



**Departamento de Posgrados
Maestría en Gestión de Calidad y Seguridad
Alimentaria**

Tema:

**“Análisis de ocratoxina en chocolate de hoja comercializado
en los mercados de la ciudad de Cuenca”**

Título a obtener:

Magister en Gestión de Calidad y Seguridad Alimentaria

Autor:

Ing. Wilson Alfredo Bonilla Jaramillo

Directora:

María Elena Cazar, Ph.D.

Cuenca, marzo de 2013

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE CONTENIDO	i
1. DEDICATORIA	iv
2. AGRADECIMIENTOS	v
3. RESUMEN	vi
4. PALABRAS CLAVE	vi
5. ABSTRACT Y KEYWORDS	vii
6. INTRODUCCIÓN.....	1
6.1 Hongos productores de OTA y condiciones de crecimiento.....	2
6.2 Toxicidad de la Ocratoxina.....	2
6.3 Toxicocinética y toxicodinámica de la OTA.....	3
6.4 Presencia de hongos productores de OTA durante el procesamiento de cacao.....	5
7. CAPÍTULO I: MATERIALES Y MÉTODOS	6
7.1 Obtención de muestras de cacao artesanal.....	6
7.4 Validación de la técnica de determinación de Ocratoxina	9
8. CAPÍTULO II: RESULTADOS.....	10
8.1 Niveles de Ocratoxina en las muestras incluidas en el estudio	10
8.2 Comparación de los niveles de Ocratoxina entre los proveedores de cacao artesanal. 10	
8.3 Análisis de la poscosecha de cacao de la zona sur del Ecuador.....	11
9. CAPÍTULO III: DISCUSIÓN	12
9.1 Niveles de Ocratoxina en las muestras incluidas en el estudio	12
9.2 RESULTADOS POR PROVEEDOR	12
9.3 Evidencias de incumplimiento de la Norma Brasileña de niveles de OTA en alimentos 12	
9.4 NORMATIVA VIGENTE ECUATORIANA RELATIVA A LA CONTAMINACIÓN CON MICOTOXINAS EN ALIMENTOS.	13
10. CAPÍTULO IV: CONCLUSIONES.....	14
11. RECOMENDACIONES.....	15
12. REFERENCIAS.....	17
12.1 BIBLIOGRAFICAS.....	17
12.2 ELECTRONICAS	17
13. ANEXOS	20
13.1 Disposición brasileña “Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos (RESOLUÇÃO Nº 7, DE 18 DE FEVEREIRO DE 2011)”.	20
13.2 NTEINEN 623.....	20

13.3	Resultados de kit Veratox de ocratoxina del Laboratorio de Microbiología, Facultad de Ciencia y Tecnología de la Universidad del Azuay.	20
13.4	Resultados de validación de ocratoxina de laboratorios Veratox, Illinois, Estados Unidos.	20

ÍNDICE DE TABLAS.

	Página
Tabla 1	2
Tabla 2	4
Tabla 3	6
Tabla 4	10
Tabla 5	10

ÍNDICE DE FIGURAS.

	Página
Figura 1	8
Figura 2	8
Figura 3	8
Figura 4	9
Figura 5	11
Figura 6	11
Figura 7	12
Figura 8	13
Figura 9	14

1. DEDICATORIA

A Dios: por ser el centro y sustento de mi vida.

A mi familia: a mi esposa e hijos por su amor, comprensión y apoyo incondicional.

A mis padres: por su ejemplo de superación y constancia.

2. AGRADECIMIENTOS

A la Universidad del Azuay y a todo el grupo de catedráticos, por su impartición de conocimientos.

Mi agradecimiento especial a María Elena Cazar PhD., directora de tesis por su tiempo y guía para el desarrollo de este trabajo.

3. RESUMEN

Para realizar el estudio de la presencia de ocratoxina en el “chocolate de hoja” comercializado en la ciudad de Cuenca se recolectaron en diferentes tiempos 87 muestras expandidas en los mercados “Feria Libre” y “Diez de Agosto”; este producto es elaborado por cuatro proveedores. Para la determinación de ocratoxina se utilizó un método de Elisa Conjugado. El límite máximo permitido fue tomado de la disposición brasileña “Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos (RESOLUÇÃO Nº 7, DE 18 DE FEVEREIRO DE 2011)”.

Los resultados obtenidos mostraron que el 1,15%, de las muestras (1 muestra de 87) registró ausencia de ocratoxina, que el 3,4% se encuentra dentro del límite máximo de la norma (5 ppb) y el 96,6% está fuera de norma, con lo que queda demostrado el insuficiente control en poscosecha de cacao y fabricación de chocolate en la zona de estudio.

4. PALABRAS CLAVE

Ocratoxina, cacao artesanal, OTA.

ABSTRACT

During the study of the presence of ochratoxin in “chocolate slabs” that are commercialized in the city of Cuenca, we collected 87 samples from the markets “*Feria Libre*” and “*Diez de Agosto*”. In order to determine the existence of ochratoxin we employed the Elisa Conjugated method. We applied the Brazilian Standard “Dispõe sobre límites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos (RESOLUÇÃO Nº 7, DE 18 DE FEVREIRO DE 2011)”.

The results showed that 1, 15% of the samples had absence of ochratoxin and 96, 6% are out of the standard, which shows that the control process after cocoa harvesting is insufficient.



Translated by,
Diana Lee Rodas

AUTOR: Wilson Alfredo Bonilla Jaramillo
TRABAJO DE: Graduación
DIRECTORA: María Elena Cazar, Ph.D.
FECHA: Marzo, 2013

“Análisis de ocratoxina en chocolate de hoja comercializado en los mercados de la ciudad de Cuenca”

6. INTRODUCCIÓN

La Ocratoxina A (OTA) ($C_{20}H_{18}O_6NCl$) es una molécula formada por un anillo de 3,4-dihidrometil isocumarina unido, por medio de su grupo carboxilo y través de un enlace tipo amida, a una molécula de fenilalanina (fig. 1). OTA es una molécula muy estable, incolora, soluble en disolventes orgánicos polares, poco soluble en agua, con características de ácido débil y capaz de emitir fluorescencia al ser excitada con luz ultravioleta. Detectada por primera vez en muestras de maíz africanas, es considerada un metabolito secundario tóxico producido por especies de hongos filamentosos superiores de los géneros *Penicillium* y *Aspergillus*, capaces de crecer sobre una amplia gama de sustratos orgánicos (Ravelo-Abreu *et al.*, 2011).

Los cereales, en humanos, y los piensos, en animales, constituyen las principales fuentes de exposición alimentaria, aunque también pueden encontrarse niveles notables de contaminación en otros alimentos. Los granos de café verde, la carne y sus derivados, las uvas, el vino, las pasas e higos secos, el chocolate, las legumbres, la cerveza y las especias, constituyen fuentes dietéticas a considerar sólo en caso de altas ingestas. Otras fuentes no convencionales de OTA son el té, las infusiones, el regaliz, el aceite de oliva y los alimentos infantiles a base de cereales. Esta toxina ha sido implicada en la incidencia de enfermedades al riñón en algunas localidades asiáticas (Carlile *et al.*, 2001).

Las prácticas agrícolas y las condiciones medioambientales (humedad y temperatura) durante el almacenamiento y el transporte afectan de forma directa a los niveles de OTA en los alimentos. Asimismo, se ha demostrado que una alta actividad de agua favorece la producción de OTA en los alimentos (A. Ravelo Abreu, 2011).

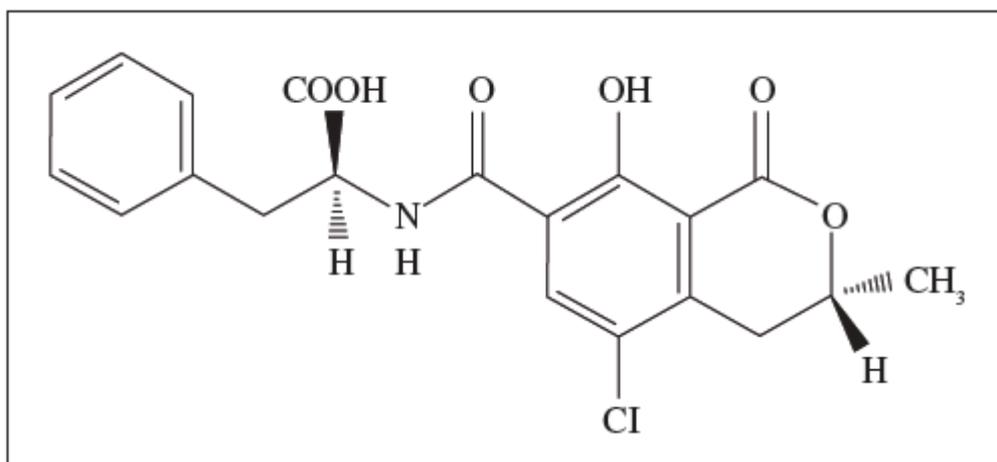


Fig. 1.—Estructura química de la OTA.
(A. Ravelo Abreu, 2011)

6.1 Hongos productores de OTA y condiciones de crecimiento

Las Ocratoxinas son producidas por especies de *Aspergillus*, específicamente *A. ochraceus*, el cual crece preferentemente en sustratos de café y cacao, en zonas tropicales. *Penicillium verrucosum* se desarrolla en climas mediterráneos, creciendo en cereales como la cebada. Los valores mínimos de actividad agua necesarios para que los hongos puedan producir OTA están en el intervalo 0,83-0,9. A 24° C los valores de actividad agua óptimos se sitúan entre 0,95-0,99. A un valor óptimo de actividad agua *A. ochraceus* puede producir OTA a temperaturas entre 12-37°C, y *P. verrucosum* entre 4-31°C. (Carlile et al., 2001).

6.2 Toxicidad de la Ocratoxina

La OTA ha sido implicada en un rango amplio de efectos toxicológicos, que incluyen toxicidad renal, mutagenicidad, teratogenicidad, neurotoxicidad e inmunotoxicidad, en humanos y animales. Basados en estudios epidemiológicos y en animales, la Agencia Internacional de Investigación contra el Cáncer (IARC) ha clasificado a esta micotoxina en la categoría 2B, es decir, como posible carcinógeno humano (O'Brien y Dietrich, 2007).

La exposición a alimentos contaminados con OTA se ha relacionado con evidencias epidemiológicas de cáncer testicular debido a la formación de aductos con el ADN inducidos por la acción de este genotóxico. Los biomarcadores urinarios de OTA ofrecen mejor resultados frente a la exposición de OTA que los niveles detectados en plasma.

La toxicidad aguda de la OTA presenta variaciones interespecíficas. La DL₅₀ por vía oral presenta un intervalo entre 20-50 mg/kg en ratas y ratones, y entre 0,2-1mg/kg en perros, cerdos y pollos, que son las especies más sensibles. Los síntomas de una intoxicación aguda consisten en pérdida de peso, poliuria, polidipsia, hemorragias multifocales en los principales órganos y trombos de fibrina en los órganos de mayor actividad metabólica (bazo, cerebro, hígado, riñón y corazón), así como nefrosis y necrosis hepáticas.

La toxicidad crónica de la OTA se traduce en una nefropatía intersticial en los animales de granja (pollos y cerdos) conocidas como nefropatías porcinas y aviarias. La OTA constituye, además, el principal factor determinante del desarrollo de tumores en el tracto urinario en el hombre y de la “Nefropatía endémica de los Balcanes”, presentando gran incidencia en las regiones del sudeste de Europa (Bosnia, Serbia, Croacia, Bulgaria y Rumanía), y caracterizada por ser una grave afección histopatológica que cursa con una neuropatía túbulo-intersticial progresiva, que deriva en atrofia tubular y fibrosis periglomerular¹⁶, produciendo daños similares a los observados en animales. Finalmente, algunos autores apuntan que individuos en estado de malnutrición son especialmente sensibles a los efectos adversos de las micotoxinas. (A. Ravelo Abreu, 2011)

6.3 Toxicocinética y toxicodinámica de la OTA

La OTA se absorbe en el tracto gastrointestinal, y pasa a la circulación sistémica, detectándose en sangre y tejidos. Las concentraciones más altas se detectan en los órganos de mayor actividad metabólica como riñón, hígado, músculo y grasa. Durante su distribución, la OTA tiene una alta capacidad de fijación a las proteínas plasmáticas, y presenta una semivida de eliminación larga, con valores en el cerdo de 72-120 horas y en el hombre 840 horas (35 días), siendo la fracción libre de toxina < 0,2%¹³⁻¹⁵. Tanto la OTA como sus metabolitos se excretan por vía renal y hepatobiliar. También se han observado niveles de OTA en las secreciones lácteas lo cual constituye un riesgo para el recién nacido afectándolo de manera directa en su crecimiento y desarrollo. Un caso excepcional es el de los rumiantes ya que la OTA no es excretada por vía láctea debido a su previa degradación por acción de la microflora del rumen. El metabolismo de Ocratoxina A genera derivados hidroxilados (4-OH-OTA y 10-OH-OTA) y productos de conjugación con glutatión (fig. 2). La OTA puede actuar como sustrato de la enzima fenilalanina hidroxilasa dando lugar como producto final a la Tyr-OTA que es metabolizado a 4R/S-hidroxitirosin-OTA y otros metabolitos.

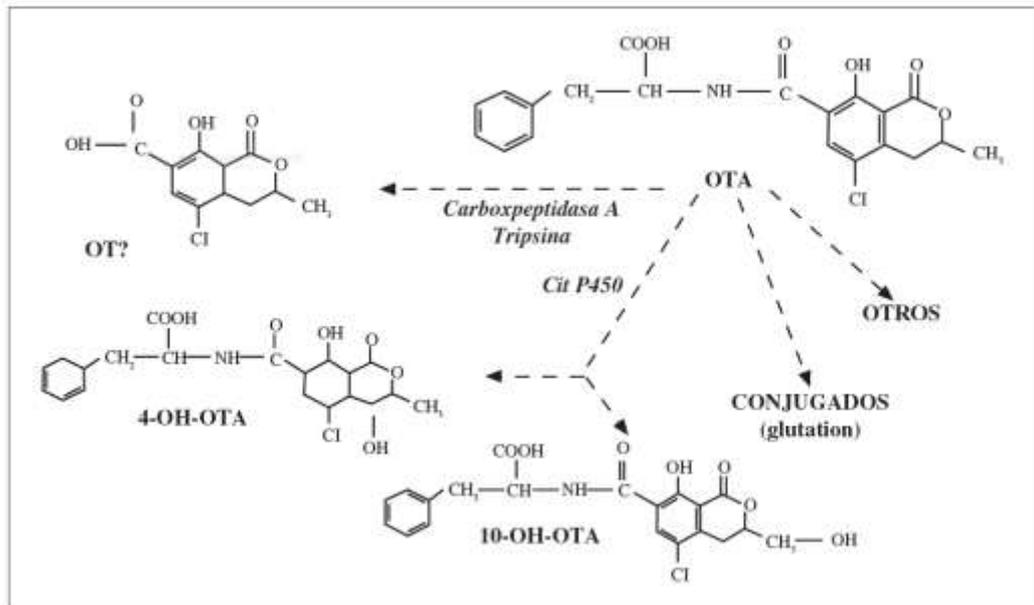


Fig. 2.—Metabolismo de la OTA.

(A. Ravelo Abreu, 2011)

Los principales mecanismos de acción de la Ocratoxina A mediante los cuales ejerce su toxicidad son:

- Alteración sobre la respiración celular: La OTA actúa inhibiendo competitivamente la actividad de la ATPasa, la succinato deshidrogenasa y la citocromo C oxidasa lo que genera efectos similares a los producidos en una lesión celular, obteniendo como productos finales radicales hidroxilados porperoxidación lipídica.
- Alteración de la síntesis de proteínas: Este mecanismo se produce a nivel post-transcripcional por inhibición competitiva de la Phe-ARNt sintetiza. Estudios in vitro con células renales demuestran un efecto inductor de la OTA sobre la caspasa y la proteinkinasa que induce a la alteración de la síntesis de ADN con sus consiguientes lesiones.
- Secuestro de calcio microsomal: Este mecanismo constituye una reacción temprana y ligada al fenómeno de peroxidación lipídica. Diversos estudios tanto in vitro como in vivo demuestran que la OTA produce una inhibición en el bombeo y captación del calcio a través del retículoendoplasmático del hepatocito. Experimentalmente, se ha demostrado que los niveles de calcio descienden entre un 43,5% (al tratar ratas con 10 mg/kg p.c) y un 80% (al tratar con 10 M de OTA en un cultivo de microsomas hepáticos de rata).

6.4 Presencia de hongos productores de OTA durante el procesamiento de cacao

La producción mundial de cacao se estima en 3 592 000 toneladas (Jespersen, 2006) La fermentación es el estado principal en el procesamiento post-cosecha del cacao. Generalmente se lo lleva a cabo de forma tradicional, mediante fermentación espontánea. Se inicia con colonización por levaduras, seguida por bacterias lácticas y acéticas, las cuales son finalmente reemplazadas por bacilos aeróbicos esporulados. (Mounjouenpou, 2008)

Se calcula que 4.5 billones de personas de la población humana alrededor del mundo está expuestas a micotoxinas, las cuales pueden ser encontradas en climas templados y continentales, incluyendo los trópicos (Weidenbörner, 2011). En una reciente investigación sobre el efecto de las micotoxinas en el ser humano realizado por R. Lazo y G. Sierra, los autores concluyeron que, a partir de una investigación de la presencia de micotoxinas en los alimentos de consumo popular en la ciudad de Guayaquil, la contaminación de los alimentos por aflatoxinas era del 54%, por vomitoxina del 60%, por zearalenona del 59%, por toxina T-2 del 60% y por ocratoxina del 45%, generando en los pacientes estudiados descompensaciones hemodinámicas y hasta muerte por fallo respiratorio. (IICA – ECUADOR, 2011)

En observaciones realizadas en las zonas de estudio, donde se inicia el procesamiento del cacao, se evidenció que el proceso de fermentación se desarrolla sin control de la naturaleza y el nivel de crecimiento de los microorganismos responsables de la fermentación del cacao. Por este motivo, el presente estudio se enfoca a la determinación de OTA como resultado de la contaminación del grano de cacao por hongos filamentosos productores de esta toxina. A continuación se describen los métodos utilizados en este estudio, los resultados obtenidos y los alcances de la presente investigación.

7. CAPÍTULO I: MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Obtención de muestras de cacao artesanal.

Para el desarrollo de la presente investigación se estimó analizar un total de **78 muestras**. El tamaño de muestra fue calculado considerando un universo finito, es decir contable y la variable de tipo categórica. El tamaño del universo fue estimado en 96. Para estimar el tamaño de muestra se aplicó la fórmula que se presenta a continuación, con un margen de error del 5% y un nivel de confianza de 99%.

$$n = \frac{N * Z_{\alpha}^2 * p * q}{d^2 * (N - 1) + Z_{\alpha}^2 * p * q}$$

Donde:

- N = Total de la población
- Z_{α} = 1.96 al cuadrado (si la seguridad es del 95%)
- p = proporción esperada (en este caso 5% = 0.05)
- q = 1 – p (en este caso 1-0.05 = 0.95)
- d = precisión (en su investigación use un 5%).

Fuente:(Anderson , 2008)

En el desarrollo de la investigación se analizaron **87 muestras**. Dado que el número de unidades experimentales supera el tamaño de muestra calculado, el margen de error disminuye a 3.3%.

FORMULA DE ESTIMACION DE LA MUESTRA (IDEAL)				
	(*) Universo de Muestras	Muestra (n)	Error de estimación (e)	Nivel confianza (o)
Mínimo	96	78	5%	99%
Real	96	87	3,3%	99%
	Dif.	9	1,7%	
	%	12%	34%	
<u>Fuente:</u> Ing. Alfredo Bonilla				
<u>Elaboración:</u> Ing. Alfredo Bonilla				
<u>Fecha:</u> febrero-2013				
Tabla 3				

Las muestras se recolectaron durante 15 semanas, obteniendo un estimado de 4 muestras semanales en el mercado "Feria Libre" y de 2 muestras en el mercado "Diez de Agosto".

El estudio de las primeras 43 muestras se realizó en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad del Azuay, conjuntamente con personal de NEOGEN Ecuador, mientras que el análisis de las 44 muestras restantes se efectuó en los laboratorios de Neogen, Illinois, Estados Unidos.

7.2 Principios del ensayo de kit de ELISA Competitivo Directo.

Veratox para Ocratoxinas es un ensayo inmunoensimático competitivo directo (CD-ELISA) que permite al usuario obtener concentraciones exactas en partes por billón (ppb). Se permite que la ocratoxina libre en las muestras y los controles compita con la ocratoxina etiquetada con enzimas (conjugado) para los puntos de unión de anticuerpos. Después de un paso de lavado, se agrega sustrato, el cual reacciona con el conjugado de unión para producir un color azul. Entre mayor es el color azul, es menor el nivel de ocratoxina. La prueba se lee en un lector de micropozos para producir densidades ópticas de la muestra se grafican comparándolas con la curva para calcular la concentración exacta de ocratoxina. (NEOGEN CORPORATION, 2011).

7.3 Determinación de Ocratoxina por ensayo ELISA.

Las muestras obtenidas tal como se describe en 7.1 fueron analizadas con el fin de determinar los niveles de ocratoxina presente en cacao artesanal. Para el efecto se utilizó un kit Veratox® (Lote, 25236; Fecha de expiración: Abril 10, 2013). El kit está constituido por:

1. 48 micropozos recubiertos con anticuerpos
2. 48 pozos para mezclar
3. 5 controles de ocratoxina de 0, 5, 10 y 25 ppb
4. Solución conjugado HRP de ocratoxina
5. Solución de Sustrato K-Blue
6. Solución Detenedora (Red Stop)
7. Instrucciones para uso

La determinación procedió según el protocolo que se detalla a continuación:

- Preparación de muestras: 10 g de muestra fueron extraídos con 40 mL de metanol al 50% v/v. La muestra fue homogeneizada con la ayuda de una licuadora y filtrada por dos veces. El filtrado fue empleado para el desarrollo de la prueba ELISA de determinación de ocratoxina.

- Prueba ELISA para la determinación de Ocratoxina en cacao

Se presenta el procedimiento detallado para el desarrollo de una prueba de determinación de Ocratoxina en alimentos, según las instrucciones provistas en el kit Veratox®.

1. Retire 1 pozo de marcado con rojo para cada muestra que se va a probar, más 5 pozos para controles marcados con rojo y colóquelos en el porta pozos.
2. Retire un número igual de pozos recubiertos con anticuerpos. Devuelva inmediatamente los pozos de anticuerpo que no van a utilizarse al paquete del papel metalizado con desecante. Marque un extremo de la tira con "1" y coloque la tira de porta pozos con el lado marcado al lado izquierdo. No marque el interior o el fondo de los pozos.
3. Mezcle cada reactivo revolviendo su frasco de reactivo antes de usarlo.
4. Coloque 100 ul de conjugado con frasco de etiqueta azul en cada pozo de mezcla marcado con rojo.

5. Utilice una punta de pipeta nueva para cada uno, transfiera 100ul de controles y muestra a los pozos para mezclado marcados con rojo como se describe a continuación.



Figura 1

Tira 1

0 2 5 10 25 S1 S2 S3 S4 S5 S6 S7

Tira 2

S8 S9 S10 S11 S12 S13 S14 S15 S16 S17 S17 S19

6. Utilizando una pipeta de 12 canales, mezcle el líquido de los pozos pipeteándolo hacia arriba y hacia abajo 3 veces. Transferir 100 ul a los pozos recubiertos con el anticuerpo. Mezcle deslizando hacia atrás y hacia adelante el porta pozos sobre una superficie plana durante 10-20 segundos sin salpicar los reactivos de los pozos. Incube durante 10 minutos a temperatura ambiente (18-30°C).

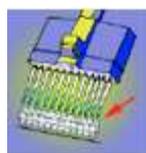


Figura 2

7. Deseche los pozos marcados con rojo.
8. Agite para sacar el contenido de los pozos. Llene los pozos con agua destilada o desionizada y descártelos. Repita 5 veces este paso, luego voltee los pozos hacia abajo y golpee sobre una toalla de papel hasta que se retire toda el agua restante.

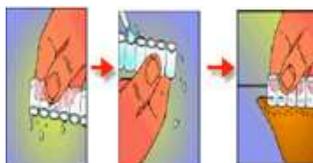


Figura 3

9. Vierta el volumen necesario de la solución de sustrato del frasco que contiene etiqueta verde a la cubeta de reactivo con etiqueta verde.
10. Puntas nuevas en la pipeta de 12 canales, ceebe y pipetee 100 ul de sustrato dentro de los pozos. Mezcle deslizando hacia atrás y hacia adelante sobre una superficie plana durante 10-20 segundos.
11. Incube durante 10 minutos. Desechando el sustrato restante y enjuague con agua la cubeta de reactivo.
12. Vierta la solución detenedora del frasco con etiqueta roja dentro de la cubeta con reactivo de la cubeta roja.

13. Saque el excedente de sustrato de la pipeta de 12 canales, ceebe las puntas y pipetee 100ul de solución detenedora a cada pozo. Mezcle hacia atrás y hacia adelante sobre una superficie plana. Deseche las puntas.
14. Limpie el fondo de los micro pozos con un paño o toalla seca y lea en un lector de micro pozos con un filtro de 650 nm. Se deberá eliminar las burbujas de aire, ya que pueden afectar los resultados analíticos. Los resultados deben leerse dentro de los siguientes 20 minutos luego de agregar la solución detenedora.

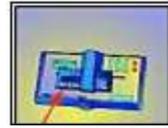


Figura 4

15. Lea y calcule los resultados utilizando el lector de micropozos AwarenessStat-Fax de Neogen o alguno equivalente. Si utiliza un lector EL301 u otro detector de tira/placa, calcule utilizando el software Veratox de Neogen.

7.4 Validación de la técnica de determinación de Ocratoxina

Con el fin de establecer si los resultados obtenidos pueden tener dependencia con la técnica de cuantificación, se enviaron 44 muestras de cacao artesanal al Laboratorio de Veratox, Illinois, USA. En este laboratorio se realizó la determinación de OTA mediante pruebas Test Kits used to validate chocolate paste Veratox ochratoxin lot 181303

8. CAPÍTULO II: RESULTADOS.

8.1 Niveles de Ocratoxina en las muestras incluidas en el estudio

Resumen GENERAL de resultados: análisis de ocratóxina.	
Indicador	
Valor máximo	 86,2 ppb
Valor mínimo	 0,0 ppb
Media	 22,8 ppb
Máximo permitido	 5 ppb
Desviación estándar	15,5
No. muestras	87
No. muestras que cumplen con la norma	3
	3,4%
<u>Fuente:</u> Laboratorios Veratox (ILLINOIS - Estados Unidos). Laboratorio de Microbiología, Facultad de Ciencia y Tecnología de la Universidad del <u>Elaboración:</u> Ing. Alfredo Bonilla <u>Fecha:</u> febrero-2013	
Tabla 4	

EL análisis de estos resultados se encuentran en el punto 9.1

8.2 Comparación de los niveles de Ocratoxina entre los proveedores de cacao artesanal.

Para establecer si existen diferencias significativas entre los promedios de ocratoxina según la proveniencia de las muestras, se realizó un análisis de varianza a un factor, comparando los niveles de OTA agrupados por proveedor. A continuación se presenta el cuadro de ANOVA y el estadístico de Fisher calculado.

ANOVA A UN FACTOR. COMPARACIÓN DE NIVELES DE OTA DE CACAO ARTESANAL POR PROVEEDOR

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	p
Inter-grupos	335,461	3	111,820	0,458	0,712
Intra-grupos	20259,035	83	244,085		
Total	20594,496	86			

Tabla 5

EL análisis de estos resultados se encuentran en el punto 9.2

8.3 Análisis de la poscosecha de cacao de la zona sur del Ecuador.

En el recorrido realizado en las zonas de secado de cacao en la zona baja del cantón Pucará, en el sitio llamado San Sebastián, comúnmente conocido como el desierto del Río Jubones, donde se acostumbra a secar el cacao, se pudo observar que se realiza dicha actividad con grandes cantidades de producto (alrededor de 100 qq.) y en las proximidades de los carreteros como se evidencia en las fotografías, sin tener ninguna protección que evite que el cacao sea humedecido con las aguas lluvias y contaminado.

Cuando comienza a llover se procede a recolectar el cacao manualmente, lo cual toma mucho tiempo, dando lugar a que el mismo se moje, gane humedad y se incremente el tiempo de secado; así se generan las condiciones adecuadas para que se desarrolle el crecimiento del *Aspergillus Ochraceus*, productor de ocratoxina.

Las condiciones de almacenaje no son las adecuadas ya que no llevan ningún control en humedad, temperatura y condiciones básicas.

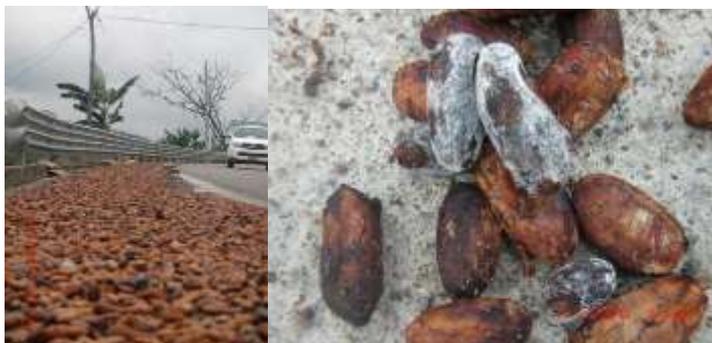


Figura 5: Condiciones de secado de grano de cacao en la zona del desierto del Río Jubones.

Se podría concluir que, mientras no exista una concientización real sobre la contaminación que sufre el cacao en dicho proceso, tanto en las autoridades de control cuanto en las personas que realizan la poscosecha, seguirá contaminándose de ocratoxina el cacao de consumo local. Sin el compromiso de los involucrados, seguiremos en la misma situación.

Considerando que en la cáscara se encuentra alrededor del 50% de dicha micotoxina, es importante recalcar que los productores de chocolate artesanal no cuentan con procedimientos efectivos que permitan que en la etapa de descascarillado sea eliminado el total de la cascarilla, pues al no hacerlo es causa de una mayor presencia de ocratoxina en el producto final.



Figura 6: Bodega de almacenaje de cacao de la Asociación de Cacaoteros Unión de Casacay

9. CAPÍTULO III: DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos del presente trabajo de investigación se analizaron considerando las siguientes situaciones, en relación a normas técnicas vigentes para los niveles de ocratoxina en alimentos:

- Existe un vacío en la Norma Técnica Ecuatoriana para pasta de cacao, NTEINEN 623 ya que no contempla un parámetro para el control de ocratoxina
- Para poder realizar el estudio se revisaron los límites de OTA contemplados en las normas vigentes para cacao en Brasil.
- Brasil RESOLUÇÃO Nº 7, DE 18 DE FEVEREIRO DE 2011(*) establecido 5 µg/kg como nivel máximo para el contenido de OTA en los productos de cacao, incluido el chocolate (ANVISA Resolução no 7/2011).

9.1 Niveles de Ocratoxina en las muestras incluidas en el estudio

De la Tabla 2—observada en el capítulo 9—concluimos que el valor máximo permitido por las norma en Brasil es de 5ppb, el porcentaje que cumple con lo requerido es un **3,4%** de muestras versus un **96.6%** que no las cumplen. Se observa un indicador de desviación estándar extremadamente alto de 15,5, causado por un gran número de muestras con resultados muy alejados del estándar (media).

9.2 RESULTADOS POR PROVEEDOR

El Análisis de Varianza realizado con los resultados obtenidos agrupados por proveedor muestra que no existen diferencias significativas entre los niveles promedio de OTA entre los grupos comparados. Esto implica que todos los proveedores expenden cacao con niveles similares de ocratoxina. El análisis fue realizado a un 95% de confianza ($p = 0.712$)

9.3 Evidencias de incumplimiento de la Norma Brasileña de niveles de OTA en alimentos

Después del análisis de los resultados se evidencian los siguientes hallazgos:

- ✓ Únicamente el 3,4% de las muestras analizadas cumplen con las normas existentes en Brasil.
- ✓ Ninguno de los proveedores evaluados evidencian la aplicación de sistemas adecuados de control de ocratoxina en el ingreso de sus materias primas.



Figura 7: granos de cacao contaminados.

9.4 **NORMATIVA VIGENTE ECUATORIANA RELATIVA A LA CONTAMINACIÓN CON MICOTOXINAS EN ALIMENTOS.**

Tomando en cuenta la toxicidad de la ocratoxina y la responsabilidad que tiene el estado dentro de la Salud Pública, es necesario revisar la normativa vigente, aun más al haberse declarado por parte del Instituto de Investigaciones Agropecuarias, INIAP que “El cacao de exportación cumple con los parámetros de inocuidad en el caso de ocratoxina A”.

La Constitución del Ecuador claramente expresa *-como muestra la gráfica-* en su Art. 13.- *“Las personas y colectividades tienen derecho al acceso seguro y permanente a alimentos sanos, suficientes y nutritivos...”*, por lo tanto es responsabilidad del Estado ecuatoriano cumplir y hacer cumplir con este mandato.

En virtud de esta orden constitucional, la Ley Orgánica de Régimen de la Soberanía Alimentaria cumple con lo exigido en su Artículo 24. Finalidad de la sanidad.- *“La sanidad e inocuidad alimentarias tienen por objeto promover una adecuada nutrición y protección de la salud de las personas; y prevenir, eliminar o reducir la incidencia de enfermedades que se puedan causar o agravar por el consumo de alimentos contaminados”*.

Sin embargo, y entendiendo que las leyes se instrumentan mediante la aplicación de reglamentos y normas técnicas—*como es el caso-* del Instituto Ecuatoriano de Normalización en su NORMA TÉCNICA INEN 623 PASTA (MASA LICOR) DE CACAO no se considera el control de ocratoxina dentro de su tabla de requisitos.

Por lo tanto, AGROCALIDAD siendo el organismo responsable del control poscosecha de cacao, no cuenta con el procedimiento ni con los parámetros concretos para el análisis de ocratoxina, por ende su control es nulo, de esta forma el Instituto Nacional de Higiene y Medicina Tropical (Leopoldo Izquieta Pérez) tampoco podría otorgar, mantener, suspender y cancelar el Registro Sanitario, así como su control post registro; sin embargo, el “chocolate de hoja” comercializado en los mercados (“Diez de Agosto” y “Feria Libre”), casi en su totalidad carecen de Registro Sanitario.

En suma, este vacío legal incumple el mandato constitucional observado anteriormente, vulnerando de esta manera, los derechos irrenunciables de los consumidores, que potencialmente y como efecto de la contaminación de la ocratoxina podrían sufrir las siguientes afecciones en su salud:

- ✓ Daño hepático, óseo y en algunos casos cardíaco y aún cerebral.
- ✓ Principalmente daño nefrótico (nefropatía endémica humana).

10. CAPÍTULO IV: CONCLUSIONES

Sobre la base de los resultados, hallazgos obtenidos y el análisis del control poscosecha de cacao y su vinculación con la normativa vigentes, se procedió a elaborar el siguiente análisis –como muestra la gráfica– de factores que constituyen la causalidad de la presencia de ocratoxina en cacao en los locales comerciales de a los mercados de Cuenca.



Figura 9: Causalidad de la presencia de ocratoxina en chocolate de hoja.

Fuente: Ing. Alfredo Bonilla.

Elaboración: Ing. Alfredo Bonilla

11. RECOMENDACIONES

A continuación se presenta la siguiente matriz que define las estrategias de intervención, indicadores y entidades responsables para cada una de las causas que permiten la presencia de ocratoxina en el “chocolate de hoja”:

ESTRATEGIAS DE INTERVENCIÓN RECOMENDADAS:

No	CAUSAS	ESTRATEGIAS DE INTERVENCIÓN	INDICADOR		RESPONSABLES	EN COORDINACIÓN CON:
			GESTIÓN	IMPACTO		
1	Inadecuado proceso de recolección de mazorcas de cacao	Mejoramiento de manejo poscosecha, a través de la aplicación de programas de capacitación en la cosecha, acopio y transporte de mazorcas de cacao.	No. productores capacitados.	Número de quintales de cacao con niveles permitidos de ocratoxina en función de la norma internacional (hasta contar con norma técnica propia).	MAGAP: INIAP.	Organizaciones de cacaoeros, Gobiernos Autónomos Descentralizados (Municipios y Prefecturas).
		Implementación de un manual de buenas prácticas agrícolas vinculado a la eliminación de ocratoxina.	No. productores aplicando buenas prácticas agrícolas.			
2	Falta de control en el secado al sol del cacao	Implementación de una guía de secado de cacao.	No. Productores capacitados.		MAGAP: INIAP	
		Implementación de un manual de buenas prácticas agrícolas vinculado a la eliminación de ocratoxina.	No. productores aplicando buenas prácticas agrícolas.			
3	Inexistente control en el almacenaje de cacao.	Determinación de los parámetros adecuados para el almacenaje de cacao en grano seco.	No. Comerciantes aplicando parámetros adecuados para el almacenaje de cacao en grano seco.		MAGAP: INIAP	
4		Implementación de un manual de buenas prácticas agrícolas vinculado a la eliminación de ocratoxina.				
5	Carencia de control de ocratoxina en Norma Técnica Ecuatoriana	Coordinación interinstitucional (Ministerio de Comercio Exterior, Industrialización, Pesca y Acometividad y el Instituto Ecuatoriano de Normalización) que permitan normalizar los límites aceptables de ocratoxina.	Norma Técnica Ecuatoriana INEN que integre el parámetro para el control de ocratoxina en cacao y sus derivados.	Número de quintales de cacao y sus derivados con niveles permitidos de ocratoxina en función de la norma internacional (hasta contar con norma técnica propia).	Instituto Ecuatoriano de Normalización.	Coordinación interinstitucional (Ministerio de Comercio Exterior, Industrialización, Pesca y Competitividad e INEN).
6	No existe Registro Sanitario para la mayoría de chocolates de hoja comercializados en la ciudad de Cuenca	Determinación de los parámetros de para el otorgamiento de Registro Sanitario, previo coordinación con el Instituto Ecuatoriano de Normalización.	Instituto nacional de higiene y enfermedades tropicales Leopoldo Izquieta Pérez		Instituto Nacional de higiene y enfermedades tropicales Leopoldo Izquieta Pérez.	Coordinación interinstitucional: Instituto Nacional de Higiene y Enfermedades Tropicales Leopoldo Izquieta Pérez e INEN.

No	CAUSAS	ESTRATEGIAS DE INTERVENCIÓN	INDICADOR		RESPONSABLES	EN COORDINACIÓN CON:
			GESTIÓN	IMPACTO		
7	No existe a nivel artesanal controles de materia prima.	Implementación de un laboratorio para control de calidad de materias primas.	No. controles de calidad de materias primas realizados.	No. muestras chocolate de hoja sin contaminación por ocratoxina.	Departamento de control de calidad de la empresa.	Gerencia de la empresa.
8	Deficiente proceso para la eliminación de la cascarilla después del tostado	Implementar el procedimiento adecuado para la mejora de descascarillado, que evite contaminación de ocratoxina.	No. lotes de producción aplicando el procedimiento adecuado de mejora de descascarillado.		Departamento de Producción	

Fuente: Ing. Alfredo Bonilla.

Elaboración: Ing. Alfredo Bonilla

12. REFERENCIAS.

12.1 BIBLIOGRAFICAS

ANADON, ARTURO 2012 MICOTOXINAS MADRID EDICIONES DÍAS SANTOS 2012 ISBN 978-84-9969-196-1

Cameán Ana Maria, Manuel Repeto. 2006. Toxicología Alimentaria. Madrid : Díaz Santos, 2006. ISBN 978-84-7978-727-1.

CAPÓ MARTI, MIGUEL ANDRES, 2007, TOXINOLOGIA CLINICA, ALIMENTARIA Y AMBIENTAL. EDITORIAL COMPLUTENSE, S.A. ISBN 978-84-74-91-879-3

Carlile, M., Watkinson, S., Graham, G. (2001). The Fungi. Segunda Edición. Elsevier Academic Press. Londres

Castillo, José Miguel Soria del. 2007. Micotoxinas en alimentos. España : Díaz Santos, 2007. ISBN 978-84-7978-808-7.

IICA – ECUADOR. 2011. PROGRAMA NACIONAL DE MONITOREO Y MANEJO INTEGRADO DE CONTAMINANTES (PLAGUICIDAS Y MICOTOXINAS) PARA PRODUCTOS DE EXPORTACIÓN. Guayaquil : IICA-ECUADOR, 2011.

NEOGEN CORPORATION 2011, VERATOX FOR OCHRATOXIN, NEOGEN CORPORATION.

Nielsen, Jespersen L., D.S., Hønholt, S., Jakobsen, M. 2006. Bulletin de statistiques du cacao. Rapport annuel 2006. Vol XXXII. s.l. : ICCO, 2006.

O'Brien, E., Dietrich, D. (2007). Ochratoxin A: The Continuing Enigma. Critical Reviews in Toxicology, 35,(1) pp. 33 – 60.

SORIANO, JOSE MIGUEL 2007 MICROTOXINAS EN ALIMENTOS ESPAÑA EDICION DÍAZ DE SANTOS 2007 ISBN:978-7879-808-7

Weidenbörner. 2011. Mycotoxins and their Metabolites in Humans and Animals. Weidenbörner M. Mycotoxins and their Metabolites in Humans and Animals. New York, NY, USA. : Springer, 2011.

12.2 ELECTRONICAS

Agroalimentaria, Fundacion Vasca para la Seguridad. 2008. Ochratoxina a. [En línea] elika, 2013 de Febrero de 2008. [Citado el: 5 de Marzo de 2013.] http://www.elika.net/datos/pdfs_agrupados/Documento18/OCRATOXINA%20A%202012%20maquetado.pdf.

Asamblea Constituyente. 2009. Constitución del Ecuador. [En línea] 21 de Octubre de 2009. [Citado el: 10 de Febrero de 2013.] http://www.asambleanacional.gov.ec/documentos/constitucion_de_bolsillo.pdf.

Asamblea Nacional. 2009. Ley Orgánica del Régimen de la Soberanía Alimentaria. [En línea] 16 de Febrero de 2009. [Citado el: 10 de Febrero de 2013.] http://www.wipo.int/wipolex/es/text.jsp?file_id=250538.

- Abreu, Ravelo A. 2011. A. Ravelo Abreu1, C. Rubio Armendáriz1,2, A. J. Gutiérrez Fernández1 y A. Hardisson de la Torre1,2. [En línea] *Nutrición Hospitalaria*, 26 de Junio de 2011. [Citado el: 30 de Octubre de 2012.] www.nutricionhospitalaria.com/pdf/5381.pdf. SSN 0212-1611.
- Abreu, Ravelo A., C. Rubio Armendáriz1,2, A. J. Gutiérrez Fernández1 y A. Hardisson de la Torre1,2. 2011. *Nutrición Hospitalaria*. [En línea] Scielo, noviembre de 2011. [Citado el: 15 de Octubre de 2012.] http://scielo.isciii.es/scielo.php?pid=S0212-16112011000600004&script=sci_arttext.
- (BCERF), Cornell Program on Breast Cancer and Environmental Risk Factors. 2004. Ochratoxin-A: Its Cancer Risk and Potential for Exposure. [En línea] Cornell University, Diciembre de 2004. [Citado el: 15 de Octubre de 2012 .] <http://envirocancer.cornell.edu/factsheet/general/fs51.ochratoxinA.cfm>.
- Comisión del Codex Alimentarius. 2012. PROGRAMA CONJUNTO FAO/OMS SOBRE NORMAS ALIMENTARIAS. [En línea] Fao, 7 de Mayo de 2012. [Citado el: 10 de Octubre de 2012.] ftp://ftp.fao.org/codex/meetings/ccrvdf/ccrvdf20/rv20_02_add1s.pdf.
- DOCUMENTO DE DEBATE SOBRE LA OCRATOXINA A EN EL CACAO. 2012.. [En línea] Organizaciòn de Naciones Unidas para la Alimentaciòn y Agricultura y Organización Mundial de la Salud, 30 de Marzo de 2012. [Citado el: 25 de Septiembre de 2012.] ftp://ftp.fao.org/codex/meetings/cccf/cccf6/cf06_15s.pdf.
- Ministério da Saúde Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2011. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. [En línea] 18 de Febrero de 2011. [Citado el: 10 de Octubre de 2012.] http://www.ivia.es/nuevaweb/jornadas/Jornada_Seguridad_Alimentariapresentaciones08_Fdez-Espinar.pdf.
- Mounjouenpou, Pauline. 2008. Filamentous fungi producing ochratoxin a during cocoa processing in Cameroon. [En línea] 31 de Enero de 2008. [Citado el: 16 de Febrero de 2013.] <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160507005892>.
- Novella, Dra. Rosa Aznar. 2008. Taxonomía Molecular. [En línea] Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos CSIC, 2008. [Citado el: 3 de Marzo de 2013.] http://www.ivia.es/nuevaweb/jornadas/Jornada_Seguridad_Alimentariapresentaciones08_Fdez-Espinar.pdf.
- Nutrición Hospitalaria* 2011.. [En línea] Scielo, noviembre de 2011. [Citado el: 15 de Octubre de 2012.] http://scielo.isciii.es/scielo.php?pid=S0212-16112011000600004&script=sci_arttext.
- PROGRAMA CONJUNTO FAO/OMS SOBRE NORMAS ALIMENTARIAS. 2013. ANTEPROYECTO DE CÓDIGO DE PRÁCTICAS PARA PREVENIR Y REDUCIR LA CONTAMINACIÓN DEL CACAO POR OCRATOXINA A. [En línea] Organización para las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura - Organización Mundial de la Salud, 12 de Febrero de 2013. [Citado el: 3 de Marzo de 2013.] ftp://ftp.fao.org/codex/meetings/cccf/cccf7/cf07_09s.pdf.

(USAID) Agencia de los Estados Unidos Para el desarrollo internacional y el Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA) y Carta Compromiso de la Fundación Mundial de Cacao (WCF) . 2006. Taller Regional Andino de Aplicación Tecnológica en el Cultivo de Cacao. Lima : IICA Perú, 2006.

13. ANEXOS

- 13.1 Disposición brasileña “Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinasem alimentos (RESOLUÇÃO Nº 7, DE 18 DE FEVEREIRO DE 2011)”.**
- 13.2 NTEINEN 623.**
- 13.3 Resultados de kit Veratox de ocratoxina del Laboratorio de Microbiología, Facultad de Ciencia y Tecnología de la Universidad del Azuay.**
- 13.4 Resultados de validación de ocratoxina de laboratorios Veratox, Illinois, Estados Unidos.**

13.1 Disposición brasileña “Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos (RESOLUÇÃO Nº 7, DE 18 DE FEVEREIRO DE 2011)”.

ADVERTÊNCIA

Este texto não substitui o publicado no Diário Oficial da União



Ministério da Saúde

Agência Nacional de Vigilância Sanitária

RESOLUÇÃO Nº 7, DE 18 DE FEVEREIRO DE 2011(*)

Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos.

A Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, no uso da atribuição que lhe confere o inciso IV do art. 11 do Regulamento aprovado pelo Decreto nº. 3.029, de 16 de abril de 1999, e tendo em vista o disposto no inciso II e nos §§ 1º e 3º do art. 54 do Regimento Interno aprovado nos termos do Anexo I da Portaria nº. 354 da Anvisa, de 11 de agosto de 2006, republicada no DOU de 21 de agosto de 2006, em reunião realizada em 15 de fevereiro de 2011,

Adota a seguinte Resolução da Diretoria Colegiada e eu, Diretor-Presidente Substituto, determino a sua publicação:

Art. 1º Fica aprovado o Regulamento Técnico sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos, nos termos desta Resolução.

Art. 2º Este Regulamento possui o objetivo de estabelecer os limites máximos para aflatoxinas (AFB1+AFB2+AFG1+AFG2 e AFM1), ocratoxina A (OTA), desoxinivalenol (DON), fumonisinas (FB1 + FB2), patulina (PAT) e zearalenona (ZON) admissíveis em alimentos prontos para oferta ao consumidor e em matérias- primas, conforme os Anexos I, II, III e IV desta Resolução.

Parágrafo único. Os limites máximos tolerados referem-se aos resultados obtidos por metodologias que atendam aos critérios de desempenho estabelecidos pelo Codex Alimentarius.

Art. 3º Este Regulamento aplica-se às empresas que importem, produzam, distribuam e comercializem as seguintes categorias de bebidas, alimentos e matérias primas:

I - amendoim e seus derivados;

II - alimentos à base de cereais para alimentação infantil (lactentes e crianças de primeira infância);

III - café torrado (moído ou em grão) e solúvel;

IV - cereais e produtos de cereais;

V - especiarias;

VI - frutas secas e desidratadas;

VII - nozes e castanhas;

VIII - amêndoas de cacau e seus derivados;

IX - suco de maçã e polpa de maçã;

X - suco de uva e polpa de uva;

XI - vinho e seus derivados;

XII - fórmulas infantis para lactentes e fórmulas infantis de seguimento para lactentes e crianças de primeira infância;

XIII - leite e produtos lácteos, e

XIV - leguminosas e seus derivados.

Art. 4º Os níveis de micotoxinas deverão ser tão baixos quanto razoavelmente possível, devendo ser aplicadas as melhores práticas e tecnologias na produção, manipulação, armazenamento, processamento e embalagem, de forma a evitar que um alimento contaminado seja comercializado ou consumido.

Art. 5º No caso de produtos não previstos no art. 3º desta Resolução e que sejam produzidos a partir de ingredientes com limites estabelecidos na forma dos Anexos deste Regulamento, que forem desidratados ou secos, diluídos, transformados e compostos, os limites máximos tolerados devem considerar as proporções relativas dos ingredientes no produto, concentração e diluição em relação aos limites estabelecidos para os ingredientes.

§ 1º Na hipótese do "caput" deste artigo, o interessado será notificado para fornecer informações relativas à proporção dos ingredientes no produto, bem como aos fatores específicos de concentração e diluição, caso seja necessário.

§ 2º A não apresentação das informações mencionadas no § 1º no prazo de 10 (dez) dias, ou sua inadequação, ensejará conclusão com base nos dados disponíveis.

Art. 6º Os limites máximos tolerados se aplicam à parte comestível dos produtos alimentícios em questão, salvo especificação em contrário.

Art. 7º O descumprimento das disposições contidas nesta Resolução constitui infração sanitária, nos termos da Lei nº. 6.437, de 20 de agosto de 1977, sem prejuízo das responsabilidades civil, administrativa e penal cabíveis.

Art. 8º Ficam revogadas a Resolução CNNPA nº 34, de 1976, publicada no D.O.U. de 19/01/1977, e a Resolução RDC nº 274, de 15 de outubro de 2002.

Art. 9º São concedidos prazos para aplicação dos limites máximos tolerados estabelecidos nos anexos desta Resolução, tendo em vista a necessidade de adequação do setor produtivo, com exceção dos limites estabelecidos no Anexo I.

Art. 10. Os Limites Máximos Tolerados (LMT) estabelecidos para as Micotoxinas e as respectivas categorias de alimentos especificadas no Anexo II entrarão em vigor em 1º de janeiro de 2012.

Art. 11. Os Limites Máximos Tolerados (LMT) estabelecidos para as Micotoxinas e as respectivas categorias de alimentos especificadas no Anexo III entrarão em vigor em 1º de janeiro de 2014.

Art. 12. Os Limites Máximos Tolerados (LMT) estabelecidos para as Micotoxinas e as respectivas categorias de alimentos especificadas no Anexo IV entrarão em vigor em 1º de janeiro de 2016.

Art. 13. Esta Resolução e seu Anexo I entram em vigor na data de sua publicação.

DIRCEU BRÁS APARECIDO BARBANO

ANEXO I

Aplicação Imediata

LIMITES MÁXIMOS TOLERADOS (LMT) PARA MICOTOXINAS

Micotoxinas	Alimento	LMT (µg/kg)
Aflatoxina M1	Leite fluído	0,5
	Leite em pó	5
	Queijos	2,5
	Cereais e produtos de cereais, exceto milho e derivados, incluindo cevada malteada	5
Aflatoxinas B1, B2, G1, G2	Feijão	5
	Castanhas exceto Castanha-do-Brasil, incluindo nozes, pistachios, avelãs e amêndoas	10
	Frutas desidratadas e secas	10
	Castanha-do-Brasil com casca para consumo direto	20

	Castanha-do-Brasil sem casca para consumo direto	10
	Castanha-do-Brasil sem casca para processamento posterior	15
	Alimentos à base de cereais para alimentação infantil (lactentes e crianças de primeira infância)	1
	Fórmulas infantis para lactentes e fórmulas infantis de seguimento para lactentes e crianças de primeira infância	1
	Amêndoas de cacau	10
	Produtos de cacau e chocolate	5
	Especiarias: Capsicum spp. (o fruto seco, inteiro ou triturado, incluindo pimentas, pimenta em pó, pimenta decaiena e pimentão-doce); Piper spp. (o fruto, incluindo a pimenta branca e a pimenta preta) Myristica fragrans(noz-moscada) Zingiber officinale (gingibre) Curcuma longa (curcuma). Misturas de especiarias que contenham uma ou mais das especiarias acima indicadas	20
	Amendoim (com casca), (descascado, cru ou tostado), pasta de amendoim ou manteiga de amendoim	20
	Milho, milho em grão (inteiro, partido, amassado, moído), farinhas ou sêmolos de milho	20
Ocratoxina A	Cereais e produtos de cereais, incluindo cevada malteada	10
	Feijão	10
	Café torrado (moído ou em grão) e café solúvel	10
	Vinho e seus derivados	2
	Suco de uva e polpa de uva	2
	Especiarias: Capsicum spp. (o fruto seco, inteiro ou triturado, incluindo pimentas, pimenta em pó, pimenta decaiena e pimentão-doce) Piper spp. (o fruto, incluindo a pimenta branca e a pimenta preta) Myristica fragrans(noz-moscada) Zingiber officinale (gingibre) Curcuma longa (curcuma) Misturas de especiarias que contenham uma ou mais das especiarias acima indicadas	30
	Alimentos a base de cereais para alimentação infantil (lactentes e crianças de primeira infância)	2
	Produtos de cacau e chocolate	5,0
	Amêndoa de cacau	10
	Frutas secas e desidratadas	10

Desoxinivaleno I (DON)	Arroz beneficiado e derivados	750
	Alimentos a base de cereais para alimentação infantil (lactentes e crianças de primeira infância)	200
Fumonisinias (B1 + B2)	Milho de pipoca	2000
	Alimentos a base de milho para alimentação infantil (lactentes e crianças de primeira infância)	200
Zearalenona	Alimentos a base de cereais para alimentação infantil (lactentes e crianças de primeira infância)	20
Patulina	Suco de maçã e polpa de maçã	50

ANEXO II - Aplicação em janeiro de 2012 LIMITES MÁXIMOS TOLERADOS (LMT) PARA MICOTOXINAS

Micotoxinas	Alimento	LMT ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Desoxinivaleno I (DON)	Trigo integral, trigo para quibe, farinha de trigo integral, farelo de trigo, farelo de arroz, grão de cevada	2000
	Farinha de trigo, massas, crackers, biscoitos de água e sal, e produtos de panificação, cereais e produtos decereais exceto trigo e incluindo cevada malteada	1750
Fumonisinias (B1 + B2)	Farinha de milho, creme de milho, fubá, flocos, canjica, canjiquinha	2500
	Amido de milho e outros produtos à base de milho	2000
Zearalenona	Farinha de trigo, massas, crackers e produtos de panificação, cereais e produtos de cereais exceto trigo e incluindo cevada malteada	200
	Arroz beneficiado e derivados	200
	Arroz integral	800
	Farelo de arroz	1000
	Milho de pipoca, canjiquinha, canjica, produtos e subprodutos à base de milho	300
	Trigo integral, farinha de trigo integral, farelo de trigo	400

ANEXO III- Aplicação em janeiro de 2014 LIMITES MÁXIMOS TOLERADOS (LMT) PARA MICOTOXINAS

Micotoxinas	Alimento	LMT ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
-------------	----------	---------------------------------

Ocratoxina A	Cereais para posterior processamento, incluindo grão de cevada	20
Desoxinivalenol (DON)	Trigo e milho em grãos para posterior processamento	3000
	Trigo integral, trigo para quibe, farinha de trigo integral, farelo de trigo, farelo de arroz, grão de cevada	1500
	Farinha de trigo, massas, crackers, biscoitos de água e sal, e produtos de panificação, cereais e produtos decereais exceto trigo e incluindo cevada malteada.	1250
Fumonisinias (B1 + B2)	Milho em grão para posterior processamento	5000
Zearalenona	Milho em grão e trigo para posterior processamento	400

ANEXO IV - Aplicação em janeiro de 2016 LIMITES MÁXIMOS TOLERADOS (LMT) PARA

Micotoxinas	Alimento	LMT (µg/kg)
Desoxinivalenol (DON)	Trigo integral, trigo para quibe, farinha de trigo integral, farelo de trigo, farelo de arroz, grão de cevada	1000
	Farinha de trigo, massas, crackers, biscoitos de água e sal, e produtos de panificação, cereais e produtos decereais exceto trigo e incluindo cevada malteada.	750
Fumonisinias (B1 + B2)	Farinha de milho, creme de milho, fubá, flocos, canjica, canjiquinha	1500
	Amido de milho e outros produtos a base de milho	1000
Zearalenona	Farinha de trigo, massas, crackers e produtos de panificação, cereais e produtos de cereais exceto trigo e incluindo cevada malteada.	100
	Arroz beneficiado e derivados	100
	Arroz integral	400
	Farelo de arroz	600
	Milho de pipoca, canjiquinha, canjica, produtos e sub-produtos à base de milho	150
	Trigo integral, farinha de trigo integral, farelo de trigo	200

MICOTOXINAS

(*) Republicada por ter saído, no DOU nº 37, de 22-2-2011, Seção 1, pág. 72, com incorreção no original.

13.2 NTEINEN 623

Norma Técnica Ecuatoriana Obligatoria	<p style="text-align: center;">PASTA (MASA, LICOR) DE CACAO</p> <p style="text-align: center;">REQUISITOS</p>	<p style="text-align: center;">INEN 623</p> <p style="text-align: center;">1988-06</p>
<p style="text-align: center;">1. OBJ ETO</p> <p>1.1 Esta norma establece los requisitos que debe cumplir la pasta de cacao para fabricación industrial de productos de cacao y chocolate para consumo humano.</p> <p style="text-align: center;">2. ALCANCE</p> <p>2.1 Esta norma comprende únicamente la pasta de cacao proveniente del grano de cacao.</p> <p style="text-align: center;">3. TERMINOLOGIA</p> <p>3.1 Parta de cacao. Es el producto obtenido por la desintegración mecánica de granos de cacao adecuadamente fermentados y secos que previamente hayan sido sometidos a limpieza, descascarado y tostación, prácticamente exentos de toda clase de impurezas.</p> <p>3.2 Pasta de cacao soluble. Es la pasta de cacao que ha sido sometida a proceso adecuado de solubilización y/o alcalinización.</p> <p style="text-align: center;">4. DISPOSICIONES GENERALES</p> <p>4.1 La pasta de cacao deberá elaborarse bajo condiciones sanitarias apropiadas, con semillas de cacao sanas, limpias, adecuadamente fermentada, descascadas y desgerminadas, exentas, de acuerdo a las tolerancias vigentes, de residuos de plaguicidas u otras sustancias tóxicas.</p> <p>4.2 La pasta de cacao soluble podrá tratarse, durante su manufactura, con agentes alcalinizantes, como hidróxidos, carbonatos o bicarbonatos de sodio, potasio, magnesio o amonio, siempre que en cualquier caso no excedan de un equivalente de 3,5 % expresado como carbonato de potasio anhidro, calculado sobre base seca y desengrasada, y con agentes neutralizantes como ácido fosfórico, en la dosis máxima de 0,25 % expresado como anhidro fosfórico, ácido cítrico y ácido tartárico en la dosis máxima de 0,50 %, solos o combinados calculados sobre la masa total del producto.</p> <p>4.3 La pasta de cacao debe estar exenta de toda clase de materias vegetales de otra procedencia (féculas, harinas, dextrinas) grasas animales o vegetales y semillas extrañas. Además, no se deberá agregar cascarilla de cacao, sustancias inertes, colorantes, conservantes u otros productos extraños a su composición natural.</p> <p>4.4 La pasta de cacao no debe contener su composición ninguna sustancia mineral, excepto los residuos de la solubilización, si ésta tiene lugar.</p> <p style="text-align: right;"><i>(Continúa)</i></p>		

4.5 Deberá estar libre de fragmentos de insectos, pelos de roedor, partículas orgánicas y otros productos extraños a su composición, de acuerdo a las tolerancias vigentes,

4.6 Para fines de exportación, a la pasta de cacao se permitirá también denominarle masa de cacao, licor de cacao, chocolate no edulcorado o chocolate amargo.

5. REQUISITOS DEL PRODUCTO

5.1 La pasta de cacao sometida a ensayos, de acuerdo a las normas ecuatorianas correspondientes, deberá cumplir con los requisitos establecidos en las Tablas 1 y 2.

TABLA 1. Requisitos para pasta de cacao

REQUISITOS	Unidad	Mínimo	Máximo	Método de Ensayo
Grasa	%	48	54	INEN 535
Humedad	%	—	3	INEN 1 676
Almidón natural de cacao	%	8,5	9,0	INEN 636
Fibra cruda	%	—	4,7	INEN 534
Cenizas totales	%	—	7,5 alcalinizada 5 normal	INEN 533

TABLA 2. Requisitos microbiológicos

REQUISITOS	UNIDAD	MÁXIMO	MÉTODO DE ENSAYO
Mohos y levaduras	u.f.c*/g	100	INEN 1 529
Coniformes	u.f.c*/g	10	INEN 1 529
E. Coli	u.f.c*/g	1	INEN 1 529
Salmonella	u.f.c*en 25 g	0	INEN 1 529
u.f.c. = unidades formadoras de colonias			

6. ETIQUETADO Y ENVASADO

6.1 Envasado.

6.1.1 El material del envase debe ser resistente a la acción del producto de manera que no altere su composición y su calidad organoléptica.

6.2 Rotulado.

6.2.1 Los envases deberán llevar un rótulo visible, impreso o adherido con caracteres legibles, redactados en castellano; únicamente con propósito de exportación se permitirá la redacción en otro idioma y llevará la información mínima siguiente, (ver Norma INEN 1 334);

- a) nombre del producto,
- b) nombre y marca del fabricante,
- c) identificación del lote,
- d) contenido neto en unidades del Sistema Internacional, SI,
- e) país de origen,
- f) norma técnica INEN de referencia.

6.2.2 La comercialización de este producto cumplirá con lo dispuesto en las Regulaciones y Resoluciones dictadas, con sujeción a la Ley de Pesas y Medidas.

7. INSPECCIÓN

7.1 El muestreo debe realizarse de acuerdo a la Norma INEN 537.

7.2 En la muestra extraída se efectuarán los ensayos indicados en el numeral 5.1 y 5.2 de esta norma.

7.3 Si la muestra ensayada no cumple con uno o más de los requisitos establecidos en el numeral 5.1 y 5.2 de esta norma se extraerá una nueva muestra y se repetirán los ensayos.

7.4 Sí alguno de los ensayos repetidos no cumpliera con los requisitos establecidos se rechazará el lote correspondiente.

APÉNDICE Z

Z.1 NORMAS A CONSULTAR

- INEN 533 *Cacao (Productos derivados). Determinación de la ceniza total.*
- INEN 534 *Cacao (Productos derivados). Determinación del contenido de fibra cruda.*
- INEN 535 *Cacao (Productos derivados). Determinación del contenido de grasa.*
- INEN 537 *Cacao (Productos derivados). Maestreo.*
- INEN 636 *Cacao (Productos derivados). Determinación de almidón (Método enzimático).*
- INEN 1 676 *Productos derivados de cacao. Determinación de la humedad o pérdida por calentamiento.*

Z.2 BASES DE ESTUDIO

Codex Alimentarius, *Normas del Codex Alimentarius para productos del Cacao y Chocolate*, Volumen VII, FAO-OMS. Roma 1982.

Codex Alimentarius, *Normas del Codex Alimentarius para productos del Cacao y Chocolate*, Suplemento 1 al Codex Alimentarius, Volumen VII, FAO-OMS. Roma 1983.

Norma ICONTEC 486 (Primera Revisión). *Industrias Alimentarias Masa o Pasta o Licor de Cacao*. Instituto Colombiano de Normas Técnicas, Bogotá, 1982.

Manual del Ingeniero en la Industria Alimentaria, Editorial Técnica, Bucarest.

Características termofísicas de los productos alimenticios, Iliescu Gheorghe, Editorial Técnica, Bucarest 1982.

Chocolate Production and Use. By L. Russell Cook Revised by Dr. E. H. Meursing, Harcourt Brace Javonovich. Inc., New York, 1982.

**Instituto Ecuatoriano de Normalización, INEN - Baquerizo Moreno E8-29 y Av. 6 de Diciembre
Casilla 17-01-3999 - Telfs: (593 2)2 501885 al 2 501891 - Fax: (593 2) 2 567815
Dirección General: E-Mail: direccion@inen.gov.ec
Área Técnica de Normalización: E-Mail: normalizacion@inen.gov.ec
Área Técnica de Certificación: E-Mail: certificacion@inen.gov.ec
Área Técnica de Verificación: E-Mail: verificacion@inen.gov.ec
Área Técnica de Servicios Tecnológicos: E-Mail: inencati@inen.gov.ec
Regional Guayas: E-Mail: inenguayas@inen.gov.ec
Regional Azuay: E-Mail: inencuenca@inen.gov.ec
Regional Chimborazo: E-Mail: inenriobamba@inen.gov.ec
URL: www.inen.gov.ec**

13.3 Resultados de Kit Veratox de ocratoxina del Laboratorio de Microbiología, Facultad de Ciencia y Tecnología de la Universidad del Azuay.

11)Ochratoxin
 Updated: 08-01-2012
 11-22-2012 14:53:03
 Strip Format: C Well (A-H)
 Regression Mode
 Wavelengths: 650nm, None
 Axes: Y=Logit(Abs) X=Log(Conc)
 Standard#1 = 0.0
 Standard#2 = 2.0
 Standard#3 = 5.0
 Standard#4 = 10.0
 Standard#5 = 25.0
 End of Test

r=-0.9808 y=1.7914
 m=-1.4166
 Strip: 2
 Carrier Position: 2
 A 4 0.325 43.1
 B 5 0.426 20.3
 C 6 0.493 12.5
 D 7 0.579 6.6
 E 8 0.441 18.2
 F 9 0.536 11.1
 G 10 0.403 21.0
 H 11 0.580 6.5

11)Ochratoxin
 Updated: 08-01-2012
 11-22-2012 14:54:49
 Strip Format: S Well (A-H)
 Regression Mode
 Wavelengths: 650nm, None
 Axes: Y=Logit(Abs) X=Log(Conc)
 Standard#1 = 0.0
 Standard#2 = 2.0
 Standard#3 = 5.0
 Standard#4 = 10.0
 Standard#5 = 25.0
 End of Test

Strip: 3
 Carrier Position: 3
 A 12 0.617 4.8
 B 13 0.520 10.3
 C 14 0.589 6.1
 D 15 0.325 43.1
 E 16 0.536 11.1
 F 17 0.512 10.9
 G 18 0.501 11.8
 H 19 0.539 8.9

11)Ochratoxin
 Updated: 08-01-2012
 11-22-2012 15:15:51
 Strip Format: S Well (A-H)
 Regression Mode
 Wavelengths: 650nm, None
 Axes: Y=Logit(Abs) X=Log(Conc)
 Standard#1 = 0.0
 Standard#2 = 2.0
 Standard#3 = 5.0
 Standard#4 = 10.0
 Standard#5 = 25.0
 W ID Abs

End of Run
 Strip: 4
 Carrier Position: 4
 A 20 0.542 8.7
 B 21 0.581 6.5
 C 22 0.509 11.1
 D 23 0.598 5.6
 E 24 0.432 19.4
 F 25 0.548 8.3
 G 26 0.430 19.7
 H 27 0.613 5.0

Strip: 1
 Carrier Position: 1
 Running New Curve
 A \$1 0.902 0.0
 B \$2 0.716 2.0
 C \$3 0.624 5.0
 D \$4 0.481 10.0
 E \$5 0.420 25.0
 F 1 0.356 34.0
 G 2 0.375 29.5
 H 3 0.378 28.8

Strip: 5
 Carrier Position: 2
 A 28 0.640 4.0
 B 29 0.638 4.0
 C 30 0.622 4.6
 D 31 0.700 2.2
 E 32 0.650 3.6
 F 33 0.634 4.2
 G 34 0.680 2.7
 H 35 0.481 13.7

Strip: 6
 Carrier Position: 3
 A 36 0.515 10.7
 B 37 0.632 4.3
 C 38 0.712 2.0
 D 39 0.631 4.3
 E 40 0.500 11.9
 F 41 0.548 8.3
 G 42 0.468 15.0
 H 43 1.031 0.0

Run new standard cur
 End of Run
 End of Test

13.4 Resultados de validación de ocratoxina de Laboratorios Veratox, Illinois, Estados Unidos



Technical Service – Residues 1/29/2013

Alfredo Bonilla J Chocolate paste validation for Ochratoxin Kits

Objective:

Several chocolate paste samples were sent in for OTA validation.

Discussion:

The Veratox OTA, test kits used to validate chocolate paste.

10 grams of the sample are analyzed under the protocol enclosed in the kit. The pH of the filter sample does not need to be adjusted.

It is possible to analyze 2 samples in triplicate in the kits Q+ and Veratox grain.

Results:

Veratox Ochratoxin lot: 181303

sample ID	EXT#	Raw Data (ppb)
CHOCOLATE PASTE	1	11.4
	2	16.7
	3	11.7
	4	9.1
	5	19.4
	6	29.3
	7	17.5
	8	17.5
	9	19.1
	10	21.7

EXT#	Raw Data (ppb)
11	14.5
12	10.7
13	13.4
14	29.4
15	32.5
16	34.8
17	21.4
18	33.9
19	22.6
20	25.4

EXT#	Raw Data (ppb)
21	32.4
22	16.4
23	11.4
24	21.8
25	23.5
26	9.7
27	23.5
28	38.4
29	26.8
30	12

EXT#	Raw Data (ppb)
31	26.5
32	28.5
33	22.1
34	14.3
35	17.4
36	24.8
37	21.3
38	22.4
39	31.3
40	19.3
41	20.5
42	23.6
43	34.6
44	25.1

Conclusion:

All the Chocolate paste samples showed high levels for Veratox OTA, Veratox Grain and Q+OTA, the extraction of the sample is difficult, less than 50% because of the color concentration.

We do not recommend the used of the protocol of the Kid for this samples, please ask for technical assistance if you need to analyze it.

Technical Service – Residues

NEOGEN Corporation

620 Leshar Place . Lansing.MI 48912 USA

www.neogen.com