementos de trazabilidad.

Las comunidades microbianas de las fincas A y B fueron estudiadas utilizando los perfiles PCR-DGGE obtenidos de las muestras a diferentes etapas de post-cosecha. Cada carril vertical representó una muestra de cacao y cada banda representó una especie de bacteria o levadura.

En 2014, la dinámica de hongos (Figura 20) de la cosecha de enero, muestra la contaminación por esta población sobre diferentes etapas del procesamiento y se observa que hay una contaminación temprana desde la superficie de la mazorca, esto coincide con lo encontrado en el estudio del porcentaje de infección. Se observa una banda que se mantiene desde el grano natural hasta el grano al inicio del secado.

Esto implica que esta especie se encuentra muy bien adaptada a estas etapas del proceso.

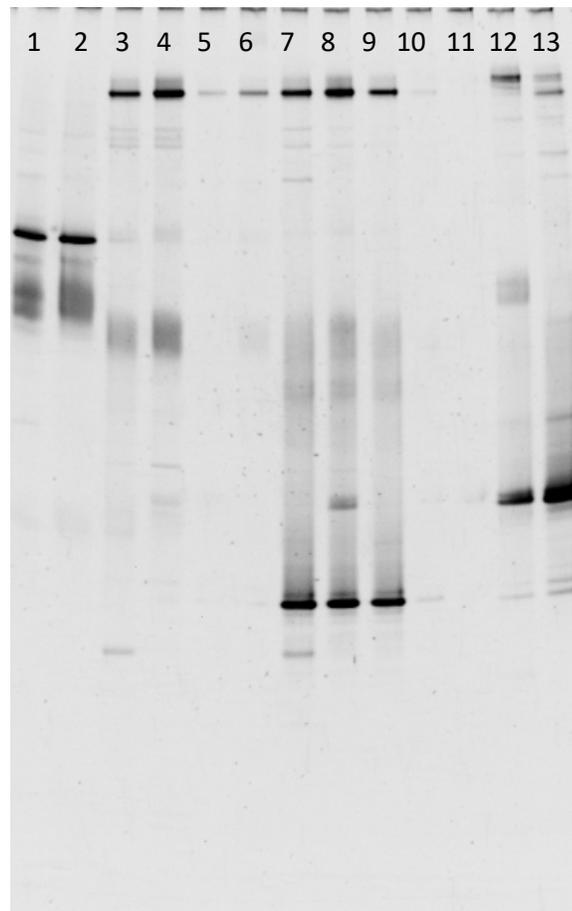


FIGURA 20. DGGE que muestra la evolución de la ecología de hongos durante el proceso de cacao en la finca A durante Enero 2014. 1: Mazorca de cacao en árbol, 2: Mazorca de cacao cosechada, 3: Granos de cacao naturales (Tiempo 0 de fermentación), 4-8: Granos fermentados por 1, 2, 3, 4 y 5 días, 9: Granos de cacao tiempo 0 de secado, 10: Granos de cacao secados por 9 días, 11-13: Granos de cacao almacenados por 14, 21 y 30 días.

Durante la etapa del almacenamiento se encuentran 2 bandas con una presencia dominante, estas bandas no se habían observado en ninguna otra etapa del proceso por lo que estas especies son características del almacenamiento. Es decir, la contaminación ocurrió durante esta etapa, con una intensidad aún mayor al final del almacenamiento, donde se encontró la principal especie productora de OTA en el año 2014, *A. steynii*.

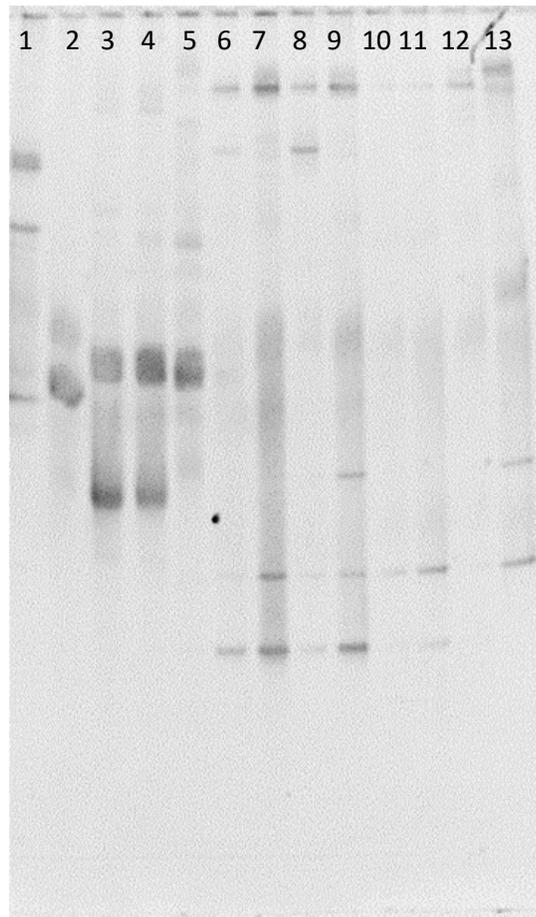


FIGURA 21. DGGE que muestra la evolución de la ecología fúngica durante el proceso de cacao en la finca A en Junio 2014. 1: Mazorca de cacao en árbol, 2: Mazorca de cacao cosechada, 3: Granos de cacao natural (Tiempo 0 de fermentación), 4-8: Granos de cacao fermentados por 1, 2, 3, 4 y 5 días, 9: Granos de cacao tiempo 0 de secado, 10-12: Granos de cacao secados durante 3, 6 y 9 días, 13: Granos de cacao almacenados durante 7 días.

La misma finca pero en la cosecha de Junio (Figura 21), mostró una marcada contaminación en los primeros días de fermentación, posteriormente al final de la fermentación estas especies desaparecen para dar paso a otras especies diferentes. Ninguna de estas bandas, fue similar a las bandas encontradas en la etapa de almacenamiento de la figura 20.

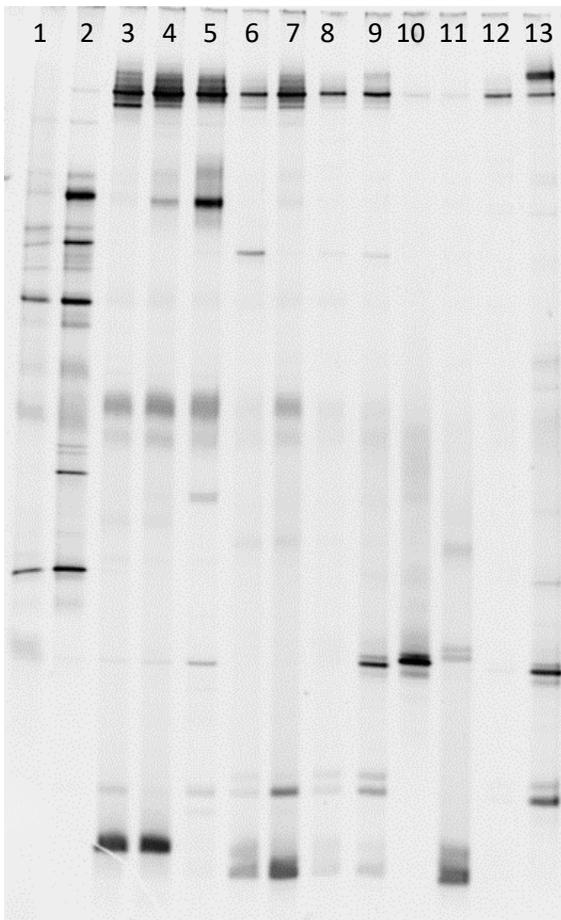


FIGURA 22. DGGE que muestra la evolución de la ecología fúngica durante el proceso de cacao en la Finca B durante Enero 2014. 1: Mazorca de cacao en árbol, 2: Grano de cacao transportado, 3: Granos de cacao frescos (Tiempo 0 de fermentación), 4-6: Granos de cacao fermentados por 1,2 y 3 días, 7: Granos de cacao al tiempo 0 de secado, 8-10: Granos de cacao secados durante 1,3 y 4 días, 11-13: Granos de cacao almacenados por 7,21 y 30 días.

En la figura 22 se muestra el gel DGGE de las muestras tomadas durante el proceso de cacao de la finca B en Enero. Se observa una mayor variedad de especies que en los geles de la finca A, esto puede atribuirse a la amplia manipulación de los granos sin fermentar. Esta manipulación dio lugar a una mayor contaminación que se vio reflejada en un mayor número de bandas. Las bandas encontradas al inicio del proceso en la superficie de la mazorca, no se observan en las etapas de fermentación. Pero algunas de las bandas observadas en el grano natural si se mantienen en el resto de las etapas, por lo que la posibilidad de una migración entre etapas se confirma con estas imágenes.

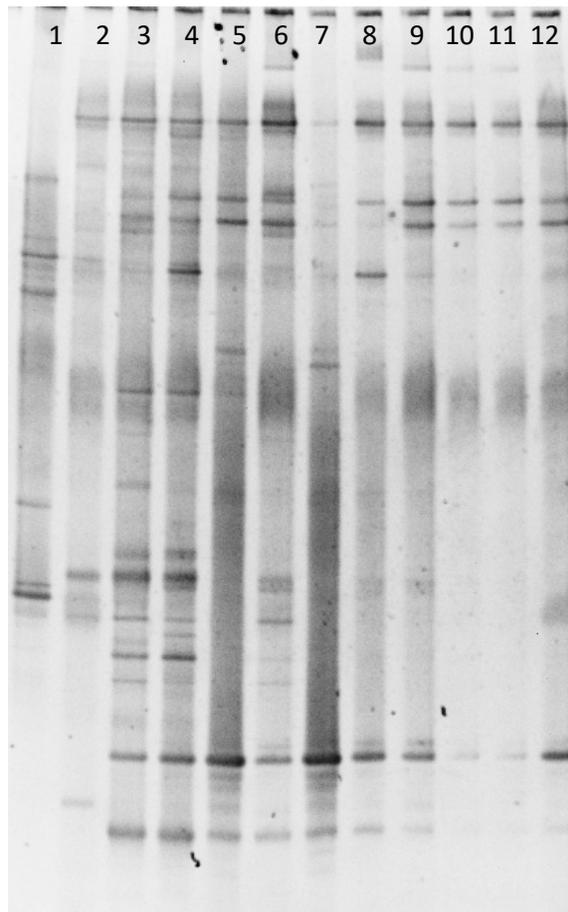


FIGURA 23. DGGE que muestra la evolución de la ecología fúngica durante el proceso de cacao en la Finca B durante Junio 2014. 1: Mazorca de cacao en árbol, 2: Grano de cacao natural, 3: Granos de cacao fresco (Tiempo 0 of fermentación), 4-6: Granos de cacao fermentado por 1, 2 y 3 días, 7: Granos de cacao tiempo 0 de secado, 8-11: Granos de cacao secados durante 1, 2, 3 y 4 días, 12: Granos de cacao almacenados por 30 días.

En la figura 23 se observa la dinámica de la flora fúngica en la finca B durante Junio 2014. Se observa un mayor número de bandas que en enero, de las cuales 5 de ellas se encontraron presentes desde el grano natural hasta el almacenamiento. Estas especies deben encontrarse muy bien adaptadas a este proceso, de tal forma que aun cambiando las condiciones en cada etapa, estas se mantienen hasta el final en la etapa de almacenamiento.

7.7 Análisis de similitud en perfiles DGGE

BACTERIAS

El análisis de estos perfiles mostró diferentes agrupaciones de las comunidades estudiadas.

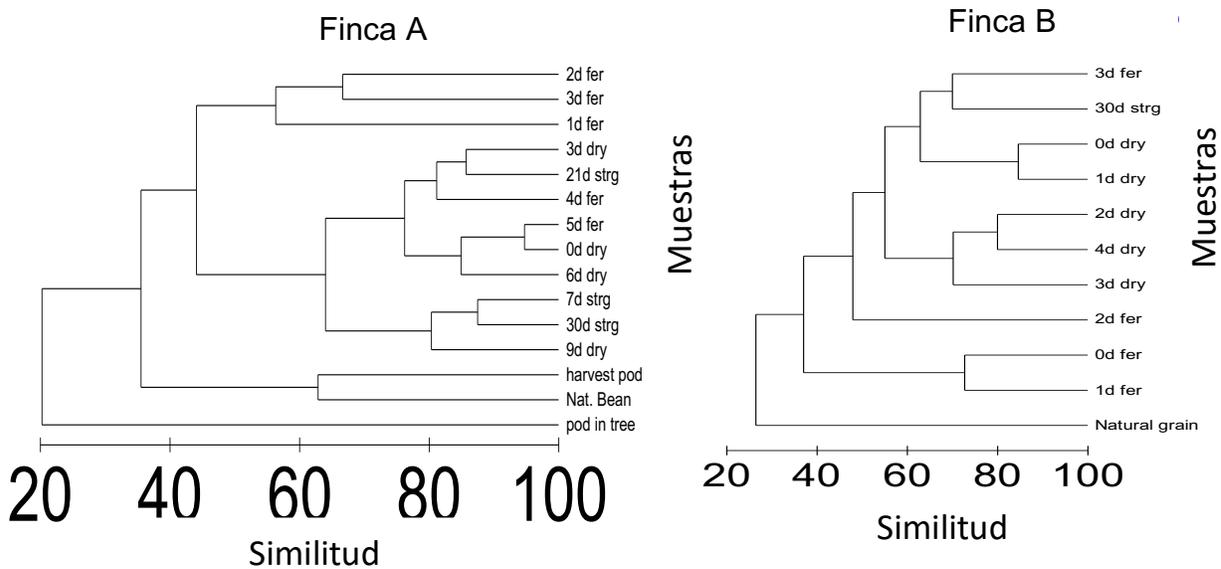


FIGURA 24. Análisis de perfiles DGGE, bacterias Finca A y B

En la figura 24, en el caso de las bacterias en la finca A, se observa que, de acuerdo a la similitud de especies presentes entre las etapas, se forman 4 agrupaciones. Cabe destacar un grupo comprendido por los tres primeros días de fermentación. Y otro más donde se observa una relación entre las bacterias presentes en la superficie de la mazorca y los granos en estado natural, previos a la fermentación. También se observa una similitud de alrededor del 80% entre las especies presentes en la etapa de almacenamiento y el último día de secado.

En el caso de las bacterias de la segunda finca se observa una marcada diferencia entre las especies presentes en el grano natural con respecto al resto de los grupos. Un porcentaje de similitud de alrededor del 70%, de especies entre las etapas de secado y almacenamiento.

LEVADURAS

En cuanto a las levaduras (Figura 25) en el caso de la finca A, se observan diferencias entre las etapas y dentro de las etapas. Excepto en el caso del almacenamiento, donde se observa una similaridad de alrededor del 70%, pero se debe considerar que solo se tenían dos muestras. Algo que llama la atención es la relación que existe entre el segundo y quinto día de fermentación y los días de secado 0 y 3.

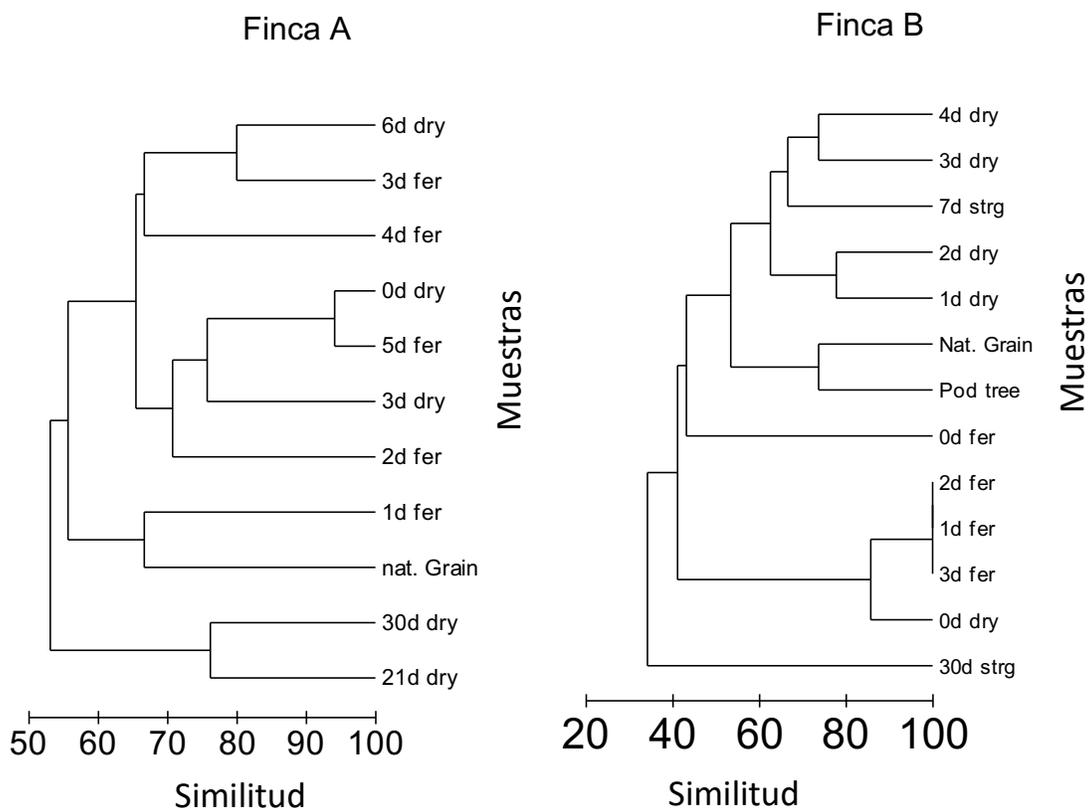


FIGURA 25. Análisis de bandas de perfiles DGGE para levaduras.

Esto habla de una desaparición de especies de levaduras en la etapa de fermentación y una re-aparición en la etapa de secado. Caso contrario de la finca B donde observamos que las similitud entre los días de cada etapa fueron mayores. Por lo que se observaron grupos que estaban relacionados con una etapa en particular. Uno de ellos, fue aquel donde los días 1,2 y 3 de fermentación guardan una similitud de alrededor del 80% entre sí. También observamos una similitud de aproximadamente 70% entre las especies presentes en la superficie de la mazorca en árbol y el grano natural, lo que representa una “mudanza” de levaduras durante el quiebre, y que además representa una información valiosa en este caso particular, puesto que el quiebre no se realiza en las instalaciones para el procesamiento y en general se desconocen las condiciones en las que esta se efectúa. Y finalmente una similitud de alrededor del 70% entre las especies presentes en los últimos días de secado y la primera semana de almacenamiento también fue observada.

Estos hallazgos muestran que, durante el proceso de cacao, el secado y el almacenamiento fueron las etapas con mayor riesgo de contaminación por OTA debido al desarrollo de hongos productores de OTA. Sin embargo, el lavar el grano de cacao inmediatamente después de la fermentación elimina la pulpa (substrato disponible) y reduce la infección y por lo tanto el riesgo de contaminación durante las etapas siguientes. Una pobre calidad en las mazorcas y periodos prolongados entre la cosecha y el quiebre propician la contaminación por OTA en granos de cacao fresco. Por lo tanto, el quiebre es una de las etapas críticas, para la contaminación por OTA.

Monitorear la contaminación de OTA durante cada etapa en el procesamiento de granos de cacao en México puede ayudar a implementar un sistema de análisis de peligros y puntos de control críticos (HACCP) y entonces minimizar el riesgo en la cadena alimenticia.

Este es el primer reporte acerca de la presencia de OTA en grano de cacao mexicano. Estos resultados pueden ser una guía para los productores para mejorar los tratamientos post-cosecha con el propósito de prevenir la contaminación por OTA y por lo tanto mejorar la calidad sanitaria en grano de cacao en México. Además, estudios posteriores deben ser enfocados en OTA y contaminación fúngica en granos de cacao de las etapas críticas arriba mencionadas.

Lo anterior puede ayudar a definir estándares para una producción de cacao de alta calidad, así como establecer las bases para una posible regulación en México, así como desarrollar la oportunidad de exportación.

8. CONCLUSIONES

Los análisis de los perfiles DGGE permitieron monitorear las dinámicas de las bacterias y levaduras y la influencia del proceso en las especies, las cuales variaron de acuerdo a la etapa post-cosecha y el estado progresivo de estas. Se observó un mayor número de especies en la finca B que en la finca A, como resultado de la diversidad microbiana presente en los diferentes cultivos de cacao utilizados en el proceso de la Finca B.

Aspergillus carbonarius fue la principal cepa ocratoxigénica, aislada en la etapa de grano natural en la hacienda B en el año 2013. Mientras que en 2014 *A. steynii* en combinación con periodos prolongados de almacenamiento, fue la principal responsable de la producción de OTA en grano almacenado.

En 2013 en la Finca A, se encontraron 3 especies del genero *Penicillium*, altamente productoras de OTA, esta es la primera vez que se aíslan especies de este género en el proceso de cacao.

Este estudio permitió observar que, las diferencias entre los granos de cacao de las Fincas A y B, así como los tratamientos post-cosecha a los que son sometidos, tienen un impacto en la contaminación por hongos toxigénicos. Una etapa previa de lavado, redujo considerablemente la infección de hongos ya que elimina la pulpa que actúa como sustrato disponible durante las etapas subsecuentes.

Por otro lado, la calidad de la materia prima influyó en la contaminación por hongos toxigénicos y producción de OTA. El secado y el almacenamiento fueron las principales etapas de riesgo por contaminación con especies ocratoxigénicas y OTA. Mientras que durante la fermentación etapa en la que las BAA, BAL y LEV alcanzaron sus máximos niveles de UFC, la contaminación por hongos toxigénicos y OTA se vio reducida.

9. RECOMENDACIONES

- Realizar un estudio de las especies de *Penicillium* aisladas en este trabajo, utilizando *primers* específicos, con la finalidad de obtener una información más detallada al respecto de estas especies.
- Sembrar las cepas altamente toxigénicas en medios de cultivo modelo con cacao como único sustrato, para estudiar su habilidad para producir OTA en cacao.
- Realizar fermentaciones de cacao conducidas a partir de un inóculo de bacterias lácticas, levaduras y/o acetobacterias con cepas altamente productoras de OTA para evaluar el posible efecto inhibitorio de estas poblaciones frente a cepas ocratoxigénicas, a nivel sustrato.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Abarca, M. L., Accensi, F., Bragulat, M. R., Castella, G., & Cabanes, F. J. (2003). *Aspergillus carbonarius* as the main source of ochratoxin A contamination in dried vine fruits from the Spanish market. *Journal of Food Protection*, **66**(3), 504–506. Retrieved from <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=14618458>
- Abrunhosa, L., Paterson, R. R. M., & Venâncio, A. (2010). Biodegradation of ochratoxin a for food and feed decontamination. *Toxins*, **2**(5), 1078–1099. <http://doi.org/10.3390/toxins2051078>
- Afoakwa, E. O. (2010). *Chocolate Science and Technology*. (Wiley-Blackwell Publishers, Ed.). Oxford, UK.
- Almela, L., Rabe, V., Sánchez, B., Torrella, F., López-Pérez, J. P., Gabaldón, J. A., & Guardiola, L. (2007). Ochratoxin A in red paprika: Relationship with the origin of the raw material. *Food Microbiology*, **24**(4), 319–327. <http://doi.org/10.1016/j.fm.2006.08.001>
- Amezqueta, S., Gonzalez-Penas, E., Murillo, M., & Lopez de Cerain, A. (2004). Validation of a high performance liquid chromatography analytical method for ochratoxin A quantification in cocoa beans. *Food Additives and Contaminants*, **21**, 1096–1106.
- Amézqueta, S., González-Peñas, E., Dachoupakan, C., Murillo-Arbizu, M., López De Cerain, A., & Guiraud, J. P. (2008). OTA-producing fungi isolated from stored cocoa beans. *Letters in Applied Microbiology*, **47**(3), 197–201. <http://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02409.x>
- Amézqueta, S., González-Peñas, E., Murillo, M., & de Cerain, A. L. (2005). Occurrence of ochratoxin A in cocoa beans: effect of shelling. *Food Additives and Contaminants*, **22**(6), 590–596. <http://doi.org/10.1080/02652030500130160>
- Ardhana, M. M., & Fleet, G. H. (2003). The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia. *International Journal of Food Microbiology*, **86**(1–2), 87–99. [http://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00081-3](http://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00081-3)
- Bate-Smith, E. C. (1973). Haemanalysis of Tannins: the Concept of Relative Astringency. *Phytochemistry*, **12**(1961), 907–912.
- Batista, L. R., Chalfoun, S. M., Prado, G., Schwan, R. F., & Wheals, A. E. (2003). Toxigenic fungi associated with processed (green) coffee beans (*Coffea arabica* L.). *International Journal of Food Microbiology*, **85**(3), 293–300. [http://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00539-1](http://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00539-1)
- Beardall, J., & Miller, J. D. (1994). Natural occurrence of mycotoxins other than

aflatoxin in Africa, Asia and South America. *Mycotoxin Research*, **10**(1), 21–40. <http://doi.org/10.1007/BF03192248>

Bellí, N., Pardo, E., Marín, S., Farré, G., Ramos, A. J., & Sanchis, V. (2004). Occurrence of ochratoxin A and toxigenic potential of fungal isolates from Spanish grapes. *Science of Food and Agriculture*, **84**(6), 541–546. <http://doi.org/10.1002/jsfa.1658>

Beuchat, L. R. (1987). Influence of water activity on sporulation, germination, outgrowth, and toxin production. In L.D. Rockland & L.R. Beuchat (Eds.), *Water Activity: Theory and Applications to Food* (pp. 153–172). New York: Marcel Dekker.

Biehl, B., & Ziegleder, G. (2003). Cocoa: Chemistry of processing. In *Encyclopedia of food sciences and nutrition*. (2th ed., pp. 1436–1448). Elsevier Science Ltd.

Bonvehí, J. S. (2004). Occurrence of ochratoxin A in cocoa products and chocolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**(20), 6347–6352. <http://doi.org/10.1021/jf040153w>

Bragulat, M. R., Abarca, M. L., & Cabañes, F. J. (2001). An easy screening method for fungi producing ochratoxin A in pure culture. *International Journal of Food Microbiology*, **71**(2–3), 139–144. [http://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00581-5](http://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00581-5)

Budavari, S. (1989). *The Merck Index Rahway*. (E. N.J., Ed.) (11th ed.). NJ, USA: Merck & Co.: Rahway,.

Cabañes, F. J., Bragulat, M. R., & Castellá, G. (2010). Ochratoxin A producing species in the genus *Penicillium*. *Toxins*, **2**(5), 1111–1120. <http://doi.org/10.3390/toxins2051111>

Camu, N., De Winter, T., Verbrugghe, K., Cleenwerck, I., Vandamme, P., Takrama, J. S., De Vuyst, L. (2007). Dynamics and biodiversity of populations of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria involved in spontaneous heap fermentation of cocoa beans in Ghana. *Applied and Environmental Microbiology*, **73**(6), 1809–1824. <http://doi.org/10.1128/AEM.02189-06>

Camu, N., Winter, T. De, Addo, S. K., Takrama, J. S., Herwig, B., & De Vuyst, L. (2008). Fermentation of cocoa beans: Influence of microbial activities and polyphenol concentrations on the flavour of chocolate. *Journal of Science of Food and Agriculture*, **88**, 2288–2297.

Carlile, M. J., Watkinson, S. C., & Gooday, G. (2001). *The Fungi*. Londres, Reino Unido.: Academic Press.

Casas, R. (1989). *Micología general*. Universidad Central de Venezuela, Caracas.

Castegnaro, M., Plestina, R., Dirheimer, G., Chernozemsky, I. N., & Bartsch, H. (1991). Pharmacokinetics of Ochratoxin A in animals. In Mycotoxins, endemic nephropathy and urinary tract tumours. *International Journal of Cancer*, 187–200.

Castella, G., Larsen, T. O., Cabañes, J., Schmidt, H., Alboresi, A., Niessen, L., ... Geisen, R. (2002). Molecular characterization of ochratoxin A producing strains of the genus *Penicillium*. *Systematic and Applied Microbiology*, **25**, 74–83.

Castellanos-Onorio, O., Gonzalez-Rios, O., Guyot, B., Fontana, T. A., Guiraud, J. P., Schorr-Galindo, Suárez-Quiroz, M. (2011). Effect of two different roasting techniques on the Ochratoxin A (OTA) reduction in coffee beans (*Coffea arabica*). *Food Control*, **22**(8), 1184–1188. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.01.014>

Champion Martínez, E. I. (2008). *Estudio del efecto de las bacterias lacticas durante la fermentacion del café sobre el crecimiento y producción de OTA por Aspergillus ochraceus*. UNIDA-ITV, Veracruz.

Cheesman, E. (1944). Notes on the nomenclature, classification and possible relationships of cocoa populations. *Tropical Agriculture*, **21**, 144–159.

Clapperton, J., Yow, S., Chan, J., Lim, D., & Lockwood, R., Romanczyk, L. (1994). The contribution of genotype to cocoa (*Theobroma cacao* L.) flavour. *Tropical Agriculture*, **71**(4), 303–308.

Cleenwerck, I., Gonzalez, Á., Camu, N., Engelbeen, K., De Vos, P., & De Vuyst, L. (2008). *Acetobacter fabarum* sp. nov., an acetic acid bacterium from a Ghanaian cocoa bean heap fermentation. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **58**(9), 2180–2185. <http://doi.org/10.1099/ijs.0.65778-0>

Cocolin, L., Bisson, L. F., & Mills, D. A. (2000). Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. *FEMS Microbiology Letters*, **189**(1), 81–87. [http://doi.org/10.1016/S0378-1097\(00\)00257-3](http://doi.org/10.1016/S0378-1097(00)00257-3)

colegio de post-graduados, C. T. (2009). CACAO. In *El cacao en Tabasco*. Retrieved from

www.cadem.gob.mx/download.php?file=descargas/modulo6/PONENCIACACAO31Marzo2009.ppt

Copetti, M. V., Iamanaka, B. T., Frisvad, J. C., Pereira, J. L., & Taniwaki, M. H. (2011). Mycobiota of cocoa: From farm to chocolate. *Food Microbiology*, **28**(8), 1499–1504. <http://doi.org/10.1016/j.fm.2011.08.005>

Copetti, M. V., Iamanaka, B. T., Pereira, J. L., Lemes, D. P., Nakano, F., & Taniwaki, M. H. (2012). Co-occurrence of ochratoxin a and aflatoxins in chocolate marketed in Brazil. *Food Control*, **26**(1), 36–41. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.12.023>

Copetti, M. V., Iamanaka, B. T., Mororó, R. C., Pereira, J. L., Frisvad, J. C., & Taniwaki, M. H. (2012). The effect of cocoa fermentation and weak organic acids on growth and ochratoxin A production by *Aspergillus* species. *International Journal of Food Microbiology*, **155**(3), 158–164. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.01.026>

Copetti, M. V., Pereira, J. L., Iamanaka, B. T., Pitt, J. I., & Taniwaki, M. H. (2010). Ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in cocoa during farm processing. *International Journal of Food Microbiology*, **143**(1–2), 67–70. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.07.031>

Counet, C., Ouwerx, C., Rosoux, D., & Collin, S. (2004). Relationship between pro-cyanidin and flavor contents of cocoa liquors from different origins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**(20), 6243–6249. <http://doi.org/10.1021/jf040105b>

- Daniel, H. M., Vrancken, G., Takrama, J. F., Camu, N., De Vos, P., & De Vuyst, L. (2009). Yeast diversity of Ghanaian cocoa bean heap fermentations. *FEMS Yeast Research*, **9**(5), 774–783. <http://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2009.00520.x>
- de Brito, E. S., García, N. H. P., Gallão, M. I., Cortelazzo, A. L., Fevereiro, P. S., & Braga, M. R. (2001). Structural and chemical changes in cocoa (*Theobroma cacao* L.) during fermentation, drying and roasting. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **81**(2), 281–288. <http://doi.org/10.1002/1097-0010>.
- De Bruyne, K., Camu, N., De Vuyst, L., & Vandamme, P. (2010). *Weissella fabaria* sp. nov., from a Ghanaian cocoa fermentation. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **60**(9), 1999–2005. <http://doi.org/10.1099/ijs.0.019323-0>
- de Muijnck, L. (2005). *Cocoa. encapsulated and powdered foods*. (C. Press., Ed.).
- Dongo, L., Bandyopadhyay, R., Kumar, M., & Ojiambo, P. S. (2008). Occurrence of Ochratoxin a in Nigerian Ready for Sale Cocoa Beans . *Agricultural Journal*, **3**, 4–9.
- Doyle, M. P., Beuchat, L. R., & Montville, T. J. (2001). *Cocoa and coffee. Food microbiology* (2nd ed).
- Durand, N., El Sheikha, A. F., Suarez-Quiros, M. L., Oscar, G. R., Nganou, N. D., Fontana-Tachon, A., & Montet, D. (2013). Application of PCR-DGGE to the study of dynamics and biodiversity of yeasts and potentially OTA producing fungi during coffee processing. *Food Control*, **34**(2), 466–471. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.05.017>
- EFSA. (2006). Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to ochratoxin A in food. *EFSA Journal*, 1–56.
- Ehrlich, K. C., Yu, J., & Cotty, P. J. (2005). Aflatoxin biosynthesis gene clusters and flanking regions. *Journal of Applied Microbiology*, **99**, 518–527.
- El Khoury, A., & Atoui, A. (2010). Ochratoxin A: General Overview and Actual Molecular Status, 461–493. <http://doi.org/10.3390/toxins2040461>
- El Sheikha, A. F. (2010). *Determination of geographical origin of Shea tree and Physalis fruits by using the genetic fingerprints of the microbial community by PCR/DGGE. Analysis of biological properties of some fruit extracts*. Montpellier University II.
- Ercolini, D. (2004). PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *J. Microbiol. Meth.*, **56**., 297–314.
- Esteban, A., Abarca, M. L., Bragulat, M. R., & Cabañes, F. J. (2006). Study of the effect of water activity and temperature on ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius*. *Food Microbiology*, **23**(7), 634–640. <http://doi.org/10.1016/j.fm.2005.12.006>
- FAO/OMS. (2012). *reunión del Comité del Codex sobre Contaminantes de los Alimentos (CCCCF) 2 . Ese documento de debate fue actualizado y presentado en la 2* (Vol. 9).

FAO/WHO. (2012). Discussion Paper on Ochratoxin a in Cocoa. *Codex Alimentarius Commission*, **9(d)**, 29.

Ferreira, N. P., & Pitout, M. J. (1969). The biosynthesis of ochratoxin. *Journal of the South African Chemical Institute*, **22**, 51.

Frisvad, J. C., Larsen, T. O., De Vries, R., Meijer, M., Houbraken, J., Cabañes, F. J., ... Samson, R. A. (2007). Secondary metabolite profiling, growth profiles and other tools for species recognition and important *Aspergillus* mycotoxins. *Studies in Mycology*, **59**, 31–37. <http://doi.org/10.3114/sim.2007.59.04>

Frisvad, J. C., Nielsen, K. F., & Samson, R. A. (2006). Recommendations concerning the chronic problem of misidentification of mycotoxigenic fungi associated with foods and feeds. *Adv Exp Med Biol*, **571**, 33–46. http://doi.org/10.1007/0-387-28391-9_2 [doi]

Frisvad, J., & Frank, J. (2004). New ochratoxin A producing species of *Aspergillus* section *Circumdati*. *Studies in Mycology*, **52**, 23–43. Retrieved from <http://www.fungalbiodiversitycentre.com/images/ResearchGroups/Publications/2004Frisvad0001.pdf>

Galan, L. C., & Rodriguez, J. J. (2003). La contaminación por Micotoxinas. *Observatori de La Seguretat Alimentaria. Universitat Autònoma de Barcelona*.

García-Armisen T., Papalexandratou, Z., Hendryckx, H., Camu, N., Vrancken, G., De Vuyst, L., & Cornelis, P. (2010). Diversity of the total bacterial community associated with Ghanaian and Brazilian cocoa bean fermentation samples as revealed by a 16 S rRNA gene clone library. *Appl Microbiol Biotechnol.*, **87(6)**, 2281–92. <http://doi.org/10.1007/s00253-010-2698-9>.

García, M. Y. (1994). *El cacao: origen, cultivo e industrialización en Tabasco*. (U. J. A. de T. D. A. de C. Agropecuarias, Ed.). Centro de Investigación de Ciencias Agropecuarias. Retrieved from <https://books.google.es/books?id=EQ5jAAAAMAAJ>

Geisen, R., Mayer, Z., Karolewicz, A., & Farber, P. (2004). Development of a real time PCR system for detection of *Penicillium nordicum* and for monitoring ochratoxin A production in foods by targeting the ochratoxin polyketide synthase gene. *Systematic and Applied Microbiology*, **27**, 501–507.

Gil-Serna, J., Vázquez, C., Sardiñas, N., González-jaén, M. T., & Patiño, B. (2011). Revision of ochratoxin a production capacity by the main species of *Aspergillus* section *Circumdati*. *Aspergillus steynii* revealed as the main risk of OTA contamination. *Food Control*, **22(2)**, 343–345. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.06.018>

Gilmour, M., & Lindblom, M. (2005). *Mycotoxins - Detection Methods, Management, Public Health and Agricultural Trade*. (& A. V. (Eds. . J. F. Leslie, R. Bandyopadhyay, Ed.) *Management of Ochratoxin A in the Cocoa Supply Chain: A summary of Work by de CAOBISCO/ECA/FCC Working Group on Ochratoxin A. Mycotoxins: Detection methods, management, public health and agricultural trade (pp. 231e243). Wallingford: CABI*. <http://doi.org/10.1079/9781845930820.0000>

Gonzalez, V. W., & Amaya, G. para el D. I. de E. U. (USAID). (2005). *Cacao en Mexico: Competitividad y Medio Ambiente con Alianzas*.

Guehi, T. S., Zahouli, I. B., Ban-Koffi, L., Monké, A., & Gnopo, N. J. (2010). Performance of different drying methods and their effects on the chemical quality attributes of raw cocoa material. *International Journal of Food Science and Technology*, **45**(8), 1564–1571. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2010.02302.x>

Hagelberg, S., Hult, K., & Fuchs, R. (1989). Toxicokinetics of ochratoxin A in several species and its plasma-binding properties. *Journal of Applied Toxicology*, **9**, 91–96.

Hagen, S., Marx, F., Ram, A. F., & Meyer, V. (2007). The antifungal protein AFP from *Aspergillus giganteus* inhibits chitin synthesis in sensitive fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, **73**(7), 2128–2134. <http://doi.org/10.1128/AEM.02497-06>

Hansen, C. E., del Olmo, M., & Burri, C. (1998). Enzyme activities in cocoa beans during fermentation. *J. Sci. Food Agric.*, **77**, 273–28.

Hardman, J. ., Limbird, L. E., Molinoff, P. ., Ruddon, R. W., & Goodman, G. (1996). *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. México.: Hill-Interamericana, McGraw.

Harris, J. P., & Mantle, P. G. (2001). Biosynthesis of ochratoxins by *Aspergillus ochraceus*. *Phytochemistry*, **58**, 709–716.

Hashim, P., Selamat, J., Muhammad, S. K. S., & Ali, A. (1998). Effect of mass and turning time on free amino acid, peptide-N, sugar and pyrazine concentration during cocoa fermentation. *J. Sci. Food Agric.*, **78**, 543–550.

Haslam, E., Lilley, T. H., & Butler, L. G. (1988). Natural astringency in foodstuffs — A molecular interpretation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **27**(1), 1–40. <http://doi.org/10.1080/10408398809527476>

Hesham, A. E., Khan, S., Liu, X., Zhang, Y., Wang, Z., & Yang, M. (2006). Application of PCR – DGGE to analyse the yeast population dynamics in slurry reactors during degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Yeast*, **23**, 879–887. <http://doi.org/10.1002/yea>

Hesseltine, C. W., Vandegrift, E. E., Fenell, D. I., Smith, M. L., & Shotwell, O. L. (1972). *Aspergilli* as ochratoxin producers. *Mycology*, **64**(3), 539–550.

Hocking, A. D., & Pitt, J. I. (1980). Dichloran-glycerol medium for enumeration of xerophilic fungi from low-moisture foods. *Applied and Environmental Microbiology*, **39**(3), 488–492.

Höhler, D. (1998). Ochratoxin A in food and feed: occurrence, legislation and mode of action. *Zeitschrift Für Ernährungswissenschaft*, **37**, 2–12.

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

Hussein, H. ., & Brasel, J. . (2001). Toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on human and animals. *Toxicology*, **167**, 101–134. [http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0300-483X\(01\)00471-1](http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0300-483X(01)00471-1)

International Agency for Research on Cancer. (1993). Ochratoxin A. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans*, 56(October 1982), 489–521.

Jespersen, L., Nielsen, D. S., Hønholt, S., & Jakobsen, M. (2005). Occurrence and diversity of yeasts involved in fermentation of West African cocoa beans. *FEMS Yeast Research*, 5(4–5), 441–453. <http://doi.org/10.1016/j.femsyr.2004.11.002>

Jinap, S., & Thien, J. (1994). Effect of drying on acidity and volatile fatty acids content of cocoa beans. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 65, 67–75.

Joosten, H. M. L. ., Goetz, J., Pittet, A., Schellenberg, M., & Bucheli, P. (2001). Production of ochratoxin A by *Aspergillus carbonarius* on coffee cherries. *International Journal of Food Microbiology*, 65(1–2), 39–44. [http://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00506-7](http://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00506-7)

Karakousis, A., Tan, L., Ellis, D., Alexiou, H., & Wormald, P. J. (2006). An assessment of the efficiency of fungal DNA extraction methods for maximizing the detection of medically important fungi using PCR. *J Microbiol Methods*, 65, 38–48.

Kirchhoff, P. M., Biehl, B., & Crone, G. (1989). Peculiarity of the accumulation of free amino- acids during cocoa fermentation. *Food Chem.*, 31, 295–311.

Krogh, P., Hald, B., & Pedersen, E. J. (1973). Occurrence of Ochratoxin A and citrinin in cereals associated with mycotoxic porcine nephropathy. *Microbiology and Immunology*, 81, 689–695.

Kuiper-Goodman, T. (1995). Mycotoxins: risk assessment and legislation. *Toxicology Letters*, 82(83), 853–859.

Laforgue, R., Guérin, L., Pernelle, J. J., Monnet, C., Dupont, J., & Bouix, M. (2009). Evaluation of PCR- DGGE methodology to monitor fungal communities on grapes. *Journal of Applied Microbiology*, 107, 1208–1218.

Lagunes Gálvez, S., Loiseau, G., Paredes, J. L., Barel, M., & Guiraud, J. P. (2007). Study on the microflora and biochemistry of cocoa fermentation in the Dominican Republic. *International Journal of Food Microbiology*, 114(1), 124–130. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.10.041>

Larsen, T. O., Svendsen, A., & Smedsgaard, J. (2001). Biochemical Characterization of Ochratoxin A-Producing Strains of the Genus *Penicillium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(8), 3630–3635. <http://doi.org/10.1128/AEM.67.8.3630-3635.2001>

Le-Bars, J. (1988). Toxinogenèse en fonction des conditions écologiques du système grains/microorganismes, . In J. L. Multon (Ed.), *Conservation et Stockage des Grains et Graines et Produits Dérivés. Technique et Documentation Lavoisier*. (pp. 376–391). Paris, France.

Le Nguyen, D. D., Ha, H., & Dijoux, D. (2008). Determination of fish origin by using 16S rDNA fingerprinting of bacterial communities by PCR– DGGE: an application on *Pangasius* fish from Vietnam. *Food Control*, 19, 454–460.

Leesing, R. (2005). *Identification et validation de marqueurs spécifiques pour la traçabilité de poisons d'aquaculture lors de leur import/export*. Université Montpellier 2 (France).

Lefeber, T., Gobert, W., Vrancken, G., Camu, N., & De Vuyst, L. (2011). Dynamics and species diversity of communities of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria during spontaneous cocoa bean fermentation in vessels. *Food Microbiology*, **28**(3), 457–464. <http://doi.org/10.1016/j.fm.2010.10.010>

Lefeber, T., Janssens, M., Camu, N., & De Vuyst, L. (2010). Kinetic analysis of strains of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria in cocoa pulp simulation media toward development of a starter culture for cocoa bean fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, **76**(23), 7708–7716. <http://doi.org/10.1128/AEM.01206-10>

Lima, L. J. R., Almeida, M. H., Nout, M. J. R., & Zwietering, M. H. (2011). *Theobroma cacao* L., “the food of the gods”: quality determinants of commercial cocoa beans, with particular reference to the impact of the fermentation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **51**(8), 731–761.

Lopez, A. S., & Dimick, P. (1995). Cocoa fermentation. In G. Reed & T. W. Nagodawithana (Eds.), *Enzymes, Biomass, Food and Feed* (pp. 561–577). VCH, Weinheim.

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. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.02076.x>

Maaroufi, K., Achour, A., Betbeder, A. M., Hammami, M., Ellouz, F., Creppy, E. E., & Bacha, H. (1995). Foodstuffs and human blood contamination by the mycotoxin ochratoxin A: correlation with chronic interstitial nephropathy in Tunisia. *Archives of Toxicology*, **69**(8), 552–558. <http://doi.org/10.1007/s002040050211>

Magan, N., & Aldred, D. (2005). Conditions of formation of ochratoxin A in drying, transport and in different commodities. *Food Addit. Contam.*, **22**(Suppl 1), 10–16. <http://doi.org/10.1080/02652030500412154>

Magan, N., & Aldred, D. (2007). Post-harvest control strategies: Minimizing mycotoxins in the food chain. *International Journal of Food Microbiology*, **119**(1–2), 131–139. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.034>

Marino, A., Nostro, A., & Fiorentino, C. (2009). Ochratoxin A production by *Aspergillus westerdijkiae* in orange fruit and juice. *International Journal of Food Microbiology*, **132**(2–3), 185–189. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.03.026>

Masoud, W., Cesar, L. B., Jespersen, L., & Jakobsen, M. (2004). Yeast involved in fermentation of *Coffea arabica* in East Africa determined by genotyping and by direct denaturing gradient gel electrophoresis. *Yeast*, **21**, 549–556.

Meyer, S. A., Payne, R. W., & Yarrow, D. (1989). *Candida Berkhout. The yeast, a Taxonomic Study*, (Kurtzman, C.P. y Fell, J.eds),. (E. S. Publications, Ed.) (4th edn). Amsterdam, the Netherlands.

- Miraglia, M., & Brera, C. (2002). Assessment of dietary intake of ochratoxin A by the population of EU member states. *Reports on Tasks for Scientific Cooperation. Reports of January*, 1–153. Retrieved from <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Assessment+of+dietary+intake+of+Ochratoxin+A+by+the+population+of+EU+Member+States#0>
- Moreira, I. M. da V., Miguel, M. G. da C. P., Duarte, W. F., Dias, D. R., & Schwan, R. F. (2013). Microbial succession and the dynamics of metabolites and sugars during the fermentation of three different cocoa (*Theobroma cacao* L.) hybrids. *Food Research International*, **54**(1), 9–17. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.06.001>
- Morello, L. G., Sartori, D., de Oliveira Martinez, A. L., Vieira, M. L. C., Taniwaki, M. H., & Fungaro, M. H. P. (2007). Detection and quantification of *Aspergillus westerdijkiae* in coffee beans based on selective amplification of B-tubulin gene by using real-time PCR. *International Journal of Food Microbiology*, **119**(3), 270–276. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.08.009>
- Motamayor, J. C., Lachenaud, P., Wallace sa Silva e Mota, J., Loor, R., Kuhn, D. N., & Brown, J. S. (2008). Geographic and genetic population differentiation of the Amazonian chocolate tree (*Theobroma cacao* L.). *PLoS One*, **3**(10), 3311. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0003311>
- 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. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.017>
- Mounjouenpou, P., Gueule, D., & Guyot, B. (2012). Incidence of Pod Integrity on the Fungal Microflora and Ochratoxin-A Production in Cocoa. *Journal of Biology and Life Science*, **3**(1). <http://doi.org/10.5296/jbls.v3i1.2231>
- Mühlencoert, E., Mayer, I., Zapf, M. W., Vogel, R. F., & Niessen, L. (2004). Production of Ochratoxin A by *Aspergillus Ochraceus*. *European Journal of Plant Pathology*, **110**(5), 651–659. <http://doi.org/10.1023/B:EJPP.0000032404.71695.6b>
- Muyzer, G., De Waal, E. C., & Uitterlinden, A. G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, **59**(3), 695–700. [http://doi.org/0099-2240/93/030695-06\\$02.00/0](http://doi.org/0099-2240/93/030695-06$02.00/0)
- Myers, R. M., Fischer, S. G., Lerman, L. S., & Maniatis, T. (1985). Nearly All Single Base Substitutions in DNA Fragments Joined to a Gc-Clamp Can Be Detected by Denaturing Gradient Gel-Electrophoresis. *Nucleic Acids Research*, **13**, 3131–3145.
- Naccha, R. (2005). Ocratoxinas y su impacto en la salud, Ciencia UANL. *Universidad Autonoma de Nuevo Leon, Monterrey, México.*, **8**(3), 373–378.
- Nakajima, M., Tsubouchi, H., Miyabe, M., & Ueno, Y. (1997). Survey of aflatoxin B1 and ochratoxin A in commercial green coffee beans by high-performance liquid chromatography linked with immunoaffinity chromatography. *Food and Agricultural*

Immunology, **9**(2), 77–83.

Nampoothiri, K. M., Baiju, T. V., Sandhya, C., Sabu, A., Szakacs, G., & Pandey, A. (2004). Process optimization for antifungal chitinase production by *Trichoderma harzianum*. *Process Biochemistry*, **39**(11), 1583–1590.

Ness, F., Lavellee, F., Dubourdieu, D., Aigle, M., & Dulau, L. (1993). Identification of yeast strains using the polymerase chain reaction. *Journal of Science Food and Agriculture*, **62**, 89–94.

Nesterov, V. S. (1951). Etiology, pathogenesis and clinical aspects of alimentary toxic aleukia (septic angina). *Terapevticheski Arkhiv.*, **23**(1), 88–94.

Nielsen, D. S., Hønholt, S., Tano-Debrah, K., & Jespersen, L. (2005). Yeast populations associated with Ghanaian cocoa fermentations analysed using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Yeast*, **22**(4), 271–284. <http://doi.org/10.1002/yea.1207>

Nielsen, D. S., Teniola, O. D., Ban-Koffi, L., Owusu, M., Andersson, T. S., & Holzapfel, W. H. (2007). The microbiology of Ghanaian cocoa fermentations analysed using culture-dependent and culture-independent methods. *International Journal of Food Microbiology*, **114**(2), 168–186. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.09.010>

Noor-Soffalina, S. S., Jinap, S., Nazamid, S., & Nazimah, S. A. H. (2009). Effect of polyphenol and pH on cocoa Maillard-related flavour precursors in a lipidic model system. *International Journal of Food Science and Technology*, **44**(1), 168–180. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2008.01711.x>

Northolt, M. D., Egmond, H. P. V., & Paulsch, E. (1979). Ochratoxin A production by some fungal species in relation to water activity and temperature. *Journal Food Protection*, **42**, 485–490.

O'Callaghan, J., Caddick, M. X., & Dobson, A. D. W. (2003). A polyketide synthase gene required for ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus ochraceus*. *Microbiology*, **149**(12), 3485–3491. <http://doi.org/10.1099/mic.0.26619-0>

O'Callaghan, J., Stapleton, P. C., & Dobson, A. D. W. (2006). Ochratoxin A biosynthetic genes in *Aspergillus ochraceus* are differentially regulated by pH and nutritional stimuli. *Fungal Genetics and Biology*, **43**(4), 213–221. <http://doi.org/10.1016/j.fgb.2005.11.005>

Obrecht-Pflumio, S., & Dirheimer, G. (2001). Horseradish peroxidase mediates DNA and deoxyguanosine 3'-monophosphate adduct formation in the presence of ochratoxin A. *Archives of Toxicology*, **75**(10), 583–590. <http://doi.org/10.1007/s00204-001-0289-3>

Omar, N., & Ampe, F. (2000). Microbial Community Dynamics during Production of the Mexican Fermented Maize Dough Pozol. *Microbial Community Dynamics during Production of the Mexican Fermented Maize Dough Pozol. Appl. Environ. Microbiol.*, **66**(9), 3664–3673. <http://doi.org/10.1128/AEM.66.9.3664-3673.2000>. Updated

- Ortiz de Bertorelli, L., & Graziani de Fariñas, L. G. R. L. (2009). Influencia de varios factores sobre características del grano de cacao fermentado y secado al sol. *Agronomía Trop.*, **59**(2), 119–127.
- Papalexandratou, Z., Lefeber, T., Bahrim, B., Seng, O., Daniel, H., & Vuyst, L. De. (2013). *Acetobacter pasteurianus* predominate during well-performed Malaysian cocoa bean box fermentations, underlining the importance of these microbial species for a successful cocoa bean fermentation process. *Food Microbiology*, **35**(2), 73–85. <http://doi.org/10.1016/j.fm.2013.02.015>
- Parenicová, L., Skouboe, P., Frisvad, J., Samson, R., Rossen, L., & Hoor-Suykerbyuk, M.T. Visser, J. (2001). Combined molecular and biochemical approach identifies *Aspergillus japonicus* and *Aspergillus aculeatus* as two species. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**, 521–527.
- Payne, G. A., & Brown, M. P. (1998). Genetics and physiology of aflatoxin biosynthesis. *Annual Review of Phytopathology*, **36**(1), 329–362.
- Petkova-Bocharova, T., Castegnaro, M., Pfohl-Leszkowicz, A., Garren, L., Grosso, F., Nikolov, I., ... Chernozemsky, I. N. (2003). Analysis of Ochratoxin a in Serum and Urine of Inhabitants. *Facta Universitatis*, **10**(2), 62–68.
- Petzinger, E., & Weidenbach, A. (2002). Mycotoxins in the food chain: The role of ochratoxins. *Livestock Production Science*, **76**(3), 245–250. [http://doi.org/10.1016/S0301-6226\(02\)00124-0](http://doi.org/10.1016/S0301-6226(02)00124-0)
- Petzinger, E., & Ziegler, K. (2000). Ochratoxin A from a toxicological perspective. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **23**, 91–98.
- Pfohl-Leszkowicz, A., & Manderville, R. A. (2007). Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. *Molecular Nutrition and Food Research*, **51**(1), 61–99. <http://doi.org/10.1002/mnfr.200600137>
- Pitt, J. I. (1996). What are mycotoxins? *Australian Mycotoxin Newsletter.*, **38**, 17–22.
- Pitt, J. I. (2000). Toxigenic fungi and mycotoxins, **56**(1), 184–192.
- Pitt, J. I., & Hocking, A. D. (1997). *Fungi and Food Spoilage* (2nd ed.). London: Blackie Academic & Professional.
- Portillo, E., Graziani De Farinas, L., & Betancourt, E. (2007). Análisis Químico del Cacao Criollo porcelana (*Theobroma cacao* L.) en el Sur del Lago de Maracaibo. *Rev. Fac. Agron.*, **24**, 522–546.
- Praag, H. M., Van Korf, J. ., & Woudenberg Kits, T. (1968). Influencing the human indoleamine metabolism by means of a chlorinated amphetamine derivative with antidepressive action (p-chloro-N-methylamphetamine). *Psychopharmacologia*, **13**, 145–60.
- Prakitchaiwattana, C. J., Fleet, G. H., & Heard, G. M. (2004). Application and evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to analyse the yeast ecology of wine grapes. *Fems Yeast Research*, **4**, 865–877.

- Reysenbach, A. L., Giver, L. J., Wickham, G. S., & Pace, N. R. (1992). Differential Amplification of Ribosomal-Rna Genes by Polymerase Chain-Reaction. *Applied and Environmental Microbiology*, **58**, 3417–3418.
- Rodricks, J. ., Hesseltine, C. W., & Mehlman, M. A. (1977). *Mycotoxins in Human and Animal Health*. Park Forest South, IL: Pathotox.
- Rohan, T. A. (1958). Processing of raw cocoa. I- Small scale fermentation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **9**, 104–111.
- Rohsius, C., Matissek, R., & Lieberei, R. (2006). Free amino acid amounts in raw cocoas from different origins. *European Food Research and Technology*, **222**, 432–438.
- Ros-Chumillas, M., Egea-Cortines, M., Lopez-Gomez, A., & Weiss, J. (2007). Evaluation of a rapid DNA extraction method to detect yeast cells by PCR in orange juice. *Food Control*, **18**, 33–39.
- Rusconi, M., & Conti, A. (2010). Theobroma cacao L., the Food of the Gods: A scientific approach beyond myths and claims. *Pharmacological Research*, **61**(1), 5–13. <http://doi.org/10.1016/j.phrs.2009.08.008>
- Saltini, R., Akkerman, R., & Frosch, S. (2013). Optimizing chocolate production through traceability: A review of the influence of farming practices on cocoa bean quality. *Food Control*, **29**(1), 167–187. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.05.054>
- Samson, R. A. (1994). *Current systematics concepts of the genus Aspergillus*. Nueva York, EEUU: Press, Plenum.
- Samson, R. A., Hoekstra, E. S., & Frisvad, J. C. (2004). *Introduction to food-and airborne fungi*. (Centraalbureau voor Schimmelcultures, Ed.) (7th ed.). Utrecht, The Netherlands.
- 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. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.04.021>
- Schmidt-Heydt, M., Baxter, E., Geisen, R., & Magan, N. (2007). Physiological relationship between food preservatives, environmental factors, ochratoxin and otaPKS_{PV} gene expression by *Penicillium verrucosum*. *International Journal of Food Microbiology*, **119**(3), 277–283.
- Schwan, R.F. Rose, A.H. Board, R. G. (1995). Microbial fermentation of cocoa beans, with emphasis on enzymatic degradation of the pulp. (CEPLAC/Cocoa Research Centre/SETEA, CP 07, 45.600.000, Itabuna, BA (Brazil).
- 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. <http://doi.org/10.1080/10408690490464104>
- Scott, P. M. (1996). Effects of processing and detoxification treatments on Ochratoxin A: introduction. *Food Additives and Contaminants*, **13**, 19–21.

- Sengun, I. Y., & Karabiyikli, S. (2011). Importance of acetic acid bacteria in food industry. *Food Control*, **22**(5), 647–656. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.11.008>
- Sheffield, V. C., Cox, D. R., Lerman, L. S., & Myers, R. M. (1989). Attachment of a 40- base-pair G + C-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. *Proc Natl Acad Sci*, **86**, 232–236.
- Shwab, E. K., & Keller, N. P. (2008). Regulation of secondary metabolite production in filamentous ascomycetes. *Mycological Research*, **112**, 225–230.
- SIAP-SAGARPA. (2015).
- SIAP/SAGARPA. (2014). *Sistema de Información Agrícola y Pesquera. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación*.
- Smith, J. E., & Moss, M. (1985). *Mycotoxins: Formation, Analysis and Significance*. (Wiley, Ed.). Chichester. UK.
- Sounigo, O., Umaharan, R., Christopher, Y., Sankar, A., & Ramdahin, S. (2005). Assessing the genetic diversity in the International Cocoa Genebank, Trinidad (ICG, T) using isozyme electrophoresis and RAPD. *Genetic Resources and Crop Evolution*, **52**(8), 1111–1120. <http://doi.org/10.1007/s10722-004-6110-4>.
- Stander, M. A., Bornscheurer, U. T., Henke, E., & Steyn, P. S. (2000). Screening of commercial hydrolases for the degradation of Ochratoxin A. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **48**, 5736–5739.
- Størmer, F. C., Storen, O., Hansen, C. H., Pedersen, J. I., & Aasen, A. J. (1983). Formation of (4R)- and (4S)-4-hydroxyochratoxin A and lohydroxyochratoxin A by rabbit liver microsomes. *Applied and Environment Microbiology*, **45**, 1183–1187.
- Studer-Rohr, I., Dietrich, D. R., Schlatter, J., & Schlatter, C. (1995). The occurrence of ochratoxin A in coffee. *Food and Chemical Toxicology*, **33**(5), 341–355. [http://doi.org/10.1016/0278-6915\(94\)00150-M](http://doi.org/10.1016/0278-6915(94)00150-M)
- Suárez-Quiroz, M., González-Rios, O., Barel, M., Guyot, B., Schorr-Galindo, S., & Guiraud, J. P. (2004). Study of ochratoxin A-producing strains in coffee processing. *International Journal of Food Science and Technology*, **39**(5), 501–507. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.00810.x>
- Sukha, D., Butler, D., Umaharan, P., & Boulton, E. (2008). The use of an optimised organoleptic assessment protocol to describe and quantify different flavour attributes of cocoa liquors made from Ghana and Trinitario beans. *European Food Research and Technology*, **226**(3), 405–413. <http://doi.org/10.1007/s00217-006-0551-2>
- Tafari, A., Ferracane, R., & Ritieni, A. (2004). Ochratoxin A in Italian marketed cocoa products. *Food Chemistry*, **88**(4), 487–494. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.01.061>
- Taniwaki, M. H., Pitt, J. I., Teixeira, A. A., & Iamanaka, B. T. (2003). The source of

ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to processing methods. *International Journal of Food Microbiology*, **82**(2), 173–179. [http://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00310-0](http://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00310-0)

Teixeira, J., Magalhães, D., Andrade, G., Viscogliosi, H., & Grenier-loustalot, M. (2011). Occurrence of Ochratoxin A in Brazilian cocoa beans. *Food Control*, **22**(5), 744–748. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.11.006>

Thompson, S. S., Miller, K. B., & Lopez, A. S. (2001). Cocoa and coffee. In M. P. Doyle, L. R. Beuchat, & T. J. Montville (Eds.), *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers* (721–736). Washington, D.C.: ASM, Press.

Tomlins, K. I., Baker, D. M., Daplyn, P., & Adomako, D. (1993). Effect of fermentation and drying practices on the chemical and physical profiles of Ghana cocoa. *Food Chemistry*, **46**, 257–263.

Valero, A., Marín, S., Ramos, A. J., & Sanchis, V. (2007). Effect of preharvest fungicides and interacting fungi on *Aspergillus carbonarius* growth and ochratoxin A synthesis in dehydrating grapes. *Letters in Applied Microbiology*, **45**(2), 194–199. <http://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02168.x>

Vallaëys, T., Topp, E., Muyzer, G., Macheret, V., Laguerre, G., Rigaud, A., & Soulas, G. (1997). Evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis in the detection of 16S rDNA sequence variation in rhizobia and methanotrophs. *Fems Microbiology Ecology*, **24**, 279–285.

Van der Merwe, K., Fourie, L., Scott, P. M. y, & Theron, J. J. (1965). Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. *Nature*, **205**, 1112–1113.

Varga, J., Kevei, E., Rinyu, E., Teren, J., & Kozakiewicz, Z. (1996). Ochratoxin production by *Aspergillus* species. *Appl Environ Microbiol*, **62**(12), 4461–4464.

Varga, J., Rigó, K., & Téren, J. (2000). Degradation of ochratoxin A by *Aspergillus* species. *International Journal of Food Microbiology*, **59**(1–2), 1–7. [http://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00230-0](http://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00230-0)

Vilela, D. M., Pereira, G. V. de M., Silva, C. F., Batista, L. R., & Schwan, R. F. (2010). Molecular ecology and polyphasic characterization of the microbiota associated with semi-dry processed coffee (*Coffea arabica* L.). *Food Microbiology*, **27**(8), 1128–1135. <http://doi.org/10.1016/j.fm.2010.07.024>

Vincent, P. (2002). Cacaos et chocolats: traitement et fabrication. *Cacaos et Chocolats: Traitement et Fabrication*, 6–8. Retrieved from [see_the_document_in_the_desktop_folder_Techniques_de_lingenieur](#)

Wheeler, K. A., Hurdman, B. F., & Pitt, J. I. (1991). Influence of pH on the growth of some toxigenic species of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*. *International Journal of Food Microbiology*, **12**(2), 141–149. [http://doi.org/10.1016/0168-1605\(91\)90063-U](http://doi.org/10.1016/0168-1605(91)90063-U)

White, T. J., Bruns, T. D., Lee, S. ., & Taylor, J. W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetics. In M. A. Innis, D. H.

Gelfand, J. J. Sninsky, & T. J. White (Eds.), *PCR protocols. A Guide to Methods and Applications* (pp. 315–322). San Diego, CA: Academic Press,.

Woo, C., & El-Nezami, H. (2016). Maternal-Fetal Cancer Risk Assessment of Ochratoxin A during Pregnancy. *Toxins*, **8**(4), 87. <http://doi.org/10.3390/toxins8040087>

Zain, M. E. (2011). Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi Chemical Society*, **15**(2), 129–144. <http://doi.org/10.1016/j.jscs.2010.06.006>

Zhao, J., Kong, F., Li, R., Wang, X., Wan, Z., & Wang, D. (2001). Identification of *Aspergillus fumigatus* and related species by nested PCR targeting ribosomal DNA internal transcribed spacer regions. *Journal of Clinical Microbiology*, **39**, 2261–2266.

Zimmerli, B., & Dick, R. (1995). Determination of ochratoxin A at the ppt level in human blood, serum, milk and some foodstuffs by high-performance liquid chromatography with enhanced fluorescence detection and immunoaffinity column cleanup: methodology and Swiss data. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, **666**(1), 85–99. [http://doi.org/10.1016/0378-4347\(94\)00569-Q](http://doi.org/10.1016/0378-4347(94)00569-Q)