

Determinación de los niveles de ocratoxina A (OTA) en cacao dominicano de exportación[§]

José Camilo, José Romero, Orlando Rodríguez, Juan Almonte, José González y Noel Durand¹

El cacao dominicano se exporta principalmente a los mercados de Estados Unidos de América, Alemania, Francia, Italia, Bélgica, Holanda y España. El cacao dominicano tiene ventajas competitivas en los mercados especiales y como cultivo tradicional de exportación. Sin embargo, los países importadores exigen, cada día, un producto de mayor calidad e inocuidad. La presencia de altos niveles de Ocratoxina A (OTA) podrían afectar la inocuidad y por ende afectar la imagen de este producto en los mercados internacionales. El objetivo de esta investigación fue determinar los niveles de OTA en el cacao de exportación dominicano. Se tomaron a nivel nacional 174 muestras de cacao de lotes de exportación con un error de muestreo de 7 % y un nivel de confianza del 95%. En cada lote de cacao se tomaron 360 submuestras de 80 g, mezcladas y homogenizadas para obtener una muestra final de 1 kg. La determinación de los niveles de OTA se realizó utilizando el protocolo del Cirad. Los resultados indican que en sólo el 23.57 % de los lotes muestreados hubo presencia de OTA. El 89% de los lotes con OTA presentaron niveles igual o menor a 0.3 ppb. No se observó una relación entre el promedio humedad, defectos (moho e insecto) y el nivel de OTA por tipo de cacao exportado. Basado en estos resultados podemos concluir que el cacao dominicano presenta un bajo nivel de OTA, lo cual constituye una fortaleza como producto de exportación.

Palabras clave: *ocratoxina A*, micotoxinas e inocuidad.

INTRODUCCIÓN

El cacao dominicano se exporta a los mercados de Estados Unidos de América, Alemania, Francia, Italia, Bélgica, Holanda y España, principalmente. En el periodo 2007 al 2010, el país exportó un promedio anual de 50,247.04 TM, equivalente a US\$ 145, 320,200.44. En la cosecha 2007-2008, se exportaron 33,602.17 TM y se generaron US\$ 99,437,402.05. En la del 2008-2009 62,382.11 TM con un valor de US\$ 162,347,706.96. En la del 2009-2010 54,756.83 TM con un valor de US\$ 174,175,490.32. Estos volúmenes de exportación son manejados por 19 empresas exportadoras y/o procesadoras, MA (2010).

Los estudios de competitividad realizados en la República Dominicana establecen que el cacao tiene ventajas competitivas en los mercados especiales y como cultivo tradicional de exportación, SEA (2006).

Las micotoxinas entre las que se encuentra la Ocratoxina A (OTA), son los contaminantes más comunes del cacao en grano. La OTA es un tipo de micotoxina que se produce como resultado del metabolismo secundario de mohos de la especie *Aspergillus* y *Penicillium*. Se ha demostrado que la OTA posee un potente efecto nefrotóxico y nefrocancerígeno y puede encontrarse en

un amplio rango de alimentos y bebidas, incluyendo el cacao, Pohland *et al.* (1992) y Hohler (1998).

La presencia de OTA, sobre todo si los niveles son altos en el cacao de exportación, podría afectar la preferencia de este producto en los mercados internacionales, especialmente en los europeos. En este sentido, esta investigación tuvo como objetivos a) determinar los niveles de OTA en cacao de exportación y b) determinar la relación entre los defectos (% moho e % insectos) y los niveles de OTA en cacao de exportación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la determinación de los niveles de OTA en cacao de exportación, se tomó como base el total del producto exportado en las dos últimas cosechas (2007-2008 y 2008-2009) por empresa, MA (2010). Con este propósito se tomaron 174 muestras de cacao con un error de muestreo de 7 % y un nivel de confianza del 95%. Las muestras se seleccionaron mediante un muestreo estratificado por tipo de cacao y por empresa exportadora, Tabla 1.

¹ Investigadores del Instituto Dominicano de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (IDIAF). Rafael Augusto Sánchez #89, Ensanche Evaristo Morales. Santo Domingo, República Dominicana. Teléfono: (809) 567-8999. jcamilo@idiaf.gov.do.

[§] Estudio realizado con el apoyo del Fondo Nacional de Innovación y Desarrollo Científico y Tecnológico (Fondocyt)

A nivel de cada lote de cacao de exportación se tomaron 360 submuestras de 80 g. Estas submuestras se mezclaron y se tomó una muestra final de 1 kg. Al momento del muestreo, se registró la humedad de cada muestra, tipo de cacao, procedencia, tiempo de almacenamiento y exportador. Las muestras fueron conservadas a una humedad entre 7 a 7.5 % en la Estación Experimental Mata Larga del Instituto Dominicano de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (IDIAF) en San Francisco de Macorís.

Las variables a medir fueron: nivel de OTA (ppb), tipo y número de defectos (% de moho e insectos). La determinación de los Niveles de OTA se realizó utilizando el protocolo del Cirad, Guyot (2004).

Los defectos del cacao se determinaron mediante conteo y clasificación de los granos por tipo de defectos, para lo cual se utilizó las normas del laboratorio ISO 1401. Se tomó una muestra de 200 granos. Se realizó un análisis de correlación entre los defectos del grano y los niveles de OTA encontrados por lote exportado.

El nivel de OTA se determinó en los laboratorios del Cirad-Francia. Para el análisis de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se utilizaron 100 g de cacao. Las muestras fueron acondicionadas, colocándolas en un congelador a -80 °C y posteriormente molidas en un molino Perten LM 3600.

El protocolo utilizado para la extracción, purificación, determinación y cuantificación del nivel de OTA fue el siguiente:

Fase de extracción: se pesaron 50 g de cacao molido, se le adicionaron 4 g de NaCl y 200 ml de una solución compuesta de acetronitrilo y agua destilada en proporción 60/40. Luego se colocó en agitación por 30 minutos.

Del extracto, se tomó 45 ml y se colocó en una centrifuga Sigma 2k15 por 10 minutos a 3,000 rpm a 10 °C.

Fase de purificación: se diluyó 4 ml del extracto en 44 ml de fosfato búfer salino (PBS) más 4 µl de Tween 20. Las columnas fueron colocadas en una cámara de vacío, se le removieron las tapas y se le agregó 10 ml de PBS para acondicionarlas. A continuación, se pasó el extracto diluido a un flujo de 2-3 ml/min. Al terminarse el extracto diluido las columnas fueron lavadas con 20 ml de PBS a un flujo de 5 ml/min y secadas dejando pasar aire dentro de las mismas.

Debajo de cada columna se colocó un recipiente recolector. Posteriormente, se disocia la OTA de la columna utilizando 1.5 ml de una solución de desorción (metanol). El extracto purificado es evaporado en un calentador a 70 °C con un flujo constante de nitrógeno, luego se le agrega 1 ml de solvente de la fase móvil del HPLC. Finalmente, las muestras son inyectadas al equipo de HPLC para su detección y cuantificación.

Tabla 1. Número de muestras tomadas por tipo de cacao y exportador

Empresa Exportadora	Tipo de Cacao				Total
	Sánchez Convencional	Sánchez Orgánico	Hispaniola Convencional	Hispaniola Orgánico	
1	9	18	6	27	60
2	7	0	0	18	25
3	5	0	0	0	5
4	3	0	0	0	3
5	5	0	0	2	7
6	1	2	1	14	18
7	7	0	0	0	7
8	0	0	0	4	4
9	0	1	0	8	9
10	0	0	0	6	6
11	0	0	0	1	1
12	0	0	0	2	2
13	0	0	0	3	3
14	0	0	0	10	10
15	0	0	0	10	10
16	1	1	1	1	4
Total	38	22	8	106	174

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Presencia de Ochratoxina A en el cacao

Los resultados indican que en el 23.57 % de los lotes muestreados por tipo de cacao, hubo presencia de OTA, Tabla 2. Este resultado fue menor que el determinado por Brera *et al.* (2011) y Amezqueta *et al.* (2004) donde las muestras de cacao seco en grano analizadas, presentaron presencia de OTA entre el 33% hasta el 73% y similares a los encontrados por Dembele *et al.* (2009) en la Costa de Marfil.

En el cacao tipos Sánchez convencional y orgánico, se detectó OTA en un mayor número de lotes en comparación con los tipos Hispaniola convencional y orgánico. En los lotes con presencia de esta toxina el nivel promedio fue de 0.16 ppb con un rango de 0.1 a 0.8 ppb, los cuales se consideran bajos. Valores similares reportó Teixeira *et al.* (2011) en el sur de Brasil donde el 92.5 % de los lotes de cacao seco con presencia de OTA tuvieron niveles por debajo de 0.20 ppb. Amezqueta *et al.*, (2004), en Costa de Marfil, Camerún y Guinea Ecuato-

rial encontró en muestras de cacao seco niveles promedio de 1.71 ppb, con un rango de 0.42 a 14.80 ppb.

Con respecto al cacao tipo Sánchez el nivel promedio de OTA fue de 0.18 ppb, ligeramente superior al Hispaniola (0.14ppb). Estos resultados indican similitud entre el nivel de OTA encontrado en el cacao fermentado y en el no fermentado. El nivel de OTA en las muestras provenientes a los sistema de producción convencional y orgánico no se observó una tendencia, similitud o diferencias claras. Estos resultados difieren a los reportados en Italia por Tafuri *et al.* (2004) donde sólo las muestras de cacao en polvo, proveniente del sistema de producción convencional presentaron OTA y en el 28.56% de estos con niveles sobre los límites legales sugeridos por la Unión Europea para ese año.

El 89% de los lotes con OTA presentaron niveles igual o menor a 0.3 ppb. Estos niveles son bajos considerando que las muestras analizadas fueron de cacao seco en grano, Figura 1. Según Amezqueta *et al.*, (2005) y Aroyeun y Adegoke (2007) el nivel de OTA se reduce entre 50 a 95% luego del descascarado. Dembele *et al.*

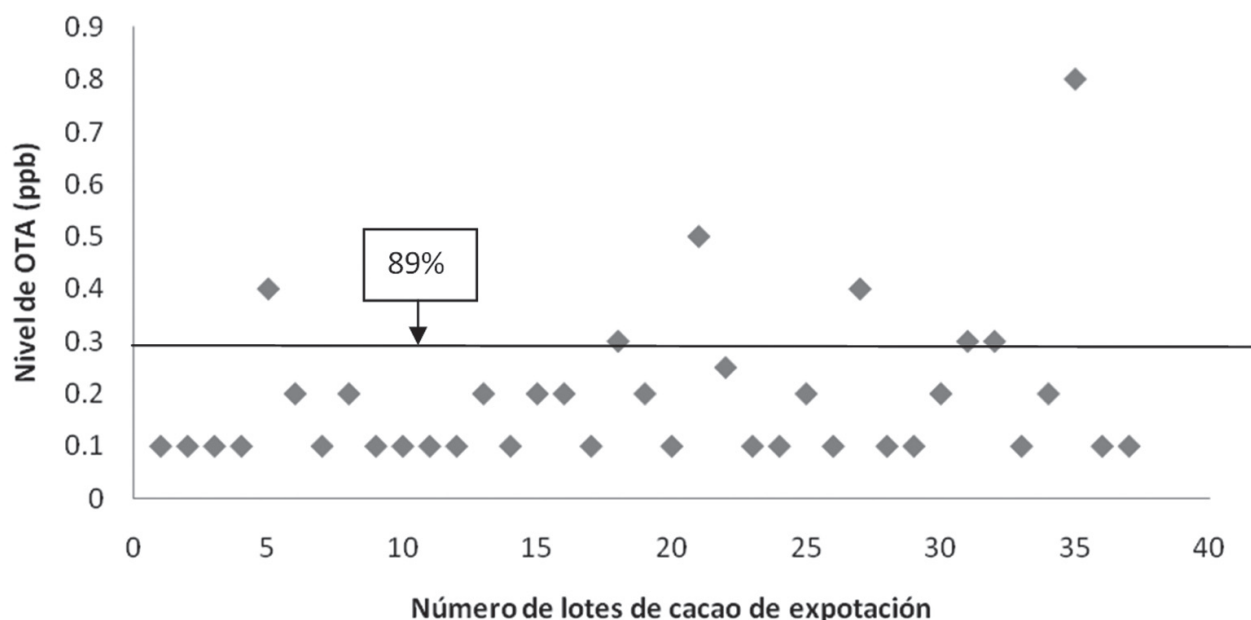


Figura 1. Dispersión del nivel de OTA en las muestras de cacao de exportación.

Tabla 2. Porcentaje de lotes con presencia y nivel promedio de OTA por tipo de cacao de exportación.

Tipo de cacao	% de lotes con OTA	Nivel promedio de OTA (ppb)	Máximo	Mínimo	DS
Sánchez Convencional	30.56	0.22	0.5	0.1	0.104
Sánchez orgánico	25.00	0.14	0.2	0.1	0.103
Hispaniola convencional	14.29	0.10	0.1	0.1	0.094
Hispaniola orgánico	21.28	0.19	0.8	0.1	0.111
Promedio total	23.57	0.16	0.8	0.1	0.103

Tabla 3. Porcentaje promedio de humedad, presencia de moho, insectos y nivel de OTA por tipo de cacao.

Tipo de cacao exportado	Humedad	Moho	Insecto	Nivel promedio de OTA (ppb)
Sánchez Convencional	7.12	3.06	0.47	0.22
Sánchez orgánico	6.91	1.22	0.26	0.14
Hispaniola convencional	6.78	1.00	0.00	0.1
Hispaniola orgánico	7.04	1.72	0.29	0.19
Promedio total	6.96	1.75	0.26	0.16

(2009), reportaron que el 9.5% de los lotes muestreados en los puertos de Abidjan y San Pedro en Costa de Marfil presentaron niveles de OTA sobre 2 ppb. Para ambos casos los niveles promedios son superiores al encontrado en el cacao seco en grano de este estudio.

Relación entre los defectos y OTA

La Tabla 3, muestra los resultados del porcentaje de humedad, moho, insecto y el nivel de OTA por tipo de cacao. No se observó una relación entre el promedio humedad y defectos (moho e insecto) y el nivel de OTA por tipo de cacao exportado. Sin embargo, para el caso del cacao Sánchez convencional se observó un mayor nivel promedio de OTA, porcentaje de humedad, moho y daños por insectos en los granos. Bastide *et al.* (2005) reporta niveles de OTA que varían entre 2 hasta 20 ppb en granos provenientes de mazorcas con daños en el campo (momificadas, con hongos, daños por insectos). No obstante, no establece una relación entre los defectos del grano y el nivel de OTA.

CONCLUSIONES

El cacao dominicano presenta un bajo nivel de OTA, lo cual constituye una fortaleza como producto de exportación.

Sólo el 23% de los lotes de cacao de exportación muestreado presentó OTA. El nivel promedio de OTA fue de 0.16 ppb en granos de cacao seco. El 89% de los lotes con OTA presentó niveles inferiores a 0.3 ppb.

No se encontró relación directa entre el nivel de OTA y el tipo de cacao exportado.

No se hubo relación directa entre los defectos de moho e insecto y el nivel de OTA en los diferentes lotes de cacao de exportación.

LITERATURA CITADA

- Aroyeun, S.; Adegoke, G. 2007. Reduction of ochratoxin A (OTA) in spiked cocoa powder and beverage using aqueous extracts and essential oils of *Aframomum danielli*. *African Journal of Biotechnology* 6 (5): 612-616.
- Amézqueta, S.; González-Peñas, E.; Murillo, M.; de Cerain, A. 2004. Validation of a high-performance liquid chromatography analytical method for ochratoxin A quantification in cocoa beans. *Food Additives & Contaminants*: 21:1096-1106.
- Amézqueta, S.; González-Peñas, E.; Murillo, M.; de Cerain, A. 2005. Occurrence of ochratoxin A in cocoa beans: Effect of shelling. *Food Additive and Contaminants*, 1-7.
- Bastide, P.; Fourny, G.; Durand, N.; Petithuguenin, P.; Guyot, B., Gilmour, M.; Lindblom, M. 2005 Identification of Ochratoxina A sources during cocoa post-harvest processing: influence of harvest quality and climatic factors. 15th International Cocoa Research Conference. San José, CR.
- Brera, C.; Debegnach, F.; De Santis, B.; Lafrate, E.; Pannunzi, E.; Berdinia, C.; Prantero, E.; Gregori E.; Miraglia, M. 2011. Ochratoxin a in cocoa and chocolate products from the italian market: occurrence and exposure assessment. *Food Control* 22(10):1663-1667.
- Dembele, A.; Coulibaly, A.; Traoré, S. K.; Mamadou, K.; Silue, N.; Touré, A. A. 2009. Determination of ochratoxin A (OTA) levels in exported cocoa. *Journal Tropicultura* 27(1):26-30.
- Guyot, B. 2004. Aflatoxinas y Ochratoxina A. Generalidades, Reglamentaciones y Determinación utilizando cromatografía líquida de alta eficiencia "HPLC". CIRAD. Montpellier, FR.
- Hohler, D. 1998 Ochratoxin A in food and feed: occurrence, legislation and mode of action. *Institute fur Tierernahrung und Stoffwechselphysiologie der Universtitat Kiel Otshausenstr. 37: 2-12.*
- MA (Ministerio de Agricultura,DO). 2010. Memoria Anual. Departamento de Cacao. Santo Domingo, DO.
- Pohland, A.; Nesheim, S.; Friedman, L. 1992. Ochratoxina A: a review. *Pure Appl. Chem.* 64:1029-1046.
- SEA (Secretaría de Estado de Agricultura, DO). 2006. Estudio de Competitividad Agroalimentaria. Santo Domingo, DO.
- Tafari, A.; Ferracane, R.; Ritieni, A. 2004. Ochratoxin A in Italian marketed cocoa products. *Dipartimento di Scienza degli Alimenti, Università di Napoli Federico II, Via Università 100, 80055 Portici, Napoli, IT.*
- Teixeira, J.; Andrade, G.; Viscogliosi, H.; Grenier-Loustalot, M. 2011. Occurrence of Ochratoxin A in Brazilian cocoa beans. *Journal Food Control.* 22(5):744-748.