



**Universidad  
Norbert Wiener**

**FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA  
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE FARMACIA Y  
BIOQUÍMICA**

**Evaluación del nivel de ocratoxina A en las fases de post  
cosecha de *Theobroma cacao* L. “cacao trinitario” y  
chocolates artesanales en el distrito de Pisana - San  
Martin, 2018**

Tesis para optar el título profesional de Químico farmacéutico

**AUTORES:**

ARIZA AGUAYO, ABIGAIL JANET

**Código ORCID:** 0000-0002-7587-3995

LAUPA LUKAÑA, EDITH ESPERANZA

**Código ORCID:** 0000-0003-3231-3063

Lima – Perú

2021

**Tesis:**

Evaluación del nivel de ocratoxina A en las fases de post cosecha de *Theobroma cacao* L. “cacao trinitario” y chocolates artesanales en el distrito de Pisana - San Martín, 2018.

Tesis para optar el título profesional de químico farmacéutico

**Línea de investigación**

Salud y Bienestar

**Asesor (a):**

Dra. Chávez Flores Juana Elvira

**Código ORCID:** 0000-0001-6206-3398

## **DEDICATORIA**

A Dios por ser el eje principal de mi existencia, ha estado conmigo en cada paso que doy, cuidándome y dándome fortaleza para alcanzar mis metas. A mis padres Abraham y Sonia por su incondicional apoyo económico y la fortaleza para seguir adelante cuando flaqueaba en mis objetivos.

Br. Ariza Aguayo, Abigail Janet

En primer lugar a Dios por guiarme cada día para culminar este reto profesional. A mis padres, por su amor, protección y entrega total para llegar a ser un gran profesional de éxito. A mi hija Camila Calixto, por ser la razón de mi existencia y superación.

Br. Laupa Lukaña, Edith Esperanza

## **AGRADECIMIENTO**

La universidad nos brindó la oportunidad incomparable de formar parte de ellos, de nuestra formación y la calidad de profesionales que forman día a día. Agradecemos mucho por la ayuda de nuestros maestros, en especial de nuestra asesora por estar allí con nosotros hasta el final, de otros docentes que formaron parte de esta realidad para nosotras como son el Dr. Américo castro, Dra. Norma Ramos, Dr. Lizano, compañeros y en especial a la Sra. Ana Ariza Ventura quién fue la que nos proveo los materiales requeridos para hacer realidad esta investigación.

Br. Ariza Aguayo, Abigail Janet

Br. Laupa Lukaña, Edith Esperanza

**ÍNDICE**

**RESUMEN**

## ABSTRACT

<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>xi</b>
<b>CAPITULO I: EL PROBLEMA</b>	<b>1</b>
1.1 Planteamiento del problema	1
1.2. Formulación del problema	2
1.3. Objetivos de la investigación	3
1.3.1. Objetivo general	3
1.3.2. Objetivos específicos	3
1.4. Justificación de la investigación	3
1.5. Limitaciones de la investigación	4
<b>CAPITULO II: MARCO TEÓRICO</b>	<b>5</b>
2.1. Antecedentes	5
2.1.1. Antecedentes internacionales.	5
2.1.2. Antecedentes nacionales.	8
2.2. Bases teóricas	10
2.2.1. Descripción botánica del <i>Theobroma cacao</i> L.	10
b) Clasificación taxonomía del <i>Theobroma cacao</i> L.	11
c) Grupos genéticos del cacao	11
d) Distribución y condiciones geográficas	12
e) Fases de la postcosecha del cacao	13
2.2.2. Micotoxinas	14
a) Tipos de Ocratoxinas	19
b) Ocratoxina A	211
c) Impacto de la Ocratoxina A en animales	222
2.2.3. Métodos de cuantificación	245
2.3. Formulación de Hipótesis	278
<b>CAPITULO III: METODOLOGIA</b>	<b>288</b>
3.1. Método de investigación	288
3.2. Enfoque y diseño	29

3.3. Población, muestra y muestreo .....	29
3.4. Variable de estudio.....	29
3.5. Técnica e instrumentos de recolección de datos .....	30
3.7. Proceso de recolección .....	32
3.9. Preparación de la curva de calibración .....	34
3.10. Plan de Procesamiento y análisis de datos .....	35
3.11. Aspectos bioéticos.....	35
<b>CAPITULO IV: PRESENTACION Y DISCUSION DE LOS RESULTADOS.....</b>	<b>36</b>
4.1. Resultados .....	36
4.1.1. Análisis descriptivo de resultados .....	36
4.1. Discusión de resultados.....	43
<b>CAPITULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b>	<b>47</b>
5.1. Conclusiones .....	47
5.2. Recomendaciones .....	47
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>49</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>56</b>
<b>ANEXO 1: MATRIZ DE CONSISTENCIA</b>	
<b>ANEXO 2: OPERACIONALIZACION DE VARIABLES</b>	
<b>ANEXO 3: FORMATO DE VALIDACION DEL INSTRUMENTO</b>	
<b>ANEXO 4: TAXONOMIA del <i>Theobroma cacao</i> L.</b>	
<b>ANEXO 5: ANÁLISIS QUÍMICO, CONSULTORÍA E INVESTIGACIÓN</b>	

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Distribución del nivel de ocratoxina A en cacao <i>Theobroma cacao</i> L. en la fase de fermentación por el método de cromatografía Líquida de alta ..... 36	36
<b>Tabla 2.</b> Distribución del nivel de ocratoxina A en cacao <i>Theobroma cacao</i> L. en la fase de secado por el método de cromatografía Líquida de alta resolución..... 37	37
<b>Tabla 3.</b> Distribución del nivel de ocratoxina A en cacao <i>Theobroma cacao</i> L. en la fase de almacenado por el método de cromatografía Líquida de alta resolución ..... 38	38
<b>Tabla 4.</b> Prueba de normalidad de la concentración de ocratoxina A ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) en cacao <i>Theobroma cacao</i> L. en la fase de almacenado..... 39	39
<b>Tabla 5.</b> Valor promedio de la concentración de ocratoxina A ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) en cacao <i>Theobroma cacao</i> L. en la fase de almacenado ..... 40	40
<b>Tabla 6.</b> Distribución del nivel de ocratoxina A en chocolate ..... 41	41
<b>Tabla 7.</b> Prueba T para una media de la concentración ocratoxina A en los granos de <i>Theobroma cacao</i> L. en las fases de almacenado ..... 42	42

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Ilustración de fruto, hojas y flores del <i>Theobroma cacao</i> L .....	11
<b>Figura 2.</b> Foto de los frutos de <i>Theobroma cacao</i> L .....	11
<b>Figura 3.</b> Principales grupos genéticos del cacao .....	12
<b>Figura 4.</b> Cambios en la regulación de las micotoxinas en alimentos .....	17
<b>Figura 5.</b> Cambios en la regulación de micotoxinas en los piensos .....	18
<b>Figura 6.</b> Tipos de ocratoxinas .....	20
<b>Figura 7.</b> Test comercial de ocratoxina A, producido por AgraQuant® .....	25
<b>Figura 8.</b> Identificación de OTA y ocratoxina alfa mediante TLC .....	26
<b>Figura 9.</b> Distribución del nivel de ocratoxina A en cacao <i>Theobroma cacao</i> L. en la fase de fermentación por el método de cromatografía Líquida de alta resolución.....	37
<b>Figura 10.</b> Distribución del nivel de ocratoxina A en cacao <i>Theobroma cacao</i> L. en la fase de secado por el método de cromatografía Líquida de alta resolución.....	38
<b>Figura 11.</b> Distribución del nivel de ocratoxina A en cacao <i>Theobroma cacao</i> L. en la fase de almacenado por el método de cromatografía Líquida de alta resolución .....	39
<b>Figura 12.</b> Distribución del nivel de ocratoxina A en chocolates.....	41

## RESUMEN

La ocratoxina A es una micotoxina nefrotóxica y cancerígena capaz de causar efectos dañinos al ser humano y animales. Se encuentra en muchos alimentos, entre ellos el cacao y derivados. El presente trabajo tuvo como **objetivo** determinar y cuantificar los niveles de ocratoxina A en *Theobroma cacao* L. “cacao” en las fases de post cosecha y en chocolates artesanales provenientes del distrito de Pisana - San Martín. Donde la **metodología** se realizó con el proceso de extracción, que se llevó a cabo mediante columnas de inmunoafinidad y la cuantificación por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia. Las muestras de cacao y chocolates artesanales fueron recolectadas en el distrito de Pisana departamento de San Martín en el periodo 2018. La detección se realizó por fluorescencia, a una longitud de onda de excitación de 333 nm y longitud de onda de emisión de 460 nm. Los **resultados** obtenidos en las muestras de cacao en la fase de almacenado presentaron un valor de 0,938 y 0,935 ppb de ocratoxina A tanto en la inyección 1 e inyección 2. Por lo tanto, llegamos a la **conclusión** de que los valores que arrojaron las muestras de cacao no superaron el límite de detección equivalente a 0,798 µg/kg; ambas inyecciones no superaron los límites permitidos por la legislación internacional. El estudio resalta la importancia de la trazabilidad de compuestos potencialmente dañinos en la cadena productiva de alimentos en el área de confitería de alta demanda a nivel nacional e internacional, con la finalidad de garantizar su calidad.

**Palabras clave:** Ocratoxina A, Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia, Columnas de Inmunoafinidad,

## ABSTRACT

Ochratoxin A is a nephrotoxic and carcinogenic mycotoxin capable of causing harmful effects to humans and animals. It is found in many foods, including cocoa and derivatives. The objective of this work was to determine and quantify the levels of ochratoxin A in *Theobroma cacao* L. "cacao" in the post-harvest phases and in artisanal chocolates from the district of Pisana - San Martín. Where the methodology was carried out with the extraction process, which was carried out using immunoaffinity columns and quantification by High Efficiency Liquid Chromatography. The samples of cocoa and artisan chocolates were collected in the district of Pisana, department of San Martín in the period 2018. The detection was carried out by fluorescence, at an excitation wavelength of 333 nm and an emission wavelength of 460 nm. The results obtained in the cocoa samples in the storage phase presented a value of 0.938 and 0.935 ppb of ochratoxin A both in injection 1 and injection 2. Therefore, we conclude that the values shown by the samples of cocoa did not exceed the detection limit equivalent to 0.798 µg/kg; both injections did not exceed the limits allowed by international law. The study highlights the importance of the traceability of potentially harmful compounds in the food production chain in the confectionery area of high demand at the national and international level, in order to guarantee its quality.

Keywords: **ochratoxin A, high efficiency liquid chromatography, immunoaffinity column**

## **INTRODUCCIÓN**

Actualmente, el mundo está invadido de enfermedades y en especial por enfermedades de tipo crónico (cáncer). Lo que, sin duda afecta a los seres humanos de una forma

severa sin importar edad, sexo o raza. Siendo este la segunda causa de muerte en el mundo como lo hace de manifiesto la Organización Mundial de la Salud (OMS) (1).

Las enfermedades crónicas de cualquier índole son un problema de salud pública que puede ser causado por alteraciones genéticas producidas por agentes externos carcinógenos, productos químicos, radiaciones, agente infeccioso, entre otros (1).

En efecto debemos considerar que las micotoxinas, que son producidas por hongos de tipo *Aspergillus* y *Penicillium*; poniendo énfasis en la Ocratoxina A, como un metabolito secundario producido por estos hongos, presentes en diversos productos procesados y no procesados incluyendo a los granos de *Theobroma cacao* L y derivados, los cuales representan un porcentaje importante de los productos de exportación, además de la elevada demanda nacional e internacional (2).

La ocratoxina A (OTA) está clasificada por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO/OMS) como un posible carcinógeno humano (grupo B). En estudios realizados en animales se ha documentado que la OTA es nefrotóxica, inmunosupresora, cancerígena y teratogénica, lo cual en su mayoría es provocado por la ingesta de alimentos contaminados por esta micotoxina (3-5)

A nivel local el uso prioritario de las almendras de cacao es realizado por el sector (industrial y artesanal) de la chocolatería. En la población peruana existe alta producción y uso cotidiano de las almendras de cacao y es importante el buen manejo y control de dichos granos a fin de evitar la contaminación por OTA en los diversos procesos de postcosecha, fermentado, secado y almacenado (6).

La contaminación por micotoxinas plantea un problema para los productores de cacao (exportaciones) y el sector que se encarga de elaborar productos afines, la identificación de la cantidad de ocratoxina A se relaciona con el nivel de problema.

## **CAPITULO I: EL PROBLEMA**

### **1.1. Planteamiento del problema.**

En la actualidad, el mundo está invadido de enfermedades y en especial por enfermedades de tipo crónico (cáncer). Lo que, sin duda afecta a los seres humanos de una forma muy drástica sin importar edad, sexo o raza. Siendo este la segunda causa de muerte en el mundo como lo hace de manifiesto la organización mundial de la salud (OMS) (1). Las enfermedades crónicas son un problema de salud pública que puede ser causado por alteraciones genéticas,

agentes externos carcinógenos, productos químicos, radiaciones o ciertos agentes infecciosos entre otros.

Es necesario tomar en cuenta las micotoxinas que son producidas por hongos como: *Aspergillus* y *Penicillium*, poniendo énfasis en la Ocratoxina A, siendo un metabolito secundario producido por estos hongos presentes en los granos de “*Theobroma cacao L*”, el cual tiene un papel principal de estudio en la investigación (2).

La ocratoxina A está clasificada como posible carcinógeno humano (grupo B) y en estudios realizados en animales se ha documentado que es nefrotóxica, inmunosupresora, cancerígena y teratogénica, lo cual en su mayoría es provocado por la ingesta de alimentos contaminados por esta micotoxina (3,5).

A nivel local la ingesta de las almendras de cacao, es de manera general en el área de industria (chocolatería). En la población peruana existe alta producción y un uso cotidiano de las almendras de cacao a nivel alimentario, es por ello que la importancia del buen manejo para su buena manipulación de dichos granos es de suma importancia y así poder evitar la contaminación por dicha micotoxina en los procesos de post cosecha, fermentado, secado y almacenado (6).

Por tanto la contaminación por micotoxinas plantea un problema para la inocuidad del cacao, según la cantidad de ocratoxina A se evidenciara el nivel de problema, mientras planteémonos la siguiente pregunta:

## **1.2. Formulación del problema**

¿Cuál es el nivel de ocratoxina A presentes en granos de *Theobroma cacao L*. y chocolates artesanales evaluada por el método de HPLC en el distrito de Pisana – San Martín 2018?

### **1.3. Objetivos de la investigación.**

#### **1.3.1. Objetivo General**

Comprobar el nivel de ocratoxina A en *Theobroma cacao* L. de las fases de post cosecha y chocolates artesanales en el distrito de Pisana - San Martín 2018.

#### **1.3.2. Objetivos específicos:**

1. Determinar el nivel de ocratoxina A en cacao *Theobroma cacao* L. “cacao Trinitario” en la fase de fermentación por el método de cromatografía Líquida de alta resolución.
2. Señalar el nivel de ocratoxina A del cacao *Theobroma cacao* L. “cacao Trinitario” en la fase de secado por el método de cromatografía Líquida de alta resolución.
3. Indicar el nivel de ocratoxina A del cacao *Theobroma cacao* L. “cacao Trinitario” en la fase del almacenado por el método de cromatografía Líquida de alta resolución.
4. Precisar el nivel de ocratoxina A presentes en los chocolates por el método de cromatografía Líquida de alta resolución.

### **1.4. Justificación de la investigación**

En la actualidad 32,5 Millones de seres humanos se enfrentan diariamente con el cáncer, siendo este un problema crítico en la humanidad, siendo el cáncer la segunda causa de muerte en nuestro país y creciendo estadísticamente a nivel mundial (1).

Tras varias investigaciones sobre las micotoxinas, se demuestra que son sustancias tóxicas producidas por algunas especies de hongos que causan

enfermedades como el cáncer, estos se encuentran en alimentos como el grano de cacao contaminado, a partir de un mal proceso de cosecha y post cosecha, donde la humedad favorece el crecimiento de dichos hongos productores de las mencionadas micotoxinas. Y el uso de dicho grano es altamente usado como insumo en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética (1,6).

Esta investigación pretende conocer la presencia de ocratoxina A en los granos de cacao trinitario, se comprobará y cuantificará los niveles de la micotoxina y en qué fase de la post cosecha hay más facilidad de contaminación, dichos granos lo obtendremos de un centro de acopio de Pisana -San Martín (1).

#### **1.5. Limitaciones de la investigación**

En el desarrollo de la investigación se presentaron las siguientes limitaciones:

1. Falta de apoyo en el ámbito económico por el costo elevado de lectura por cromatografía líquida de alta resolución.
2. Escasez bibliográfica en físico sobre estudios de este campo, lo que conllevó a extrapolar la información existente sobre el tema en el campo de bibliografía vía web.

## CAPITULO II: MARCO TEÓRICO

### 2.1. Antecedentes

#### 2.1.1. Antecedentes internacionales.

**Parra L, Quiroga S, et al. (2018)** Presentaron la investigación de aflatoxina B1 de aspergillu presente en arroz, su barrido y cuantificación por métodos fluorométricos y cromatografía líquida de alta resolución de alto rendimiento, donde el **Objetivo** fue la detectar y cuantificar la aflatoxina b1 por método fluorométricos y HPLC, para lo cual su **Metodología** analizar de 50 y 20 g de concentrado de arroz por HPLC y el **Resultado** arrojó acumulación promedio de aflatoxina b1 de 94, 93 y 24,64 ppb respectivamente. Por espectroscopia de fluorescencia se encontraron concentraciones promedio de 133, 37 y 27, 23 ppb. La concentración de aflatoxina b1 que se halló en ambas formas, muestra una diferencia significativa ( $p < 0, 05$ ) con respecto a la cantidad de sustrato, siendo mayor la concentración de aflatoxina b1 con mayor cantidad de arroz en el medio, en **conclusión**, la sensibilidad de estos métodos nos permite detectar esta toxina a partir de 6 ppb. (7).

**Champion E. (2017)** Presentó la dinámica de microorganismos que intervienen directamente en el contagio del grano de *Theobroma cacao* L. con OTA en México. **El Objetivo** fue evaluar la dinámica de bacterias y levaduras, además distinguir su influencia sobre la presencia de hongos toxigénicos y la transmisión de ocratoxina A. En **la Metodología** la extracción y la amplificación de ADN de las muestras de cacao por “reacción en Cadena de la Polimerasa”, se obtuvo el perfil de la electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización de hongos. En lo cual se identificaron 59 cepas de hongos, de las cuales *Aspergillus carbonarius*, *Penicillium*, *Penicillium lividum*, *Penicillium sizovae* y *Aspergillus steyni* y se obtuvo como **Resultados** el porcentaje total de infección por hongos fueron apartados y caracterizados por biología molecular y su capacidad de producir ocratoxina A, **Concluyendo** que la investigación facilita identificar los posibles riesgos y los puntos críticos de contaminación por ocratoxina A (8).

**Jacqueline A, et al. (2014)** Presentaron la Mangiferina es una glicosilxantona natural presente en distintas partes del árbol de *Mangifera indica* L., el cual presenta una amplia categoría farmacológica. Donde el **objetivo** fue instaurar una metodología para determinar el contenido de Mangiferina en las hojas de *Mangifera Indica* L. por HPLC. La **metodología** para calcular el metabolito en las hojas, previamente secadas y pulverizadas, la división se realizó por una columna cromatográfica Luna RP-18 (5 m) (250 x 4 mm), con detector UV a 254 nm usando un gradiente de fase móvil A compuesta de Acético ácido 0,2%: acetonitrilo (85:15) y móvil fase B: Acetonitrilo y la cuantificación de este frente a una muestra de referencia utilizando el método del estándar externo. El **resultado** dio luz a la siguiente ecuación de curva de regresión de Mangiferina;  $Y = 3,5561 X + 6536,55$  ( $r = 0,999$ ) El porcentaje recobrado fue de 99,41 con un coeficiente de

variación inferior al 2 %. Los límites de detección y cuantificación arrojaron valores de 0.0009 y 0,001 respectivamente. En **conclusión**, la metodología es sencilla y verás, que consigue ser utilizado para el control de calidad y estudio de estabilidad de las hojas de *Mangifera Indica* L. (9).

**Romero J, Rodríguez O, et al. (2014)** Presentaron la investigación de la **Caracterización de las prácticas de cosecha y pos cosecha y niveles de ocratoxina A del cacao en zonas productoras de la republica dominicana** donde el **Objetivo** fue cuantificar los niveles de ocratoxina A presentes por tipos de cacao y zonas de producción. La **Metodología** fue con 379 encuestas y se tomaron 185 muestras de cacao en 15 de las principales zonas productoras de cacao a nivel nacional, arrojando un **Resultado** indicando que la mayoría de productores y centros de acopio realizan prácticas adecuadas practicas durante la cosecha y pos cosecha del cacao. En siete de las 15 zonas, los niveles de ocratoxina A fueron relativamente bajos con una media de 1,12 partes por millón (ppm). La **Conclusión** fue que el cacao de las diferentes zonas productoras tuvo un bajo nivel de ocratoxina A de 1,12 ppm (10).

**Ravelo A, Rubio A, Gutiérrez F y Hardisson de la T. (2011)** Presentaron la ocratoxina A en alimentos de consumo humano: revisión. El **objetivo** es hallar presencia de ocratoxina A en diferentes granos, así como actualizar el conocimiento sobre su toxicidad, mecanismo de acción, métodos de análisis utilizados para su detección y cuantificación, y diferentes aspectos sobre su legislación. En la **metodología** se buscó y seleccionó, en base a los criterios de inclusión, artículos y publicaciones relacionados con los mecanismos de acción, toxicidad, análisis y

legislación de la ocratoxina A en alimentos, publicados en las bases de datos de MEDLINE/PubMed, Scielo, Science Direct, Ebscohost. En el **resultado** se halló ocratoxina A (OTA) en distintos grupos de alimentos. Los valores detectados son inferiores a los permitidos por la legislación vigente. Sin embargo, se manifiesta métodos agro tecnológicas de producción poco adecuadas; además de un incorrecto mantenimiento de ciertos alimentos, lo cual siguen constituyendo puntos de control crítico para evitar los riesgos tóxicos derivados de la exposición humana. La **conclusión** es que por la falta de buenas prácticas de agricultura la micotoxina llamada ocratoxina A es un problema de salud, lo cual requiere que se promueva las buenas prácticas agro tecnológicas sobre las materias primas y productos transformados (11).

#### **2.1.2. Antecedentes nacionales.**

**Ramos N, Castro A, et al. (2018) Realizaron la investigación de la** Evaluación de OTA en *Theobroma cacao* L. "Cacao trinitario", por HPLC y análisis micotoxigénico durante las etapas de cosecha, fermentado, secado y almacenado de la región de san Martín con un **objetivo** de analizar la existencia de ocratoxina A, una micotoxina con características carcinogénicas, en los granos de *Theobroma cacao* L. "cacao trinitario" para lo cual se usó el acetonitrilo al 60% como metodología y purificando la muestra mediante columnas de inmutofinidad y posterior. En el **resultado** se pudo ver que los granos valorados en las diferentes fases de producción de granos de cacao no evidenciaron la existencia de OTA; mientras que en el análisis micotoxigénico se demostró la presencia de hongos del género *Fusarium*, *Penicillium* y levaduras. Como **conclusión** se puede mencionar que se halló la presencia de ocratoxina A en bajas concentraciones a lo establecido,

además con el análisis micotoxigénico se probó la existencia de hongos del género *Fusarium*, *Penicillium*, levaduras (12).

**Ramos N, Castro A, et al. (2016)** Realizaron la investigación de la **evaluación de ocratoxina A en *Theobroma cacao* L. “cacao blanco” durante el proceso de cosecha, fermentado, secado y almacenado en Piura.** El objetivo fue determinar la existencia de ocratoxina A en los granos de cacao blanco en Piura; dicho análisis se realizó con la siguiente **Metodología**, las muestras se recaudaron en las fases de la producción: cosecha, fermentado, secado y almacenado; además el análisis se hizo en la cáscara de la almendra de cacao llamada, cotiledón. Las muestras fueron colectadas del centro de acopio de la Asociación de Pequeños Productores de Cacao de Piura (APPROCAP). La ocratoxina A se extrajo de las muestras utilizando bicarbonato de sodio 1%, se purificó mediante columnas de inmunoafinidad y su posterior cuantificación por cromatografía líquida de alto rendimiento (CLAR). El **Resultado** fue positivo para ocratoxina A en una concentración ( $1,92 \pm 0,02$   $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Las fases de cosecha, secadas y almacenadas en el desarrollo de producción los granos de cacao no manifestaron presencia de ocratoxina A. en **Conclusión**, se indica que el cacao blanco de Piura presenta ocratoxina A en la fase de fermentado, la más propensa a sufrir dicha contaminación (13).

**Chire G, Valdivia R, Ureña M. (2014)** Presentaron la investigación de ocratoxina A en cacao y derivados, donde el **objetivo** fue determinar la presencia de ocratoxina A (OTA) en cacao y sus derivados, y la **metodología** que se realizó fue por revisión bibliográfica vía sistemática, donde se buscaron artículos científicos de investigadores que trabajan en la cadena productiva del cacao y sus derivados, de

diferentes países del mundo a través de las bases de datos Scielo, Science Direct, TEEAL y Scopus. Donde todas las muestras **resultaron** positivas a ocratoxina A con 48,8% (20 de 41 muestras). En **conclusión**, los datos obtenidos arrojan valores que superan los niveles permisibles de 0,20 µg/kg (14).

## 2.2. Bases teóricas

### a) Descripción botánica del *Theobroma cacao* L.

El cacao pertenece a la familia de las *Sterculiaceae*, su nombre científico es *Theobroma cacao* L. fue impuesto por el botánico sueco Carlos Linneo. Los frutos tienen la forma y el tamaño de pequeños melones (aproximadamente de 15 a 35 cm de largo, de 8 a 10 cm de diámetro) con coloraciones como el amarillo, rojo y púrpura; son de pericarpio rugoso y fibrosos mesocarpio blando y blanco; las semillas son abundantes (20 a 50 por fruto) se presentan envueltas por una pulpa blanca, son de color blanco a violeta y muy amargas (figura 1 y 2) (15).

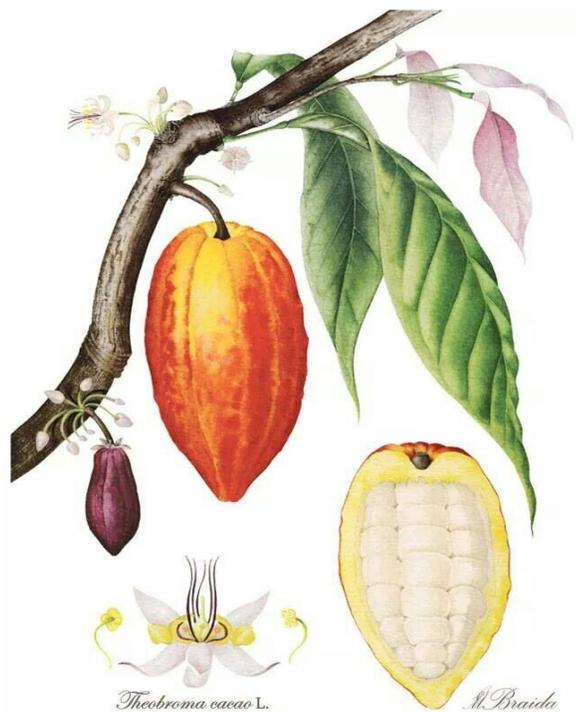


Figura 1. Ilustración de fruto, hojas y flores del *Theobroma cacao* L (16).

### **Clasificación taxonomía del *Theobroma cacao* L.**

Sistema de Clasificación de Cronquist (1988). Tiene la siguiente posición taxonómica:

“división”: magnoliophyta

“clase”: magnoliopsida

“subclase”: dilleniidae

“Orden”: malvales

“familia”: sterculiaceae

“género”: *Theobroma*

especie: *Theobroma cacao* L.

Nombre común: cacao, cacau, cacau verdadeiro, cocoa y chocolate-trece.



Figura 2. Foto de los frutos de *Theobroma cacao* L (17).

### **Grupos genéticos del cacao**

- 1. Forastero:** Proveniente de la cuenca de Amazonas, Debido a su alta resistencia de este tipo de cacao, su cultivo representa un 85 % de la producción mundial (figura 3) (18).

2. **Criollo:** Tiene su origen en América Central precolombina. Esta variedad es conocido por su alta calidad, posee un fruto de cascara delgada, de color amarillo o rojo y una semilla de grande y redonda de color blanco o ligeramente purpura (figura 3) (18).
3. **Trinitario:** Este es el cacao que corresponde a la población hibrida derivada de Criollos y Forasteros. Al igual que el criollo, este cacao posee características óptimas que lo hacen que sea requerido por los amantes y consumidores de chocolate (figura 2 y 3) (19).

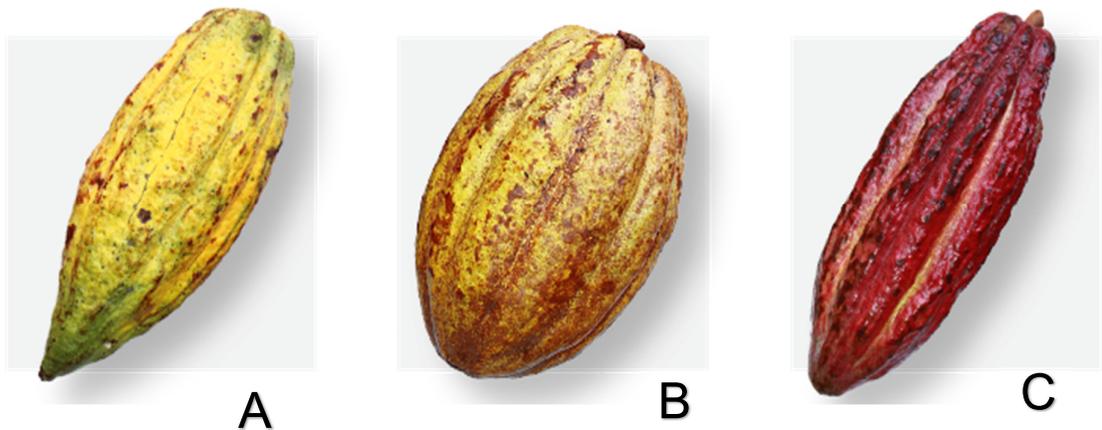


Figura 3. Principales grupos genéticos del cacao (20).

(A: izquierda: criollo; B: centro: forastero, C: derecha: trinitario)

### **Distribución y condiciones geográficas**

Es una especia nativa de la región tropical de América, probablemente originaria de la Amazonía occidental. En la cuenca amazónica, se distribuye en Bolivia, Brasil, Colombia, Venezuela, Surinam y Guyana. En la selva peruana se cultiva en los Departamentos de Loreto, San Martín, Ucayali, Huánuco, Junín, Pasco, Madre de Dios, Cuzco y Ayacucho (21).

El cacao es exigente en cuanto a sus requerimientos climáticos, para un óptimo crecimiento y producción. Temperaturas de 24-29°C son adecuados; cuando jóvenes son sensitivas a temperaturas superiores a 32°C que pueden ocasionar daños a las hojas jóvenes, lo que explica la necesidad de mantener lejos de la radiación solar, para establecer el cacao; la temperatura del mes más frío no debe ser menor de 15°C (21).

El cacao es también dependiente de las cantidades de lluvia; la ausencia, reducción o en exceso puede ocasionar pérdida de cosecha. El crecimiento óptimo demanda una precipitación mínima mensual de 100 mm. y no debe exceder los 200 mm mensuales porque las raíces son sensitivas a la pobre aireación. La precipitación ideal para el cacao en los trópicos es alrededor de 175 mm por mes, distribuido en forma homogénea. Excesiva humedad, superior a 90%, también afecta al cacao. El límite máximo de altitud es de 1000 msnm (21).

Desarrolla en terrenos no inundables, preferentemente en suelos fértiles, ricos en materia orgánica, profundos, con buen drenaje y pH 3,9 que puede manejarse con fertilización. Resiste la inundación temporal de ciclo reducido (21).

### **Fases de la postcosecha del cacao**

- 1. Fermentación** Mediante este proceso se retira la pulpa exterior o mucílago que recubre el grano fresco, se mata el germen y se obtiene buena calidad (se produce el aroma y sabor del chocolate), y se presenta a las almendras (22).
- 2. Secado:** Después de la fermentación, la humedad de las almendras ronda el 55%, que debe reducirse al 7 u 8%, que es la humedad que debe almacenarse y venderse.

Durante este período de tiempo, los granos de cacao han completado los cambios, obteniendo así el aroma y sabor del chocolate (22).

- 3. Almacenado:** El almacenamiento del cacao juega un papel preponderante. Si no es realizado en perfectas condiciones todo el esfuerzo realizado en obtener un producto de calidad puede echarse a perder. El ambiente donde se va almacenar debe estar exento de olores extraños, como los provenientes de pesticidas, combustible, alimentos con olores penetrantes, etc. Se debe evitar del todo la contaminación por humo (22).

#### **b) Micotoxinas**

Los hongos o mohos son ubicuos, y algunos de ellos son específicos al producir metabolitos secundarios tóxicos conocidos como micotoxinas, un término derivado de “*myco*” que significa hongo y “*toxina*” que significa químico tóxico. Las micotoxinas son productos naturales de bajo peso molecular que son tóxicos para humanos y animales, incluso a bajas variables. Muchos mohos infectan las plantas durante la temporada de crecimiento y son la causa de la producción posterior de micotoxinas. La cantidad y concentración de micotoxinas producidas depende de las condiciones ambientales, el tipo de cultivo, el clima, la lluvia, la temperatura y la humedad. Cuando las plantas crecen en el campo, los granos están predominantemente contaminados por mohos que tienen altas actividades de agua ( $> 0,88$ ) para crecer (23).

En el almacenamiento, algunos granos producirán el crecimiento de mohos que requieren menos actividad de agua. Por lo tanto, la cosecha y las

prácticas de almacenamiento también pueden afectar el crecimiento de moho y la producción de micotoxinas.

Los géneros de moho con interés por la salud pública incluyen *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Claviceps* y *Stachybotrys*. Muchas especies de estos géneros tienen la capacidad de producir varios tipos de micotoxinas las cuales son perjudiciales para la salud.

La contaminación de alimentos y piensos con micotoxinas es un problema mundial (figura 4) (24).

En los países desarrollados, el consumo humano de productos agrícolas con moho es poco probable, pero el consumo de alimento contaminado por animales de granja existe una mayor probabilidad. En consecuencia, la contaminación por micotoxinas puede ser un importante problema de salud animal en lugar de un problema de salud humana en los países desarrollados. En los países en desarrollo, la escasez de suministros de alimentos, las malas prácticas de manipulación de alimentos y las malas condiciones de almacenamiento causan altos niveles de exposición a micotoxinas en humanos (figura 5) (24, 25).

Se han descubierto varios metabolitos secundarios del moho, pero solo aproximadamente 400 de ellos están clasificados como micotoxinas. Las micotoxinas pueden exhibir diferentes efectos adversos en animales, seres incluyendo toxicidad aguda en seres humanos, carcinogenicidad, mutagenicidad, teratogenicidad, inmunotoxicidad y estrogenicidad. (26).

Los síndromes toxicológicos son a causa de la ingesta de alimentos contaminados de micotoxinas, por tanto, la enfermedad se conoce como

micotoxicosis. A medida que se entienden mejor las toxicidades de estas toxinas, está claro qué control reglamentario es necesario para limitar la cantidad de contaminación en los alimentos. La comida es esencial y debe ser nutritiva, segura, saludable y asequible. La imposición de límites reglamentarios a las cantidades de micotoxinas permitidas en los alimentos que tienen los alimentos que tienen más seguros, pero también pueden causar algunas cargas económicas en los productores, procesadores y consumidores (27).

Los factores utilizados para determinar cuáles de las muchas micotoxinas conocidas son significativas incluyen la frecuencia de su aparición y la gravedad de las enfermedades que producen.

Las micotoxinas que se ha determinado que son significativas desde una perspectiva de salud pública son las aflatoxinas, el deoxinivalenol (DON), los alcaloides del cornezuelo de centeno, las fumonisinas (FB), la ocratoxina A, la patulina (PAT) y la zearalenona (ZEA) (28).

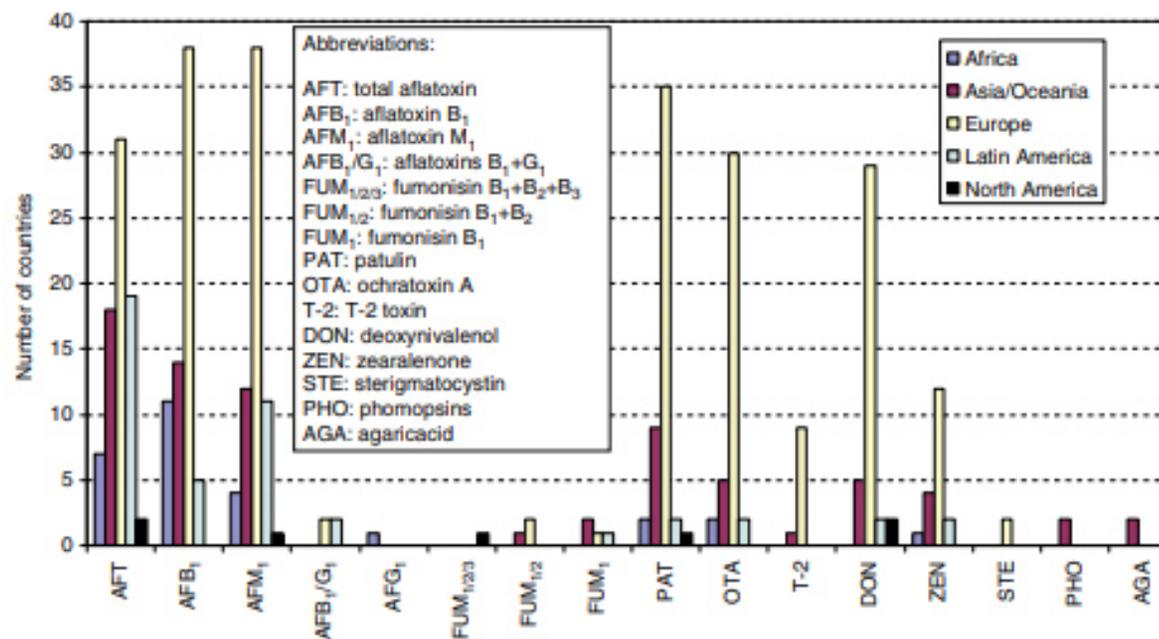


Figura 4. Cambios en la regulación de las micotoxinas en alimentos (29).

En la Figura 4 se observa. Cantidad de países que regularon sus límites de mico toxinas en alimentos para humanos según la organización de las naciones unidad para la alimentación y la agricultura (FAO).

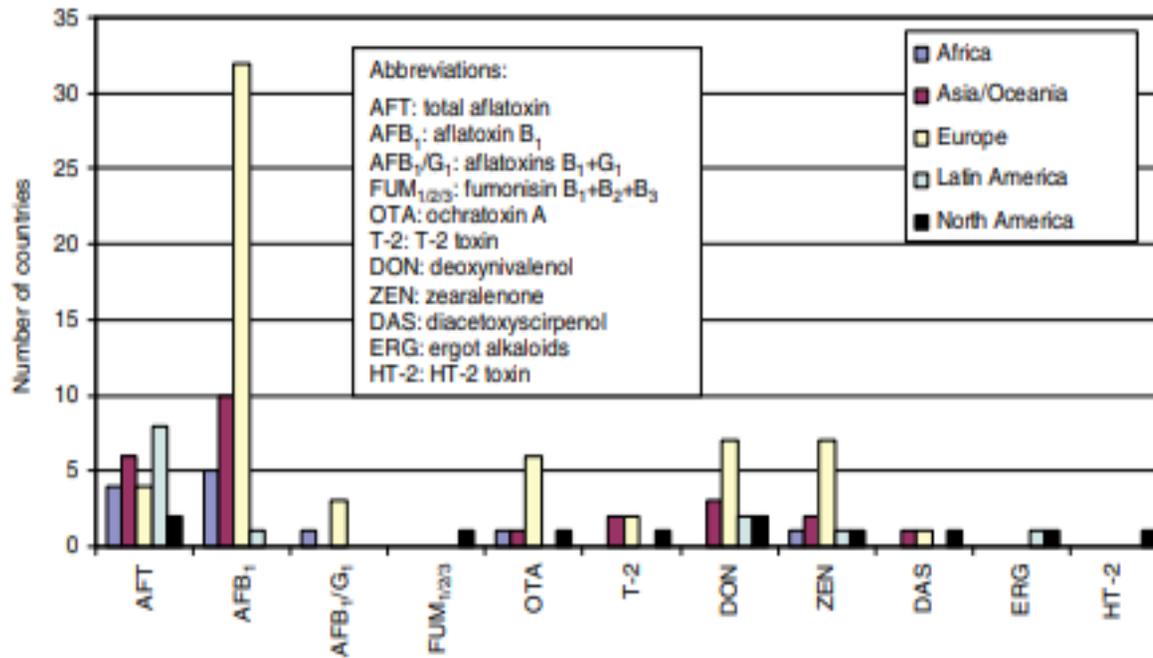


Figura 5. Cambios en la regulación de micotoxinas en los tiempos (29).

En la Figura 5 se observa. Cantidad de países que regularon sus límites de micotoxinas en alimentos para animales. Según la organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura (FAO).

## **Tipos de Ocratoxinas**

Los hongos que producen ocratoxinas se encuentran alrededor del mundo, comúnmente en alimentos para animales y humano. Se encuentran con grandes frecuencias en los países balcánicos y escandinavos. Hay tres ocratoxinas principales (OTA, OTB y OTC), pero la ocratoxina A (OTA) ocurre naturalmente con mayor frecuencia en una variedad de granos de cereales (cebada, trigo, avena, maíz y frijoles), maní, frutas secas, uvas / pasas, queso, y otros productos alimenticios. La OTA acumula en la cadena alimentaria debido a su larga vida media (23, 30).

Se ha reportado que los niveles de la ocratoxina A (OTA) y otras micotoxinas (citrinina), son significativamente menores en los alimentos para humanos comparado a los alimentos para animales. Durante el procesamiento y la cocción de los alimentos humanos, la citrinina se elimina casi por completo y la la ocratoxina A (OTA) se reduce significativamente (30).

En comparación con la ocratoxina A (OTA); la ocratoxina B (OTB) y la ocratoxina C (OTC) rara vez se encuentran y son menos tóxicos. Tanto la OTA como la citrinina son nefrotoxinas bien conocidas. También se sabe que la OTA posee propiedades genotóxicas, cancerígenas, reproductivas, de desarrollo y teratogénicas, inmunotóxico, neurotóxico, mutagénico (figura 6) (30-31).

En humanos, la exposición a la ocratoxina A (OTA) y citrinina se ha relacionado con Nefropatía endémica de los Balcanes (BEN), una enfermedad renal crónica asociada con tumores del sistema renal, que puede ser fatal. Sin embargo, algunos investigadores han dudado de la ocratoxina A (OTA) como factor etiológico en BEN (32).

La concurrencia de citrinina con OTA se ha implicado en la nefropatía de los cerdos en Dinamarca, Suecia, Noruega e Irlanda. La citrinina y la la ocratoxina A (OTA) también están involucradas en las nefropatías aviarias. Se han detectado residuos de la ocratoxina A (OTA) en los tejidos de los cerdos en los mataderos, y se ha demostrado, en condiciones experimentales, que todavía se pueden detectar residuos en los tejidos un mes después del final de la exposición. Debido a la larga vida media de la OTA en los sistemas biológicos y de alimentación, se han planteado serias preocupaciones sobre la salud animal y el consumo humano de carne (32).

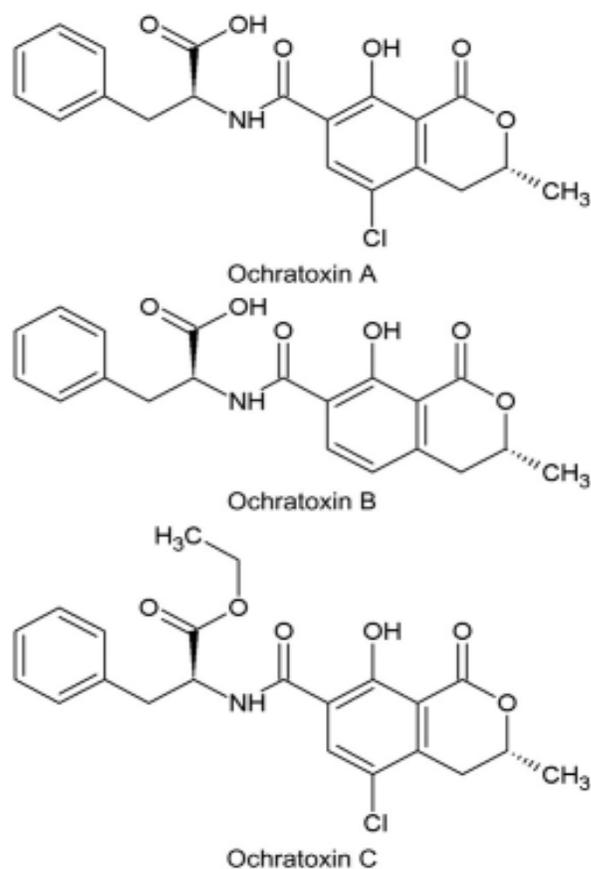


Figura 6. Tipos de ocratoxinas (parte superior: Ocratoxina A “OTA”, parte central: Ocratoxina B “OTB”, parte inferior: Ocratoxina C “OTC”) (11).

## Ocratoxina A

La ocratoxina A es un derivado de la fenilalanina resultante de la condensación formal del grupo amino de L-fenilalanina con el grupo carboxi de (3R) -5-cloro-8-hidroxi-3-metil-1-oxo-3,4-dihidro. Ácido 1H-2-benzopirán-7-carboxílico (ocratoxina alfa).

La aparición de ocratoxinas ha recibido atención recientemente. La OTA es la principal micotoxina fluorescente de este grupo, producida principalmente por los hongos *Aspergillus ochraceus* y *Penicillium verrucosum*. La OTA se produce en productos agrícolas principalmente durante el almacenamiento. Existen numerosos informes de presencia de OTA en uvas, granos, granos de café, cacao, frutas secas, frijoles secos, jengibre, regaliz, vino, piensos y salchichas de cerdo. Es una toxina renal y es cancerígena en ratas y ratones. Se sospecha que la OTA es la causa de la nefropatía endémica de los Balcanes, una enfermedad que se informa que ocurre en algunos humanos en la Unión Europea. Debido a su lenta eliminación del cuerpo, la OTA puede acumularse en tejidos y fluidos corporales de humanos y animales que consumen alimentos contaminados con OTA (33).

Dado que la OTA se une a las proteínas del suero sanguíneo y tiene una vida media de eliminación prolongada en los animales, es posible una transferencia de OTA en la cadena alimentaria. En América del Norte, la OTA no es tan común debido a la existencia de diferentes condiciones climáticas. Sobre la base de datos toxicológicos de estudios en animales y otra información pertinente relacionada con el procesamiento y almacenamiento de ciertos granos, el Comité del Codex sobre Contaminantes en los Alimentos (CCCF) ha redactado un documento que recomienda un nivel máximo para OTA y aflatoxina en trigo crudo, cebada y centeno de 5 mg/kg. El CCCF ha propuesto un

proyecto de prácticas para la prevención de la contaminación por OTA en el vino. También ha habido preocupación por el traspaso de OTA de la cebada a la cerveza (34).

### **Impacto de la Ocratoxina A en animales**

Se han atribuido varios efectos tóxicos después de la exposición como la nefrotoxicidad, así como los impactos negativos en el rendimiento (crecimiento y reproducción) de los animales de granja, teniendo implicaciones económicas importantes. Es importante para la ruta de exposición humana conocer el traspaso de OTA de los primeros a los productos derivados de animales (35).

A pesar de que se ha detectado OTA en el aire de las granjas, como los gallineros y los establos, la inhalación de aire contaminado con OTA y conidias fúngicas representa un hecho raro y aún no es una fuente de exposición exhaustivamente investigada (36).

En cambio, los piensos contaminados se consideran la principal fuente de exposición de OTA a los animales de granja. De hecho, la mayoría de los cereales, granos y otros derivados alimenticios son propensos al crecimiento de hongos. La preocupación es la desviación de alimentos para animales hacia productos con crecimiento visible de moho o con niveles de OTA por encima de los niveles máximos permitidos en alimentos destinados al consumo humano. Las consecuencias pueden ser un brote de ocratoxicosis, siendo un peligro al humano por el consumo de productos derivados de animales contaminado (36).

A pesar de una serie de posibles impactos en la salud humana que podrían surgir, existen lagunas de datos importantes que impiden evaluaciones exhaustivas de los riesgos para la salud humana asociados con la alimentación animal. La presencia de OTA en materias primas y piensos terminados requiere un monitoreo periódico para prevenir las

micotoxicosis en la producción animal, reducir las pérdidas económicas y minimizar los riesgos para la salud humana.

En la Unión Europea (UE) también se necesitan acciones de control y monitoreo, ya que se ha permitido el uso de aditivos para reducir la contaminación por micotoxinas, incluida la OTA. En ausencia de tales acciones, es posible que el uso de estas sustancias eventualmente sirva para cubrir o enmascarar alimentos contaminados (37).

Además, aunque la OTA es reconocida como una sustancia indeseable en la alimentación animal, solo existen valores orientativos para los productos destinados a la alimentación animal en la UE, según los resultados de las evaluaciones de exposición que indican que los alimentos de origen animal realizan una pequeña contribución a la exposición dietética humana total a OTA (37,38). Estos valores no obligatorios establecidos por la recomendación (CE: Comisión Europea) son DE 250 mg / kg en el caso de los cereales y productos derivados de cereales y complementarios y completos son 50 y 100 mg/kg para los cerdos y aves de corral, respectivamente (34).

En general, es muy difícil determinar el grado de contaminación por micotoxinas en la variedad de cereales que existen. Las micotoxinas se distribuyen de manera desigual en el alimento, lo que introduce una cantidad significativa de error de muestreo en los análisis de muestras. Además, existe una amplia variabilidad geográfica y temporal en la aparición de micotoxinas en alimentos que se atribuye parcialmente a factores ambientales, es decir, lluvia, humedad (39).

Los detalles sobre el perfil de contaminación con OTA encontrados para diferentes alimentos en las encuestas reportadas. Es importante enfatizar que la coexistencia de micotoxinas a menudo se encuentra en las muestras de alimentos. Por ejemplo, en la

alimentación de aves se detectó OTA en coexistencia con zearalenona (ZEA), y aflatoxina (AF), fumonisinas (FB), desoxinivalenol (DON) y ZEA simultáneamente (39).

En granjas de cerdos y pollos en Bulgaria se presentaron problemas de nefropatía (riñones agrandados y manchados o pálida) al momento del sacrificio, también mostraron coocurrencia de OTA con ácido penicílico (PA), ZEA, entre otros. La contaminación de los piensos destinados al consumo animal se ha considerado tradicionalmente solo para animales de producción convencionales, como aves de corral, cerdos y vacas (40).

La mayor contaminación entre las muestras de alimentos orgánicos puede originarse no necesariamente en el sistema de producción en sí, sino en las prácticas de manejo inapropiadas, que pueden ser más frecuentes en la agricultura orgánica, como las condiciones de almacenamiento que pueden conducir al desarrollo de hongos de almacenamiento (41).

## **Métodos de cuantificación**

### **1. ELISA.**

ELISA se ha convertido en una herramienta de detección popular y útil debido a la disponibilidad de anticuerpos policlonales y monoclonales contra varias micotoxinas, incluida la OTA. La mayoría de las pruebas comerciales para micotoxinas se basan en un formato ELISA competitivo y heterogéneo, donde la toxina de la muestra compite con una toxina marcada (como una conjugada toxina-enzima) por un número limitado de sitios de unión de anticuerpos. Los métodos ELISA tienen ventajas debido a su simplicidad y un elevado número de muestras que pueden analizarse al mismo tiempo, pero solo para una micotoxina (figura 7). Sin embargo, ELISA es menos preciso y sensible que los ensayos cromatográficos convencionales. Además, se observan

resultados falsos positivos o negativos debido a reacciones cruzadas entre moléculas o interferencias. Por lo tanto, los kits ELISA no deben usarse como un método cuantitativo y solo deben usarse con alimentos para los cuales han sido ampliamente probados y demostrados que funcionan sin interferencias (42).



Figura 7. Test comercial de ocratoxina A, producido por AgraQuant® (43).

## 2. Cromatografía de capa fina- TLC

La TLC ha sido la técnica de separación y detección más utilizada y establecida para las aflatoxinas desde su desarrollo en la década de 1960.

El TLC siempre debe considerarse una herramienta importante porque es rápido, simple, rentable y robusto; es versátil en el uso de diferentes sistemas de solventes; y es aplicable a diferentes sistemas de visualización usando el mismo extracto de muestra. Muchos laboratorios en los países en desarrollo tienen una considerable experiencia y experiencia en esta técnica, lo que les permite evaluar la contaminación por OTA, independientemente de si el propósito de la evaluación es cualitativo o cuantitativo. Sin embargo, la cuantificación sigue siendo un factor limitante debido al alto costo comercial fluorodensitómetros, que de otro modo podrían disminuir la variabilidad asociada con la capacidad de los analistas individuales para cuantificar visualmente la toxina. Una de las desventajas de la TLC es su falta de poder de separación y, por lo tanto, su incapacidad

para discriminar cualquier posible interferencia extraída conjuntamente de las toxinas de interés (figura 8) (44).

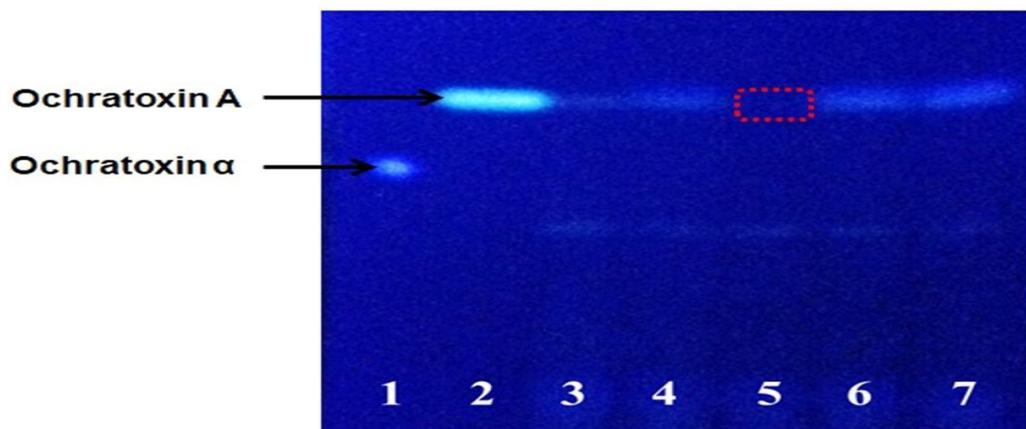


Figura 8. Identificación de OTA y ocratoxina alfa mediante TLC (45).

### 3. Cromatografía líquida (LC) y Espectrómetro de Masas (MS)

La técnica más utilizada para el análisis de OTA es LC, es decir, HPLC y, más recientemente, LC / MS o incluso LC / MS / MS. La fluorescencia natural de la OTA se ha utilizado con fines de detección, con varios métodos analíticos que utilizan HPLC-FLD publicado para la determinación de OTA, logrando límites de detección bajos. Estos métodos incluyen generalmente un paso de purificación anterior utilizando columnas SPE o de inmunoafinidad (45).

En cuanto al método de separación cromatográfica, la mayoría de los métodos de HPLC utilizan una columna de fase inversa para la separación y una solución acuosa ácida mezclada con acetonitrilo o metanol como fase móvil. Las fases móviles ácidas han sido preferibles para la separación de OTA, porque OTA es un compuesto polar, con un grupo carboxilo en la estructura y, por lo tanto, debe someterse a cromatografía en forma ionizada para interactuar con la fase estacionaria. LC-MS / La MS es una de las técnicas más avanzadas y en polvo disponibles para la detección e identificación de

micotoxinas, particularmente para aquellos con absorción reducida de ultravioleta / visible (UV / VIS) o fluorescencia nativa como OTA. Sin embargo, los métodos requieren mucho tiempo y requieren conocimientos expertos. Las técnicas de extracción y limpieza deben aplicarse antes de la separación y detección para permitir picos bien separados sin interferencia de los componentes de la matriz. Se informó por primera vez de un nuevo método, en el cual la OTA en el café tostado es analizada por LC-MS / MS. Los resultados de este método proporcionan buenos resultados en términos de linealidad, especificidad, precisión, precisión, límite de detección y cuantificación para la determinación de ocratoxina A (OTA) en café tostado (46,47).

### **2.3. Formulación de Hipótesis**

#### **Hipótesis nula**

Ho: El nivel de ocratoxina A en los granos de *Theobroma cacao* L. en las fases de fermentado, secado y almacenado es menor o igual que el límite máximo permisible establecido por el Código Alimentario internacional.

#### **Hipótesis alternativa**

H1: El nivel de ocratoxina A en los granos de *Theobroma cacao* L. en las fases de fermentado, secado y almacenado es mayor que el límite máximo permisible establecido por el Código Alimentario internacional

## CAPITULO III: METODOLOGIA

### 3.1. Método de investigación

El tipo de investigación corresponde al método de investigación hipotético deductivo ya que la base teórica que pudimos encontrar arroja valores de ocratoxina A que superan el límite máximo permisible por el CODEX y las muestras de grano de cacao y barra de chocolate podrían presentar un nivel de ocratoxina A dañino para la salud y ello se probaría mediante una prueba analítica cuantitativa para determinar una valor numérico en cada fase de post cosecha del cacao *Theobroma cacao L.* y también en el chocolate artesanal por el método de HPLC.

### 3.2. Enfoque y diseño

El estudio realizado presenta un enfoque **cuantitativo** debido a que se obtuvo un resultado numérico del análisis que se realizó a los granos de cacao y las barras de chocolate y los diseños fueron: **descriptivo** ya que recogimos los datos en función de la variable, **transversal** se debe a la toma de información del estudio que vienen a ser las almendras de cacao analizados en un momento y tiempo definido y **prospectivo** ya que las muestras se recolectarán después de la planeación (48).

### 3.3. Población, muestra y muestreo

La población de la investigación fueron los frutos maduros de *Theobroma cacao L.* Provenientes del departamento de san Martín, pisana,

las cantidades de las fases de post cosecha fueron las siguientes: Fermentado (315 granos), secado (315 gramos), almacenado (1250 granos) y las barras de chocolate (8 barras), las cuales se tomaron basadas al método de Military Standard (49).

Las actividades de muestreo es de tipo probabilístico, ya que la toma de muestra para cada fase se consideró el método ya mencionado (49), para la fase del fermentado se tomó 315 unidades de almendras a partir de 600 kg de dichas semillas; para la fase de secado se tomó 315 unidades de almendras a partir de 600 kg de dichas semillas, a su vez para la fase de almacenado se tomó 1250 unidades de almendras a partir de 7000 kg de dichas semillas y por último los chocolates se tomó 8 barras de muestra a partir de 50 barras de forma aleatoria para todas las fases incluida las de chocolate artesanal, se realizaron a temperatura ambiente y humedad atmosférica característica de la zona en el periodo comprendido en el mes de julio. Las muestras fueron rotuladas y transportadas al departamento de Lima para el tratamiento de la muestra y análisis.

#### **3.4. Variable de estudio**

##### **Variable Independiente**

*Theobroma cacao* L. en la fase de fermentado, Secado, almacenado y chocolates

##### **Variable Dependiente**

Nivel de ocratoxina A.

## **a. Técnica e instrumentos de recolección de datos**

### **1. Técnica analítica para la cuantificación de ocratoxina A**

Al tratarse de una investigación cuantitativa de extremada sensibilidad los instrumentos de medición deben estar verificados con soluciones estándar con la finalidad de reportar un resultado veraz.

### **2. Los instrumentos utilizados fueron:**

- Cromatógrafo Líquido de Alto Rendimiento-SHIMADZU: desgasificador DGU-20A5R, automuestreador SIL-30AC, bomba cuaternaria LC-30AD, horno de columna: CTO-20AC, detector de fluorescencia RF-20Axs, control de sistema SBM-20A. Columna cromatográfica RP C18 de 250 mm x 4,6 mm ID x 5  $\mu$ m partícula (Restek) .
- Columnas de inmunoafinidad NEOCOLUMN

## **b. Proceso de recolección de datos**

### **1. Materiales**

- Tubos de ensayo de material de vidrio.
- Matraces de 250 mL.
- Probetas de 25, 50 y 100 mL.
- Vasos de precipitados de 50, 100, 250 y 500 mL.
- Fiolas de 10, 25, 500 y 1000 mL
- Pipetas 5mL, 10mL y 20mL
- Embudo de vidrio.
- Baguetas de 6mm de diámetro y 40 cm de longitud.
- Micropipetas de 20-200 $\mu$ L

- Micropipetas de 100 – 1000 $\mu$ L
- Gradillas de madera
- Puntas para micropipeta (BOECO)
- Soporte universal de metal
- Pinzas de madera
- Papel de filtro Whatman N°42
- Útiles de seguridad personal (guantes de látex (ENDOGLOVE), mascarilla simple (ALKHOFAR), lentes de protección (INDUMELAB), mandil (INDUMELAB)).

## **2. Equipos**

- Cromatógrafo Líquido de Alto Rendimiento-SHIMADZU: desgasificador DGU-20A5R, automuestreador SIL-30AC, bomba cuaternaria LC-30AD, horno de columna: CTO-20AC, detector de fluorescencia RF-20Axs, control de sistema SBM-20A. Columna cromatográfica RP C18 de 250 mm x 4,6 mm ID x 5  $\mu$ m partícula (Restek).
- Agitador magnético Thermo Scientific Cimarec
- Agitador magnético IKA C-MAG HS7
- Balanza analítica GR-300 AND
- Baño ultrasónico WISD
- Ultrapurificador de agua ELGA PURELAB CLASSIC UV
- Columnas de inmunoafinidad NEOCOLUMN

## **3. Insumos químicos**

- Estándar de Ocratoxina A 99,18% (Merck)
- Metanol HPLC (Merck)
- Acetonitrilo HPLC (Merck)

- Ácido acético grado analítico (Merck)
- Buffer fosfato salino pH= 7,40 (Merck)
- Tween 20 (Merck)
- Agua ultrapura (NOVA)
- Agua destilada (BRAUN)

La investigación se llevó a cabo en el Instituto de Investigación en Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales “Juan de Dios Guevara” de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM) y en el Laboratorio de Investigación y Certificaciones (LABICER) de la Universidad Nacional de Ingeniería (UNI).

#### **c. Proceso de recolección**

Los **granos** de cacao fueron secados en estufa marca EST – 9053A por 24 horas a 38°C, excepto las barras de chocolate. Las muestras fueron sometidas a reducción de partículas con la ayuda de un mortero de porcelana, luego pasaron por un tamiz de número 40 marca Tyler. Luego se efectuaron los siguientes pasos para obtener las muestras de ocratoxina A según el método indicado por la AOAC INTERNATIONAL (Association of Analytical Communities)

#### **d. Proceso de extracción de OTA**

Para el proceso de extracción se utilizó 20 g de granos de cacao de cada fase de post cosecha, dichos granos se pulverizaron en un mortero de porcelana; para obtener la muestra de cacao presente en las barras de chocolate, se sometieron a un proceso de desengrasado con éter de petróleo, luego se realizó la extracción con Soxhlet, para separar el sólido del líquido y obtener

la muestra de cacao. Cada muestra que se obtuvo se colocó en un Beacker de 500 mL marca pyrex, donde se añadió 200 mL de bicarbonato de sodio al 1% en metanol, luego se homogenizo por 2 minutos haciendo uso de un agitador magnético a 4000 rpm.

Cada muestra pasó a ser filtrado a través de un papel filtro marca Whatman N°. 41, de lo cual se tomó 20 mL del filtrado y se añadió 20 mL de buffer PBS (tampón fosfato salino) para obtener un volumen final de 40 mL de mezcla homogénea, este procedimiento se realizó para cada fase (fermentado, secado, almacenado y chocolate).

Con una jeringa de 50 mL y un adaptador de columna de inmunoafinidad, se pasó la solución de 40 mL (las muestras) a través de la columna gota a gota. la solución pasó por gravedad teniendo en cuenta un flujo lento y constante, ya que es esencial para la captura de la toxina debido a la presencia del anticuerpo (Se evitó que la columna no se seque).

Posteriormente se lavó la columna pasando 20 mL de PBS / Tween 20 (0,01% v/v). Se aseguró en eliminar todo el líquido de la columna utilizando presión positiva con la ayuda de una jeringa 50 mL.

Finalmente, se eluyó la toxina de la columna a una velocidad de flujo de 1 gota por segundo con 1,5 mL de metanol acidificado (ácido acético glacial: metanol 2: 98 v/v) para luego recoger en un vial de vidrio de color ámbar. Se realizó el retro lavado en dos ocasiones. Tras la elución, se adiciono 1,5 mL de agua ultra pura a través de la columna y para obtener un total de 3 mL de volumen por cada fase.

#### **e. Preparación de la curva de calibración**

La solución principal del estándar de OTA se preparó diluyendo 1 mg de estándar OTA en 50mL de Metanol, teniendo una concentración de 20 ppm. A partir de la solución principal, se preparó las soluciones estándar de trabajo de ocratoxina A a 0,25, 0,5, 1, 2,5 y 5 µg/L.

Los análisis se realizaron mediante cromatografía líquida de alto rendimiento con detección por fluorescencia siguiendo los parámetros recomendados por Ramos Cevallos (15,46).

La longitud de onda de excitación fue de 333 nm y la de emisión fue de 460 nm. La temperatura del horno de la columna fue de 25 °C. La elución fue a un flujo constante de 1 mL/min y como sistema eluyente inicial se usó al CH<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub> (ácido acético 1%) y el H<sub>2</sub>O (agua destilada (50:50 v/v)). El sistema inicial fue linealmente modificado a un CH<sub>3</sub> CN 100 % en 20 minutos. Después de 3 minutos de permanecer constante, el sistema fue restablecido linealmente a su condición inicial 10 minutos, sumando un tiempo total de 33 minutos por análisis. Los eluyentes fueron preparados en el momento y filtrados (0,45 µm) antes de su uso. Para la lectura de los estándares se realizaron tres inyecciones y dos para el análisis de las muestras. Todas las muestras se filtraron a través de filtro de jeringa (0,45 µm) antes de la inyección (25 µL) a la columna cromatográfica. La identificación de OTA se realizó utilizando el tiempo promedio de retención de las diluciones de trabajo. Este tiempo se obtuvo midiendo diez veces el estándar de trabajo a una concentración de 0,05 ppb, procedimiento que también fue útil para obtener el límite de detección (LDD). El tiempo

de retención promedio fue de 8,245 minutos (RSD=0,055 %) y el LDD fue de 0,100 ppb.

**f. Plan de Procesamiento y análisis de datos**

Los análisis se realizaron por duplicado, se calculó la desviación estándar y desviación estándar relativa. Cada punto de análisis se realizó con una doble inyección, tanto para las muestras como para los estándares usados en la curva de calibración. Las interpretaciones de los cromatogramas se realizaron con el software propio del cromatógrafo líquido de alta resolución.

**g. Aspectos bioéticos**

La investigación no utiliza animales de experimentación o grupos humanos con consentimiento informado.

## CAPITULO IV: PRESENTACION Y DISCUSION DE LOS RESULTADOS

### 4.1. Resultados

#### 4.1.1. Análisis descriptivo de resultados

Tabla 1. Distribución del nivel de ocratoxina A en cacao *Theobroma cacao* L. en la fase de fermentación por el método de cromatografía Líquida de alta resolución.

Fase	Concentración de OTA	# muestras	Porcentaje
Fermentación de <i>Theobroma</i> <i>cacao</i> L.	Supera el límite permisible	0	0,0
	No supera el límite permisible	6	100,0
Total		6	100,0

La tabla 1 y la figura 9 muestran que el 100% (n=6) de las muestras analizadas no superaron el límite máximo permisible (2,0 µg/kg) establecido por el Códex Alimentario internacional en los granos de *Theobroma cacao* L. en la fase de fermentado.

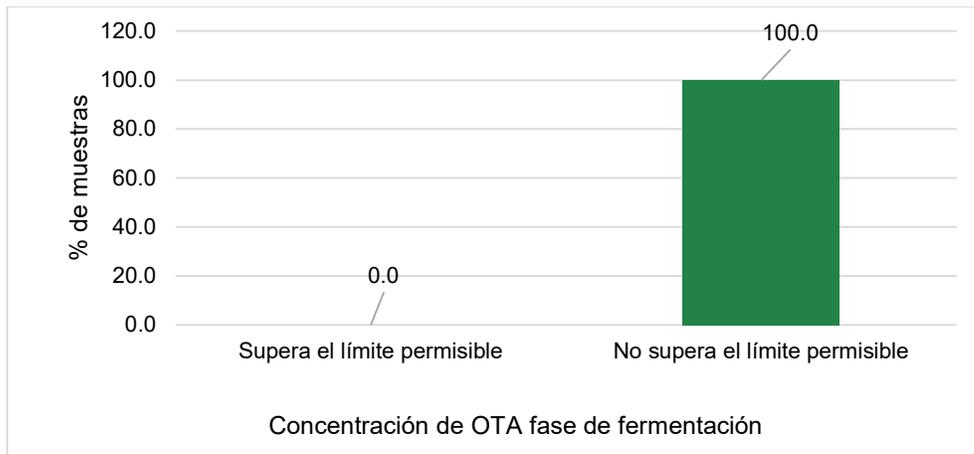


Figura 9. Distribución del nivel de ocratoxina A en cacao *Theobroma cacao* L. en la fase de fermentación por el método de cromatografía Líquida de alta resolución.

Tabla 2. Distribución del nivel de ocratoxina A en cacao *Theobroma cacao* L. en la fase de secado por el método de cromatografía Líquida de alta resolución.

Fase	Concentración de OTA	# muestras	Porcentaje
Y de <i>Theobroma</i> <i>cacao</i> L.	Supera el límite permisible	0	0,0
	No supera el límite permisible	6	100,0
Total		6	100,0

La tabla 2 y la figura 10 muestran que el 100% (n=6) de las muestras analizadas no superaron el límite máximo permisible (2,0 µg/kg) establecido por el Códex Alimentario internacional en los granos de *Theobroma cacao* L. en la fase de secado.

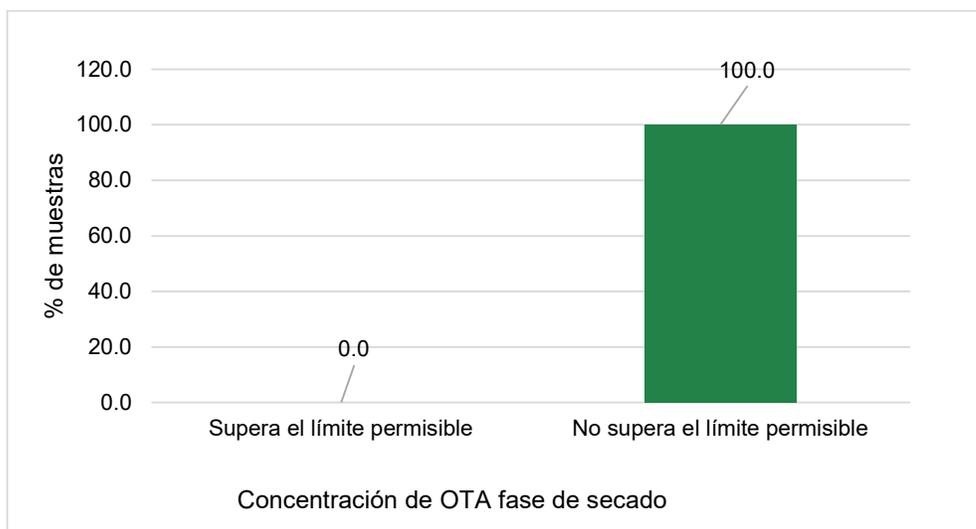


Figura 10. Distribución del nivel de ocratoxina A en cacao *Theobroma cacao* L. en la fase de secado por el método de cromatografía Líquida de alta resolución.

Tabla 3. Distribución del nivel de ocratoxina A en cacao *Theobroma cacao* L. en la fase de almacenado por el método de cromatografía Líquida de alta resolución.

Fase	Concentración de OTA	# muestras	Porcentaje
Almacenado de <i>Theobroma cacao</i> L.	Supera el límite permisible	0	0,0
	No supera el límite permisible	6	100,0
Total		6	100,0

La tabla 3 y la figura 11 muestran que el 100% (n=6) de las muestras analizadas no superaron el límite máximo permisible (2,0 µg/kg) establecido por el Códex Alimentario internacional en los granos de *Theobroma cacao* L. en la fase de almacenado.

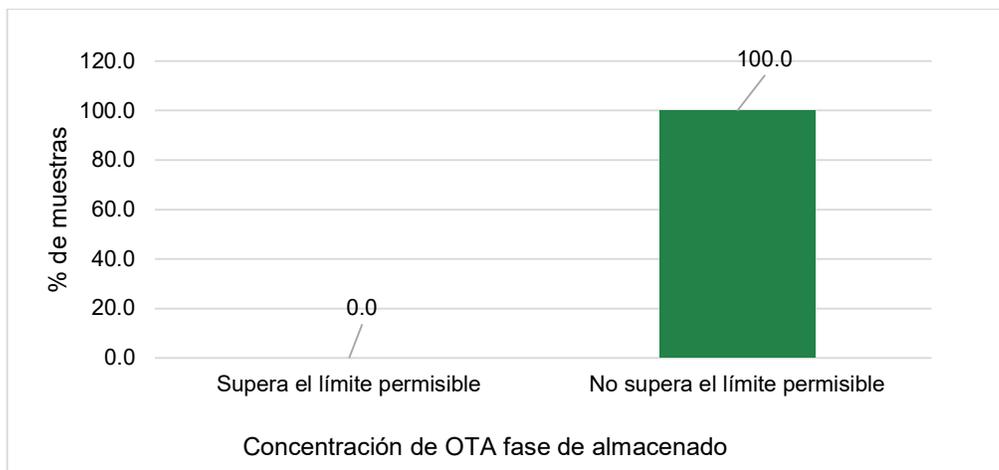


Figura 11. Distribución del nivel de ocratoxina A en cacao *Theobroma cacao* L. en la fase de almacenado por el método de cromatografía Líquida de alta resolución.

Tabla 4. Prueba de normalidad de la concentración de ocratoxina A (µg/kg) en cacao *Theobroma cacao* L. en la fase de almacenado

	Shapiro-Wilk		
	Estadístico	Gl	p valor
Concentración de OTA (µg/kg)	0,830	6	0,108

A diferencia de la fase de fermentación y secado, tal como se muestra en el anexo 5, en la fase de almacenado cuatro muestras arrojaron valores superiores al límite de detección por cromatografía líquida de alto rendimiento (0,30 µg/Kg) mientras que dos mediciones

indicaron valores por debajo de este límite; para el análisis estas dos mediciones fueron consideradas iguales a este límite de detección.

La tabla cuatro indica que no hay evidencia estadística para afirmar que la distribución de la concentración de OTA ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) no sea normal, por tanto, se pueden utilizar pruebas paramétricas para su análisis.

Tabla 5. Valor promedio de la concentración de ocratoxina A ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) en cacao *Theobroma cacao* L. en la fase de almacenado.

	N	Media	Desviación estándar	95% de intervalo de confianza para el promedio o media	
				Inferior	Superior
Concentración de OTA ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	6	0,798	0,501	0,271	1,324

La tabla 5 indica que la concentración promedio de ocratoxina A en cacao *Theobroma cacao* L. en la fase de almacenado fue de  $0,798 \pm 0,501 \mu\text{g}/\text{kg}$ ; se estima como un nivel de confianza del 95% que el intervalo [0,271; 1,324] contiene al parámetro del valor promedio de ocratoxina A en cacao *Theobroma cacao* L. en la fase de almacenado.

Tabla 6. Distribución del nivel de ocratoxina A en chocolates.

Concentración de OTA en chocolates	# muestras	Porcentaje
Supera el límite permisible	0	0,0
No supera el límite permisible	6	100,0
Total	6	100,0

La tabla 6 y la figura 12 muestran que el 100% (n=6) de las muestras analizadas no superaron el límite máximo permisible (2,0 µg/kg) establecido por el Código Alimentario internacional en los granos de *Theobroma cacao* L. en la fase de almacenado.

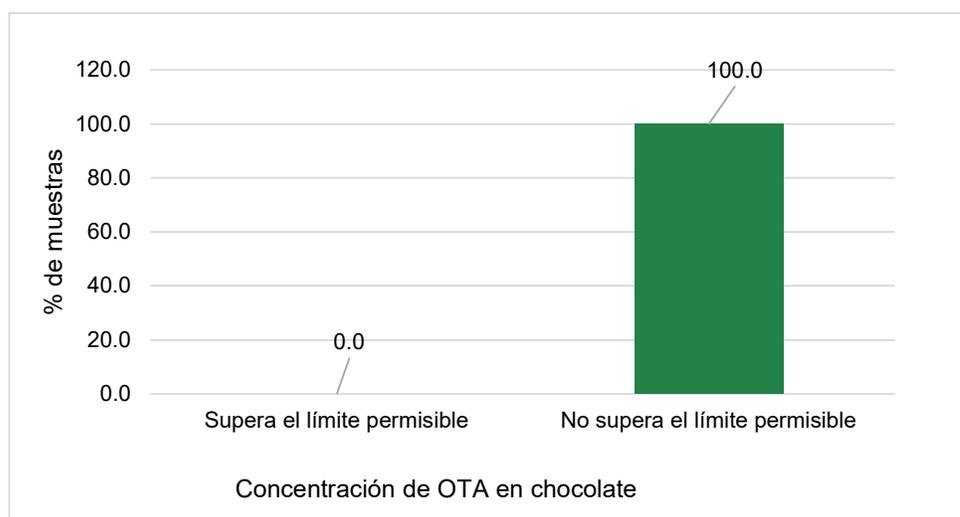


Figura 12. Distribución del nivel de ocratoxina A en chocolates.

#### 4.1.2. Prueba de hipótesis

Ho: El nivel de ocratoxina A en los granos de *Theobroma cacao* L. en las fases de fermentado, secado y almacenado es menor o igual que el límite máximo permisible establecido por el Códex Alimentario internacional.

H1: El nivel de ocratoxina A en los granos de *Theobroma cacao* L. en las fases de fermentado, secado y almacenado es mayor que el límite máximo permisible establecido por el Códex Alimentario internacional.

A. Criterio:

Como la prueba es unilateral derecha (media > 2,00), solo se rechaza la hipótesis si se cumplen las dos condiciones:

p valor < 0,05 y el estadístico de prueba T es mayor que cero.

Debido a que los valores obtenidos en la fase D fermentado, secado y chocolate fueron todos menores al límite de detección, se asume que fueron constantes y no variables, por tanto, solo se realizará la contrastación para la concentración en la fase de almacenado.

Tabla 7. Prueba T para una media de la concentración ocratoxina A en los granos de *Theobroma cacao* L. en las fases de almacenado.

	Valor de prueba = 2			Diferencia de medias
	T	gl	p valor	
Concentración de OTA ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	-5,874	5	0,002	-1,203

La tabla 7 indica que el valor promedio de la concentración ocratoxina A en los granos de *Theobroma cacao* L. en las fases de almacenado está a 1,203  $\mu\text{g}/\text{kg}$  por debajo del límite permisible, cómo el estadístico de prueba T de Student toma un valor negativo (-5,874) no se puede rechazar la hipótesis nula; es decir a un nivel de significancia del 5% podemos indicar que el nivel de ocratoxina A en los granos de *Theobroma cacao* L. en las fases de almacenado no supera el límite máximo permisible establecido por el Códex Alimentario internacional.

#### **4.1. Discusión de resultados.**

El presente estudio tuvo como objetivo determinar y cuantificar la cantidad de ocratoxina A “OTA” en las etapas post cosecha de las almendras de *Theobroma cacao* L “cacao trinitario”. Las muestras provinieron del departamento de san Martín, Pisana, con un total de 12 muestras, las cantidades de muestras de las fases de post cosecha fueron 9 (N=3, fermentado; N=3, secado; N=3, almacenado) y 3 muestras para el producto terminado (chocolate). Nuestros resultados indican que el punto crítico para que los hongos relevantes infecten los granos de cacao y comiencen a producir OTA es durante la etapa de secado y almacenado, cuando los granos comienzan a perder agua. La disminución de actividad de agua reduce el número de competidores debido a la alta sensibilidad de las bacterias y levaduras a la baja disponibilidad de agua (7), en relación a nuestra investigación se mostró la presencia de ocratoxina A en la fase de almacenado con un nivel promedio de 0,798  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ , condiciones similares a los descrito por Champion E, la etapa final de fermentación y almacenamiento es el punto clave para la contaminación de hongos productores de toxinas y OTA (8).

Es importante resaltar que la dispersión de granos en plataformas de madera facilita el contacto con hongos que pueden actuar como inóculo inicial, y aumenta la tensión de oxígeno esencial para el crecimiento de estos hongos. El piso de secado de madera utilizado en la mayoría de centros de cultivo dificultaba las buenas condiciones de higiene durante el secado y el almacenado, algunos centros de acopio están evaluando alternativas, como plataformas de cemento y plástico, que se limpian con mayor facilidad y eficacia (8). Se necesitan más estudios comparando diferentes tipos de secado y las condiciones de almacenado, enfocándose en la contaminación por hongos, ya que en la etapa de almacenado se observó la presencia de OTA. El contenido de humedad recomendado de los granos de cacao secos para un almacenamiento seguro es del 8% (8).

Investigaciones nacionales, por ejemplo, Ramos N, Castro A, *et al.* (13).

Comparó la presencia de OTA en cuatro etapas del proceso de producción del cacao trinitario, donde no se encontró la presencia de ocratoxina A en ninguna etapa, sin embargo, el identificador de hongos ocratoxigénicos. Otra investigación de Ramos N, Castro A, *et al* (14), en Piura, realizado en granos de cacao blanco por el método de HPLC. Manifestaron la presencia de ocratoxina A en la fase de fermentado a un valor de  $(1,92 \pm 0,02 \mu\text{g}/\text{kg})$  y en las etapas de cosecha, secado y almacenado los granos de cacao blanco no manifestaron presencia OTA.

Esta diferencia de la presencia de OTA en otro proceso, podría deber a que los factores externos como las buenas prácticas en el centro de acopio impidan el crecimiento de los hongos productores de ocratoxina A por ello es importante tener en cuenta factores externos determinantes para el crecimiento de hongos y su posterior producción de metabolitos secundarios incluido la ocratoxina A, como

indica Romero, *et al.* la investigación donde la mayoría de productores y centros de beneficiado realizan prácticas adecuadas durante la cosecha y pos cosecha del cacao, sin embargo, se encontró niveles bajos de ocratoxina A (OTA) con una media de 1,12 ppb (10).

Un estudio realizado en Camerún por Mounjouenpou *et al.* Reportaron *Aspergillus niger* como la principal especie productora de ocratoxina A (OTA) en granos de cacao. Mounjouenpou y col. (2008) informaron que el 70% de los granos aislados presentaron de *Aspergillus niger* potencialmente productor de ocratoxina A (OTA). Este alto porcentaje no ha sido confirmado por otros estudios realizados a nivel mundial con esta especie (50).

Sánchez y colaboradores examinaron nueve muestras de granos de cacao secos importados de Sierra Leona, Guinea Ecuatorial y Ecuador. (2008), quienes reportaron 138 aislamientos de especies de *Aspergillus negro*, con 60% de los granos de cacao individuales infectados (51).

Dongo (52) reportó que en el cacao nigeriano se encontró que el 54 (91,5%) de 59 muestras estaban contaminadas con OTA, con un promedio de 40 µg/kg y un máximo de 277 µg/kg. Los resultados son comparables a los de Bonvehi (53) con OTA positivo en el 76% de 21 muestras, con una media de 0,45 µg / kg y un máximo de 3,5 µg / kg y los de Amezqueta (54), con 63% de positivos entre 46 muestras analizadas, con un promedio de 1,71 µg / kg y un máximo de 15 µg / kg. En ambos estudios se tomaron muestras para análisis de una amplia gama geográfica de fuentes. Otros informes han descrito una menor presencia de OTA en los granos de cacao de América y el Pacífico en comparación con otros países productores de cacao.

Según Bastide *et al.* (55) las concentraciones variables de OTA también dependían de la temporada del cacao y del tipo de daño sufrido por las mazorcas: sanas (2,3  $\mu\text{g} / \text{kg}$ ), dañadas por insectos (4,2  $\mu\text{g} / \text{kg}$ ), mutiladas (19,8  $\mu\text{g} / \text{kg}$ ), podridas (7,2  $\mu\text{g} / \text{kg}$ ) o momificado (3,4  $\mu\text{g} / \text{kg}$ ). La concentración de OTA al final del secado y almacenado es la más importante porque los granos de cacao en esta etapa están destinados a la comercialización. Al final del secado, las concentraciones de OTA variaron de  $0,18 \pm 0,2 \mu\text{g} / \text{kg}$  (vainas intactas) a  $2,49 \pm 0,2 \mu\text{g} / \text{kg}$  (vainas dañadas). Adama *et al.* (56) analizaron 1895 muestras de cacao en grano recolectadas en los puertos y zonas productoras de cacao e informaron que la contaminación por OTA osciló entre  $0,19 \pm 0,16$  y  $1,90 \pm 1,87 \mu\text{g} / \text{kg}$  para un promedio de  $1,40 \pm 1,32 \mu\text{g} / \text{kg}$ . Mostrando que la contaminación por OTA de los granos de cacao se debe principalmente al estado de las mazorcas. Los productores de cacao deben aplicar buenas prácticas agrícolas para producir cacao con poco contenido de OTA.

Los valores de OTA en las almendras de cacao de la fase de almacenado son de 1,407  $\mu\text{g}/\text{L}$  y 1,043  $\mu\text{g}/\text{L}$ , pero estas cantidades no superan a los límites permisibles por el Código Alimentario internacional, los cuales mencionan un valor máximo aceptable de 2,0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Los resultados encontrados en nuestro estudio sugieren que, en general, la contaminación por OTA en el cacao peruano es baja, aunque la ocurrencia de hongos capaces de producir OTA aumenta durante el almacenamiento.

## CAPITULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 5.1. Conclusiones

No se encontró presencia de ocratoxina A en cacao *Theobroma cacao* L. “cacao Trinitario” en la fase de fermentación

No se encontró presencia de ocratoxina A en el cacao *Theobroma cacao* L. “cacao Trinitario” en la fase de secado.

Se encontró presencia de ocratoxina A del cacao *Theobroma cacao* L. “cacao Trinitario” en la fase del almacenado por el método de cromatografía Líquida de alta resolución con un valor promedio de 0,798 µg/kg, el cual no supera los límites permisibles establecidos por el código internacional de alimento.

No se encontró presencia de ocratoxina A presente en los chocolates artesanales.

### 5.2. Recomendaciones

- Continuar con estudios relacionados al análisis de determinación de niveles de ocratoxina A en las fases de post cosecha en *Theobroma cacao* L para afianzar las bases necesarias que permitan fomentar las buenas prácticas de post cosecha en este tipo de granos que es de comercialización internacional.
- Diseñar manuales indicando los factores a tomar en cuenta para evitar la formación de hongos que producen micotoxinas altamente perjudiciales en la

salud a nivel oncológico en las personas consumidoras y productoras de dichos granos ya expuesto en los párrafos anteriores.

- Fomentar las buenas prácticas de post cosecha en granos que son altamente consumidos en el área de confitería.

## REFERENCIAS

1. Poquioma R. Epidemiología del cáncer en el Perú y en el Mundo. [diapositivas. Lima: INEN; 2014.34 diapositivas. [27/12/2018]. Disponible de: [http://www.inen.sld.pe/portal/documentos/pdf/educacion/01102014\\_Epidemiologia\\_Dr%20Poquioma.pdf](http://www.inen.sld.pe/portal/documentos/pdf/educacion/01102014_Epidemiologia_Dr%20Poquioma.pdf).
2. Ministerio de agricultura. Manual del cultivo de cacao. Perú: Proamazonia; 2004; p. 37.
3. Comisión del Codex Alimentarius. Programa conjunto FAO/OMS sobre normas alimentarias, documento de debate sobre la ocratoxina A en el cacao. CX/CF.2015; p. 229-230.
4. Biró K, *et al.* Distribución tisular de ocratoxina A según lo determinado por HPLC y ELISA y efectos histopatológicos en pollos. *Aviar pathol.* 2002; 31 (2): p.8, 141.
5. Redel H. Infecciones e intoxicaciones alimentarias [Internet]. 4ª Ed. Londres: Emerg Infect Dis. 2013 diciembre [citado:27 agosto 2018]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3201/eid1912.131335>.
6. Ríos M. Cacao peruano. Cuánto es el consumo per cápita. *Gestión*:2018 julio 19: Sección economía.
7. Parra L, Quiroga S, *et al.* Aflatoxina b1 de *aspergillus spp* generado en arroz, su detección y cuantificación por métodos fluorométricos y HPLC. *Rev. Boliviana de Química* [Internet]. 2018. [citado: 29 octubre 2019]; 35(5). Disponible en: <https://www.redalyc.org/jatsRepo/4263/426358213003/html/index.html>.
8. Champion E. "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 Doctoral en Ciencias y Alimentos]. Veracruz México: Instituto Tecnológico de Veracruz; [Internet]. 2017. [citado: 30 octubre 2019]. 2017. Disponible en: <http://agritrop.cirad.fr/585157/>.

9. Jacqueline A, et al. La Mangiferina es una glicosilxantona natural presente en varias partes del árbol de *Mangifera indica* L., a la que se le atribuyen un amplio rango de acciones farmacológicas. Rev cubana Plant Med.2014; 19 (3).
10. Romero J, Rodríguez O, Jiménez J, et al. Caracterización de las prácticas de cosecha y poscosecha y niveles de OTA del cacao en zonas productoras de la República Dominicana. Revista APF. [Internet]2014. [citado:11 octubre 2018]; 3(2): p.25-28. Disponible en: [http://www.sodiaf.org.do/revista/sodiaf/vol3\\_n2\\_2014/articulo/25\\_28\\_APF\\_V03\\_N02\\_2014.pdf](http://www.sodiaf.org.do/revista/sodiaf/vol3_n2_2014/articulo/25_28_APF_V03_N02_2014.pdf).
11. Ravelo A, Rubio A, Gutiérrez F, Hardisson A. La ocratoxina A en alimentos de consumo humano: Revisión Nutr. Hosp. 2011; 26(6).
12. Ramos N, Castro A, et al. Evaluación de ocratoxina a en *Theobroma cacao* L. "Cacao trinitario", por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) y análisis micotoxigénico durante el proceso de cosecha, fermentado, secado y almacenado. Rev. Soc. Quím. Perú [Internet]2018.oct [citado: 5 agosto 2019];84(4): p.477-487. Disponible en: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1810634X201800040008&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1810634X201800040008&lng=es&nrm=iso).
13. Ramos N, Castro A, et al. Evaluación de ocratoxina a en *Theobroma cacao* L. "cacao blanco" durante el proceso de cosecha, fermentado, secado y almacenado. Rev. Soc. Quím. Perú [Internet] 2016. [citado: 11 octubre 2018];82(4): p. 431-439. Disponible en: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1810634X2016000400005&script=sci\\_arttext&tlng=pt](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1810634X2016000400005&script=sci_arttext&tlng=pt).
14. Chire G, Valdivia R, Ureña M. Ocratoxina A en cacao y derivados. medidas preventivas. Ciencia e Investigación. 2014; 17(1): p.9-15.

15. Montes A. Botánica, Tecnología y Composición. 2 Ed. Buenos Aires, Argentina: Universidad de Buenos Aires; 1991.
16. Gil S. *Theobroma cacao* L (cacao). Hipernatural. [Internet]. 2021. [citado :10 octubre 2018]. Disponible en: <http://www.hipernatural.com/es/pltcacao.html>.
17. Duran F. Cultivo y Explotación del Cacao. 1º Ed. Bogotá, Colombia: Grupo Latino Editores; 2012.
18. Cabrera V, Giménez M. Café, Té, Cacao y Productos Derivados. En: Gil Hernández A (director). Tratado de Nutrición: 2010;2: p.335-336.
19. Enríquez G. Beneficio del Cacao Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuaria. [Internet]. Quito, Ecuador;1995. [citado: 20 octubre 2018]. Disponible en:  
  
<https://books.google.com.pe/books?id=T7EzAQAAMAAJ&pg=PA1&dq=cosecha+pos cosecha+de+cacao&hl=qu&sa=X&ved=0ahUKEwj5roHjqsXeAhWFjlkKHdbwB704ChDoAQgnMAE#v=onepage&q&f=false>.
20. Cacao hermanos. Ecotipos de *Theobroma cacao* L. Empresa dedicada el cacao. [Internet]. Perú 2021. [citado: 10 octubre 2018] Disponible en:  
  
<https://cacaohermanos.files.wordpress.com/2017/05/ecotipos-3.png>.
21. Romero C. Estudio del cacao en el Perú y el mundo [Internet]. Lima: Perú MINAGRI-DEEIA; julio 2016 [citado 20 octubre 2018]. Disponible en:  
  
<https://camcafeperu.com.pe/admin/recursos/publicaciones/Estudio-cacao-Peru-y-Mundo.pdf>.
22. Pérez R. La Calidad del Cacao [Internet]. Ecuador: INIAP;2009. [citado 25 octubre 2018]. Disponible en:  
  
[https://books.google.com.pe/books?id=HJszaQAAMAAJ&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs\\_ge\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.pe/books?id=HJszaQAAMAAJ&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false).

23. Kőszegi T, Poór M. Ochratoxin A: Molecular Interactions, Mechanisms of Toxicity and Prevention at the Molecular Level. *Toxins*. 2016;8(4):111.
24. Santillán R, Rodríguez G, Fernández S, Vázquez G. “Micotoxinas: ¿Qué son y cómo afectan a la salud pública?”, en *Revista Digital Universitaria*, 2017;18(6).
25. Gimeno A, Ligia M. *Micotoxinas y Micotoxicosis animales y humanos*. 3ra Ed. USA: Special Nutrients; 2011.
26. Diaz L, Rodríguez M, *et al.* Evaluación de la exposición aguda y crónica a aflatoxina B1 en mujeres indígenas de la huasteca, México. *México: Environ sci pollut [internet]*, 2020 mayo [citado 2021 octubre 29]; 27 (24): 20583, 30591. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s11356-020-09361-4>.
27. Bani I, Nabulsi A, *et al.* Ocurrencia de factores de riesgo en las granjas y efectos en la salud de las micotoxinas en las granjas lecheras en Jordania. 5<sup>ta</sup> Ed. Jordania: *Producción y sanidad animal tropical*; 2020;52: p.7,2371-2377.
28. Shephard G, Berthiller F, Dorner J, *et al.* Developments in mycotoxin analysis: *World Mycotoxin Journal*. 2008 febrero 2 (1): p.3–21.
29. Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nations Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. *FAO Food and Nutrition Paper 81*. Rome, Italy: FAO. [Internet]. 2015 abril [citado:1 noviembre 2021]. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/007/y5499e/y5499e00.htm>
30. Nurshad A, Blaszkewicz M, Degen GH. Occurrence of the mycotoxin citrinin and its metabolite dihydrocitrinone in urines of German adults. *Arch Toxicol [Internet]*. 2015 abril [citado: 17 noviembre 2020]; 89 (4): p. 8, 573. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25224402/>
31. López A, Jiménez A. Efectos tóxicos de la Ocratoxina A. *Revista de Toxicología*, 2000; 17(2): p.61-69.

32. Gupta R, Lasher M, *et al.* Aflatoxins, ochratoxins, and citrinin, *Reproductive and Developmental Toxicology*. 2ed. Amsterdam: Academic Press/Elsevier; 2017. p. 945, 962.
33. Cámara H, *et al.* Comité científico de la AESAN. Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. [Internet]. 2020. [citado:30 diciembre 2021]. p.1-3. Disponible en: [https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/publicaciones/revistas\\_comite\\_cientifico/comite\\_cientifico\\_31.pdf](https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/publicaciones/revistas_comite_cientifico/comite_cientifico_31.pdf).
34. Organización mundial de la salud. Comisión del Codex Alimentarius. Programa conjunto FAO/OMS sobre normas alimentarias, documento de debate sobre la aflatoxina en cereales. CX/CF.2019.
35. Martínez C, Chaves D. Ocratoxinas y su potencial nefrotóxico. *Rev Nefrología Dial Traspl*; 2019; 39(1): 73, 81.
36. Wang Y, Chai T, *et al.* Simultaneous detection of airborne aflatoxin ochratoxin and zearalenone in a poultry house by immunoaffinity clean-up and high-performance liquid chromatography. *Environ*. 2008; p. 107, 139–144.
37. Malir F, Ostry V, Novotna E. Toxicity of the mycotoxin ochratoxin A in the light of recent data. *Toxin rev*. 2013; p. 32, 19-33.
38. Ramyaa P, Padma V. Ochratoxin-induced toxicity, oxidative stress and apoptosis ameliorated by quercetin-Modulated by Nrf2. *Food Chem. Toxicol*. 2013; p.62, 205-216.
39. Duarte C, Lino M, Pena A. Mycotoxin food and feed regulation and the specific case of ochratoxin A: A review of the worldwide status. *Food Addit. Contam*. 2010; p. 27, 1440–1450.

40. Stoev D, Dutton F, *et al.* Mycotoxic nephropathy in Bulgarian pigs and chickens: complex aetiology and similarity to Balkan Endemic Nephropathy. *Food Addit Contam.* 2010; p. 27, 72–88.
41. Dalcero A, Magnoli C, *et al.* Detection of ochratoxin A in animal feeds and capacity to produce this mycotoxin by *Aspergillus section Nigri* in Argentina. *Food Addit. Contam. A.* 2002; p. 19, 1065, 1072.
42. Rahmani A, Jinap S, Soleimany F. Qualitative and quantitative analysis of mycotoxins. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 2009; 8(3): 51, 202.
43. Test A. AgraQuant<sup>®</sup> Ochratoxin ELISA test [Internet]. Romer Labs. [citado: 1 noviembre 2021]. Disponible en: [https://www.romerlabs.com/shop/inter\\_es/agraquant-r-ochratoxin-elisa-test/](https://www.romerlabs.com/shop/inter_es/agraquant-r-ochratoxin-elisa-test/).
44. Pittet A, Royer D. Rapid, low cost thin-layer chromatographic screening method for the detection of ochratoxin A in Green coffee at a control level of 10 µg/kg. *J Agric Food Chem* 2002; 50(2): p.7, 243.
45. Shukla S, Park J, Chung S, Kim M. Ochratoxin A reduction ability of biocontrol agent *Bacillus subtilis* isolated from Korean traditional fermented food Kimchi. *Scientific Reports.* 2018; 8(1): 1-5.
46. William G. Association of official analytical chemists international. 18th Ed. Gaithersburg Maryland; 2016.
47. Gilbert J, Anklam E. Validation of analytical methods for determining mycotoxins in foodstuffs. *Trends Anal Chem* 2002; 21(6–7): p.468, 486.
48. Dalen V, Deobold B. La investigación descriptiva. 4º Ed. Barcelona: Paidós; 1986. p. 535-542.
49. Juran J. Muestreo de aceptación. 5º Ed. Madrid: McGraw-Hill; 2001. p. 46.2-46.8.

50. Mounjouenpou P, Gueule D, Fontana A, Guyot B, Tondje PR, Guiraud JP. Filamentous fungi producing ochratoxin A during cocoa processing in Cameroon. *International Journal of Food Microbiology* 2008; 128(1): p. 234–241.
51. Sánchez M, Gil JV, Bisbal F, Ramon D, Martínez PV. Mycobiota and mycotoxin producing fungi from cocoa beans. *International Journal of Food Microbiology*. 2008; 125(1): p. 336–340.
52. Dongo L, Bandyopadhyay R, Kumar M, Ojiambo PS. Occurrence of ochratoxin A in Nigerian ready for sale cocoa beans. *Agricultural Journal*. 2008: p.3, 4.
53. Bonvehi J. Occurrence of ochratoxin A in cocoa products and chocolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004; 52(1): p. 6347–6352.
54. Amezqueta S, Gonzalez E, Dachoupakan C, Murillo M, López A, Guiraud JP. 2008. OTA-producing fungi isolated from stored cocoa beans. *Letters in Applied Microbiology* 47, p. 197–201.
55. Bastide P, Fourny G, Durand N, *et al.* Identification of Ochratoxin A sources during cocoa post-harvest processing: influence of harvest quality and climatic factors. 15 th Intl Cocoa Res. Conf. Costa Rica. 2006: p. 9, 17.
56. Adama HMB, Godi D, Ardjouma MB, Kouassi T. Abba Cocoa beans and cocoa derivatives from Côte- d'Ivoire: investigating ochratoxin A level and assessing dietary intake adults. *Sustainable Agriculture Research*. 2(1), 2013: p. 173-180

## ANEXOS

### ANEXO 1: MATRIZ DE CONSISTENCIA

Titulo	Problema	Objetivo	Hipótesis	Variable	Indicadores
Evaluación del Nivel de ocratoxina A en las fases de post cosecha del <i>Theobroma Cacao L.</i> y chocolates artesanales en el distrito de Pisana - San Martin 2018.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>General:</b> ¿Cuál es el Nivel de ocratoxina A en <i>Theobroma Cacao L.</i> en las fases de post fermentado, secado, almacenado y chocolate de Pisana 2018?</li> <li>• <b>Específicos:</b> ¿Cuál es el nivel de ocratoxina A en <i>Theobroma cacao L.</i> en la fase de fermentado? ¿Cuál es el nivel de ocratoxina A en <i>Theobroma cacao L.</i> en la fase de secado? ¿Cuál es el nivel de ocratoxina A en <i>Theobroma cacao L.</i> en la fase de almacenado? ¿Cuál es el nivel de ocratoxina A en los chocolates?</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>General:</b> Comprobar y cuantificar los niveles de ocratoxina A en <i>Theobroma cacao L.</i> en las fases de post cosecha y chocolates artesanales en el distrito de Pisana san Martin 2018.</li> <li>• <b>Específicos:</b> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Determinar el nivel de ocratoxina A en cacao <i>Theobroma cacao L.</i> en la fase de fermentación por el método de cromatografía Liquida de alta resolución</li> <li>2. Determinar el nivel de ocratoxina A del cacao <i>Theobroma cacao L.</i> en la fase de secado por el método de cromatografía Liquida de alta resolución.</li> <li>3. Determinar el nivel de ocratoxina A del cacao <i>Theobroma cacao L.</i> en la fase del almacenado por el método de cromatografía Liquida de alta resolución.</li> <li>4. Determinar el nivel de ocratoxina A en chocolates</li> </ol> </li> </ul>	Ho: El nivel de ocratoxina A en los granos de <i>Theobroma cacao L.</i> en las fases de fermentado, secado y almacenado es menor o igual que el límite máximo permisible establecido por el Códex Alimentario internacional. <b>Hipótesis alternativa</b> H1: El nivel de ocratoxina A en los granos de <i>Theobroma cacao L.</i> en las fases de fermentado, secado y almacenado es mayor que el límite máximo permisible establecido por el Códex Alimentario internacional	Independiente <i>Theobroma cacao L.</i> en la fase de fermentado <i>Theobroma cacao L.</i> en la fase de Secado <i>Theobroma cacao L.</i> en la fase de almacenado  Chocolates.	Cantidad de muestra  Cantidad de chocolate
				<b>Dependiente</b> Nivel de ocratoxina A	Cantidad de ocratoxina A

## ANEXO 2: OPERACIONALIZACION DE VARIABLES

Variable		Definición de conceptual	Definición operacional	dimensión	Indicador	Instrumento	Escala
Independiente	<i>Theobroma cacao</i> L en las fases de fermentado	En la población peruana existe un consumo y un uso cotidiano de las almendras de cacao a nivel alimentario, es por ello que es importante el procedimiento correcto para una buena cosecha de dichos granos y con ello poder evitar la contaminación por micotoxinas (ocratoxina A), generada por hongos, especialmente del género <i>Aspergillus</i> y <i>Penicillium</i> , con propiedades nefrotóxicas, inmunotóxicas, teratogénicas y carcinogénicas.	El Cacao Trinitario durante el procesos de post cosecha sufre por diferentes cambios bioquímicos por lo que es susceptibles a muchos microorganismos, por la alta humedad que presentan los granos. El cacao Trinitario será materia de estudio para determinar el nivel de ocratoxina A por el método del AOAC.	Fermentado	Cantidad de muestra en la fase de fermentado	military standart ISO 2859 AQL=0,65	n=315 granos Ac:0 - Rc:1
	<i>Theobroma cacao</i> L en las fases de secado			Secado	Cantidad de muestra en la fase de secado	military standart ISO 2859 AQL=0,65	n= 315 granos Ac:0 - Re :1
	<i>Theobroma cacao</i> L en las fases de almacenado			Almacenado	Cantidad de muestra en la fase de almacenado	military standart ISO 2859 AQL=0,65	n= 1250 granos Ac:2 - Rc: 3
	chocolates			Chocolate	Cantidad de muestra de chocolate	military standart ISO 2859 AQL=0,65	n=1 Barras Ac:0 - Re: 0
Dependiente	Nivel de ocratoxina A	La cromatografía líquida de alta resolución se caracteriza por el empleo de una fase estacionaria. Este análisis nos da resultados no solo cualitativos de la sustancia que deseas analizar sino también de forma cuantitativa.	El método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) nos permitirá determinar el nivel de ocratoxina A en el cacao en las diferentes fases de la post cosecha.	Identificación	Cantidad de Ocratoxina A en la fase de fermentado	Análisis de método cromatografico AOAC	2 µg/kg
					Cantidad de Ocratoxina A en la fase de secado		2 µg/kg
				Cuantificación	Cantidad de Ocratoxina A en la fase de almacenado	Codex Alimentario internacional	2 µg/kg
					Cantidad de Ocratoxina A en chocolates		0,5 µg/kg

### ANEXO 3: FORMATO DE VALIDACION DEL

#### INSTRUMENTO

- I. Datos generales:**
1. Apellidos y nombre:
  2. Cargo e institución:
- II. Aspectos de validación**

**3. Nombre del instrumento motivo de evaluación:**

- Autor del instrumento:
- Br. Ariza Aguayo Abigail Janet
- Br. Laupa Lukaña Edith Esperanza

MUESTRAS EVALUADAS			ANÁLISIS POR HPLC					
CACAO / FASES EVALUADAS			CUALITATIVA		CUANTITATIVA			OBSERVACIONES
Fermentado	Peso (g)	% humedad	SI	NO	LECTURADO			FASE FERMENTADO
					Nº 1	Nº 2	Nº 3	
1								
2								
3								
Secado	Peso (g)	% humedad	SI	NO	Nº 1	Nº 2	Nº 3	FASE SECADO
1								
2								
3								
Almacenado	Peso (g)	% humedad	SI	NO	Nº 1	Nº 2	Nº 3	FASE ALMACENADO
1								
2								
3								
CHOCOLATES / NUMERO DE MUESTRAS A EVALUAR			CUALITATIVA		CUANTITATIVA			OBSERVACIONES
Chocolate Muestra A	Peso (g)		SI	NO	Nº 1	Nº 2	Nº 3	Muestra A
1								
2								
3								
Chocolate Muestra B	Peso (g)							MUESTRA B
1								
2								
3								

\_\_\_\_\_

Firma y sello

MD	D	A	MA
1	2	3	4

ANEXO 4: taxonomía del *Theobroma cacao* L

 UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS  
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA  
MUSEO DE HISTORIA NATURAL 

"Año del Buen Servicio al Ciudadano"

**CONSTANCIA N° 096-USM-2017**

EL JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (fruto) recibida de **Abigail ARIZA AGUAYO y Edith LAUPA LUKAÑA**, estudiantes de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Privada Norbert Wiener, ha sido estudiada y clasificada como: ***Theobroma cacao* L.** y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988).

**DIVISION: MAGNOLIOPHYTA**

**CLASE: MAGNOLIOPSIDA**

**SUBCLASE: DILLENIIDAE**

**ORDEN: MALVALES**

**FAMILIA: STERCULIACEAE**

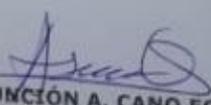
**GENERO: Theobroma**

**ESPECIE: *Theobroma cacao* L.**

Nombre vulgar: "cacao"  
Determinado por: Mg. Asunción Cano Echevarría

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para fines de estudios.

Lima, 29 de mayo de 2017

  
**Mag. ASUNCIÓN A. CANO ECHEVARRIA**  
JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)



ACE/dab



**Capítulo 1 UNIVERSIDAD NACIONAL DE  
INGENIERÍA FACULTAD DE CIENCIAS**

**LABICER (Laboratorio N° 12)**

**ANÁLISIS QUÍMICO, CONSULTORÍA E INVESTIGACIÓN**



---

**INFORME TÉCNICO N° 0369 – 18 –**

**LABICER**

**1. DATOS DEL SOLICITANTE**

**1.1 NOMBRE DEL SOLICITANTE** : AMÉRICOCASTRO

LUNA 1.2 D.N.I. :25455526

**2. FECHA DE EMISIÓN** : 05 / 03 / 2018

**3. ANÁLISIS SOLICITADO** : ANÁLISIS DE OCRATOXINA A POR HPLC

**4. DATOS REFERENCIALES DE LA MUESTRA SEGÚN EL SOLICITANTE**

**4.1 IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA** : 12 EXTRACTOS DE OCRATOXINAS A DE LA PLANTA  
CACAO

N°	MUES TRA
1	Muestra T-F1
2	Muestra T-F2
3	Muestra T-F3
4	Muestra T-S1

5	Muestra T-S2
6	Muestra T-S3
7	Muestra T-A1
8	Muestra T-A2
9	Muestra T-A3
10	Muestra T-CH1
11	Muestra T-CH2
12	Muestra T-CH3

**5. DATOS DEL ESTÁNDAR DE  
OCRATOXINA A**

- 5.1 NOMBRE DEL PRODUCTO : OCRATOXINA A
- 5.2 NÚMERO DE LOTE : D00171728
- 5.3 MARCA : MERCK MILLIPORE
- 5.4 PUREZA : 99.18%

**9. DOCUMENTO DE REFERENCIA :**

**6. LUGAR DE RECEPCIÓN DE LA  
MUESTRA**

: LABICER - FACULTAD DE CIENCIAS

**7. CONDICIONES AMBIENTALES :** Temperatura: 22.5°C; Humedad relativa: 60 %

**8. MÉTODO UTILIZADO :** CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTO RENDIMIENTO.

## **10. EQUIPOS UTILIZADOS**

CROMATÓGRAFO LÍQUIDO DE ALTO RENDIMIENTO-HPLC.  
SHIMADZU.

- Desgasificador: DGU-20A5R
- Bomba: LC-30AD
- Automuestreador: SIL-30AC
- Horno de Columna: CTO-20AC
- Detector de fluorescencia: RF-20Axs
- Control de Sistema: CBM-20A

BALANZA ANALÍTICA DIGITAL. SARTORIUS, CPA225D.

EQUIPO ULTRASONIDO, WISD Laboratory Instruments.

EQUIPO DE AGUA ULTRA PURA. ELGA PURELAB CLASSIC UV.

## **11. REACTIVOS**

- Estándar OCRATOXINA A, 99.18%, adquirido de MERCK PERUANA.
- Acetonitrile, gradient 240nm/far UV HPLC grade, adquirido de MERCK PERUANA.
- Ácido acético glacial P.A., adquirido de MERCK PERUANA.
- Agua ultrapura, purificada en equipo ELGA PURELAB CLASSIC UV.

## **12. SOLUCIONES ESTÁNDAR**

Se recibieron las siguientes soluciones estándar de trabajo de Ocratoxina A: 0.25; 0.5; 1; 2.5 y 5 µg/L preparadas en Metanol: Ac. Acético: Agua (49:1:50).

### 13. MUESTRAS

Se recibieron 12 extractos de Ocratoxina A. Las muestras se filtraron usando filtros de jeringa de 0.45µm y se trasvasaron a los viales. Estos se colocaron inmediatamente en la bandeja de viales del HPLC, acondicionada a 15°C, para su análisis inmediato.

### 14. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

<b>Columna</b>	RPC18 de 250 mm x 4.6 mm ID x 5 µm Partícula (Restek)
<b>Horno de Columna</b>	25°C
<b>Detector</b>	Detector de Fluorescencia
<b>Longitud de onda de excitación</b>	333nm
<b>Longitud de onda de emisión</b>	460nm
<b>Bomba</b>	Cuaternaria
<b>Flujo</b>	1 mL/min
<b>Fase móvil</b>	A: CH <sub>3</sub> CN (1% ác. Acético) B: H <sub>2</sub> O(1% ác. Acético)
<b>Elución</b>	Gradiente 0 a 20min: A:B, 50:50 a A:B, 100:0 20 a 23min: A:B, 100:0 23 a 33min: A:B, 100:0 a A:B, 50:50

<b>Volumen de Inyección</b>	25 µL
<b>Tiempo de corrida</b>	33min
<b>Integración</b>	Área vs Concentración

## 15. RESULTADOS

<b>Muestra</b>	<b>Tiempo de retención (min)</b>	<b>Área</b>	<b>Altura</b>	<b>CONTENIDO DE OCRATOXINA A ug/L &lt;&gt; ppb</b>
Muestra T-F1_ Inyección 1	-	-	-	< L.D.D.
Muestra T-F1_ Inyección 2	-	-	-	< L.D.D.
Muestra T-F2_ Inyección 1	-	-	-	< L.D.D.
Muestra T-F2_ Inyección 2	-	-	-	< L.D.D.
Muestra T-F3_ Inyección 1	-	-	-	< L.D.D.
Muestra T-F3_ Inyección 2	-	-	-	< L.D.D.
Muestra T-S1_ Inyección 1	-	-	-	< L.D.D.
Muestra T-S1_ Inyección 2	-	-	-	< L.D.D.
Muestra T-S2_ Inyección 1	-	-	-	< L.D.D.
Muestra T-S2_ Inyección 2	-	-	-	< L.D.D.
Muestra T-S3_ Inyección 1	-	-	-	< L.D.D.
Muestra T-S3_ Inyección 2	-	-	-	< L.D.D.
Muestra T-A1_ Inyección 1	8.052	3,384	548	0.938
Muestra T-A1_ Inyección 2	8.052	3,370	545	0.935
Muestra T-A2_ Inyección 1	8.049	1,422	230	0.457

Muestra T-A2_ Inyección 2	8.050	1,432	232	0.460
Muestra T-A3_ Inyección 1	-	-	-	< L.D.D.
Muestra T-A3_ Inyección 2	-	-	-	< L.D.D.
Muestra T-CH1_ Inyección 1	-	-	-	< L.D.D.
Muestra T-CH1_ Inyección 2	-	-	-	< L.D.D.
Muestra T-CH2_ Inyección 1	-	-	-	< L.D.D.
Muestra T-CH2_ Inyección 2	-	-	-	< L.D.D.
Muestra T-CH3_ Inyección 1	-	-	-	< L.D.D.
Muestra T-CH3_ Inyección 2	-	-	-	< L.D.D.

(1)L.D.D.: Límite de detección=0.20ug/L. Ver su cálculo en anexos.

## **16. VALIDEZ DEL INFORME TÉCNICO**

El Informe técnico es válido solo para la muestra y las condiciones indicadas en los ítems del uno(1) al cuatro(4) del presente informe técnico.