



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTILÁN**

**“EFECTO DE LA ALCALINIZACIÓN EN EL CONTENIDO
DE AFLATOXINAS Y EN LAS PROPIEDADES
FISICOQUÍMICAS DE LICOR DE CACAO”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
INGENIERA EN ALIMENTOS**

PRESENTA:

ARLETTE ZORAIDA CAMPOS AGUILAR

ASESOR: Dr. ABRAHAM MÉNDEZ ALBORES

COASESOR: M. en C. ENRIQUE MARTÍNEZ MANRIQUE



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
 UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
 DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.

FACULTAD DE ESTUDIOS

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO
 DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN
 PRESENTE



ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ
 Jefa del Departamento de Exámenes
 Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el Art. 28 del Reglamento de Exámenes Profesionales nos permitimos comunicar a usted que revisamos la: TESIS
Efecto de la alcalinización en el contenido de aflatoxinas y en las propiedades fisicoquímicas de licor de cacao

Que presenta la pasante: Arlette Zoraida Campos Aguilar
 Con número de cuenta: 30220162-8 para obtener el Título de: Ingeniera en Alimentos

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
 “POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU”
 Cuautitlán Izcalli, Méx. a 17 de Mayo de 2012.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M. en I. Fernando Beristain	
VOCAL	QFB. Luis Alberto Parra Oaxaca	
SECRETARIO	Dr. Abraham Méndez Albores	
1er SUPLENTE	Dra. Ma. Del Carmen Valderrama Bravo	
2do SUPLENTE	M. en C. Julieta González Sánchez	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 120).
 HHA/pm

PRÓLOGO

El presente trabajo de investigación, se desarrolló en la Unidad de Investigación en Granos y Semillas (UNIGRAS), Laboratorio 14 de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria. Con parte de la información obtenida se publicó un artículo científico en la revista Journal of Agricultural Science and Technology.

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS



El empeño, la dedicación, el ingenio, la paciencia, el tiempo dedicado a mi formación, ahora todo ello lo veo reflejado con la culminación de este proyecto, es por ello que quiero agradecer a todas aquellas personas que hicieron posible el que yo llegara a este momento:

Comenzando por dos personitas; hermanos Erick y Alex, quiero dedicarles mi tesis ya que ustedes dos son mi inspiración, les agradezco su amor, apoyo, las alegrías que compartimos todos los días, la unión tan padre que tenemos como hermanos, espero sea un buen ejemplo para ustedes, ya que los Amo muchísimo.

Papá; gracias por tolerarme, por ser comprensivo en todo momento, por todos los consejos que me has otorgado, por siempre estar a mi lado cuando necesito fortaleza y por el apoyo que me brindas día con día. Papi Te Amo mucho.

Mami; tengo que agradecerte por tu infinita paciencia, por todo el cariño que siempre me brindas y por qué en todo momento has sabido apoyarme. Te Amo inmensamente.

Abues; siempre preocupados por mi bienestar, les agradezco todo su amor, y sepan que siempre tengo presente lo mucho que me han ayudado con sus sabias palabras y amenas conversaciones.

A mis tíos, tías, primos y primas; a lo largo de mi vida siempre han estado presentes en vida y eh contado con su apoyo incondicional se los agradezco enormemente.

A mis amigos de la Secu, del CCH, de la FES-C, en fin a todos mis amigos; gracias por dejarme compartir momentos tan padres a su lado, por aconsejarme y por aportarme esa ayuda extra cuando la he necesitado.

A mi asesor y amigo Dr. Abraham; quien de manera incondicional me brindo su asesoría, paciencia, dedicación y sugerencias tan atinadas e hizo posible que con toda esa ayuda pudiera realizar este proyecto. Le estoy muy agradecida.

A mi coasesor el Maestro Enrique; le agradezco por permitirme realizar parte de la experimentación del proyecto en su laboratorio.

Diosito; muchas gracias por estar conmigo en todo momento, por la naturaleza con la que has conducido mi vida, por que se que cada reto que me pones me hace más fuerte y más sabia, sé que si no fuera por todo lo que he pasado no estaría en este momento tan satisfactorio de mi vida.

Con este trabajo de tesis concluyó mis estudios de Licenciatura en Ingeniería en Alimentos, dentro de la mayor casa de estudios la "UNAM", sin embargo, teniendo en mente que nunca voy a olvidar de donde provengo, ya que con ayuda de mi familia, amigos y todo lo que integra a la UNAM logre formar mi carácter, mi forma de pensar y a la persona que hoy soy; por lo que estaré eternamente agradecida, siempre siendo una profesionista razonable, honesta, integra, una profesionista de sangre azul y piel dorada. **UNAM; siempre te querré!!**

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	IV
ÍNDICE DE TABLAS.....	V
ABREVIATURAS.....	VI
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2

CAPITULO I

1. ANTECEDENTES.....	4
1.1 Cacao.....	4
1.1.1 Estructura, descripción botánica y clasificación taxonómica.....	5
1.1.2 Composición química.....	7
1.1.3 Producción y consumo de cacao en México.....	8
1.1.4 Proceso de elaboración de licor de cacao.....	9
1.1.4.1 Limpieza.....	10
1.1.4.2 Fermentación.....	10
1.1.4.3 Secado.....	12
1.1.4.4 Tostado.....	12
1.1.4.5 Descascarillado.....	13
1.1.4.6 Molienda.....	14
1.1.4.7 Alcalinización (Dutching).....	15
1.1.5 Contaminación del cacao por microorganismos.....	16
1.2 Micotoxinas.....	17
1.2.1 Generalidades.....	17
1.2.2 Aflatoxinas.....	18
1.2.3 Efecto de las aflatoxinas.....	21
1.2.3.1 Efectos biológicos.....	21
1.2.3.1.1 Toxicidad.....	21
1.2.3.1.2 Citotoxicidad.....	22
1.2.3.1.3 Efectos inmunopresores.....	22
1.2.3.1.4 Mutagenicidad.....	22
1.2.3.1.5 Carcinogenicidad.....	23
1.2.3.1.6 Teratogenicidad.....	23
1.2.3.2 Contaminación de los alimentos con aflatoxinas.....	23
1.2.3.3 Control de aflatoxinas (legislación) en cacao.....	24
1.2.4 Descontaminación/Detoxificación.....	25

ÍNDICE

1.2.5 Estrategias para destoxificar cacao.....	26
1.2.5.1 Métodos físicos.....	26
1.2.5.2 Métodos químicos.....	28
1.2.5.3 Métodos biológicos.....	29

CAPITULO II

2. Propuesta de investigación.....	30
2.1 Hipótesis.....	30
2.2 Objetivo general.....	30
2.3 Objetivo particular.....	30
2.4 Cuadro metodológico.....	31

CAPITULO III

3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
3.1 Materiales.....	32
3.1.1 Productos químicos.....	32
3.1.2 Granos de cacao.....	32
3.2 Métodos.....	32
3.2.1 Medidas de seguridad.....	32
3.2.2 Caracterización de propiedades físicas del grano de cacao.....	33
3.2.2.1 Tamaño del grano.....	33
3.2.2.2 Peso de 1000 granos.....	33
3.2.2.3 Peso hectolitrico.....	33
3.2.3 Limpieza del grano de cacao.....	34
3.2.4 Elaboración de inóculo.....	34
3.2.5 Técnica de inoculación de cacao.....	34
3.2.6 Cuantificación de aflatoxinas.....	35
3.2.7 Validación del método.....	36
3.2.8 Procedimiento de acidificación de los extractos de licor de cacao.....	37
3.2.9 Elaboración de licor de cacao.....	37
3.2.9.1 Proceso de tostado.....	37
3.2.9.2 Proceso de descascarillado y molienda.....	37
3.2.9.3 Proceso de alcalinización.....	38

ÍNDICE

3.2.10 Propiedades fisicoquímicas y físicas del licor de cacao alcalinizado.....	39
3.2.10.1 pH.....	39
3.2.10.2 Color.....	40
3.2.11 Propiedades químicas del licor de cacao alcalinizado.....	40
3.2.11.1 Humedad.....	40
3.2.11.2 Proteína.....	41
3.2.11.3 Grasa.....	42
3.2.12 Análisis estadístico y diseño experimental.....	42

CAPITULO IV

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	43
4.1 Caracterización física del grano de cacao.....	43
4.2 Aflatoxinas en el grano de cacao.....	44
4.3 Aflatoxinas en licor de cacao con y sin tratamiento térmico.....	46
4.4 Aflatoxinas en licor de cacao alcalinizado.....	47
4.4.1 Concentración de 1% (p/v) de agente alcalinizante.....	47
4.4.2 Concentración de 2% (p/v) de agente alcalinizante.....	48
4.4.3 Concentración de 3% (p/v) de agente alcalinizante.....	49
4.5 Propiedades fisicoquímicas de los licores de cacao.....	51
4.5.1 pH.....	51
4.5.2 Color.....	53
4.6 Análisis composicional de los licores de cacao alcalinizados.....	57
4.6.1 Humedad.....	57
4.6.2 Proteína.....	58
4.6.3 Grasa.....	59
CONCLUSIONES.....	62
RECOMENDACIONES.....	63
REFERENCIAS.....	64

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Árbol y mazorcas de cacao.....	6
Figura 1.2 Mazorca de cacao en la que se muestran las habas en su interior.....	6
Figura 1.3 Demanda mundial.....	8
Figura 1.4 Diagrama de bloques del proceso de elaboración de licor de cacao.....	9
Figura 1.5 Estructura de algunas micotoxinas.....	19
Figura 1.6 Mecanismo químico de alcalinización de aflatoxina B1.....	25
Figura 3.1 Grano de cacao de la región del Soconusco.....	32
Figura 3.2 Dimensiones (L=largo, A=ancho, E=espesor) en grano de cacao.....	33
Figura 3.3 Cepa del hongo <i>Aspergillus Flavus</i>	34
Figura 3.4 Extracción de aflatoxinas por el método de columna de inmunofinidad.....	36
Figura 3.5 Grano de cacao tostado.....	37
Figura 3.6 Representación de: a) grano de cacao descascarillado, b) cascarilla, c) molino de discos y d) licor de cacao.....	38
Figura 3.7 Licor de cacao alcalinizado y secado.....	39
Figura 3.8 Determinación de pH en licor de cacao.....	39
Figura 3.9 Colorímetro marca Minolta.....	40
Figura 4.1 Contenido de aflatoxinas en el licor de cacao natural, el inoculado y el tratado térmicamente a 85°C durante 1 hora sin agente alcalino.....	46
Figura 4.2 Efecto del tipo de álcali sobre el contenido de aflatoxinas en licor de cacao tratado a una concentración de 1%(p/v).....	48
Figura 4.3 Efecto del tipo de álcali sobre el contenido de aflatoxinas en licor de cacao tratado a una concentración de 2% (p/v).....	49
Figura 4.4 Efecto del tipo de álcali sobre el contenido de aflatoxinas en licor de cacao tratado a una concentración de 3% (p/v).....	50
Figura 4.5 Esquematación de las coordenadas de color (L, a, b), saturación (croma) y tonalidad (Hue).....	53

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1 Composición química de grano de cacao.....	8
Tabla 1.2 Aditivos permitidos por NOM-186-SSA1/SCFI-2002.....	16
Tabla 4.1 Propiedades físicas del grano de cacao del Soconusco.....	43
Tabla 4.2 Concentración de aflatoxinas totales en los granos de cacao inoculados y tostados.....	44
Tabla 4.3 Valores de pH en licores de cacao no tratados y alcalinizados.....	52
Tabla 4.4 Datos de color en licores de cacao no tratados y alcalinizados.....	54
Tabla 4.5 Contenido de humedad en licores de cacao no tratados y alcalinizados.....	58
Tabla 4.6 Contenido de proteína en licores de cacao no tratados y alcalinizados.....	59
Tabla 4.7 Contenido de grasa en licores de cacao no tratados y alcalinizados.....	61

ÍNDICE

ABREVIATURAS

AACC	American Association of Cereal Chemists
AF	Aflatoxina
AFB1	Aflatoxina B1
AFB2	Aflatoxina B2
AFG1	Aflatoxina G1
AFG2	Aflatoxina G2
<i>A. flavus</i>	<i>Aspergillus flavus</i>
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
ANDEVA	Análisis de varianza
Ca(OH) ₂	Hidróxido de calcio
cm	Centímetro(s)
FDA	Food and Drug Administration
°C	Grado centígrado(s)
g	Gramo(s)
hL	Hectolitro
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
Hr	hora(s)
IARC	International Agency for Research on Cancer
ISTA	International Seed Testing Association
K ₂ CO ₃	Carbonato de potasio
kg	Kilogramos
kGy	KiloGray
KOH	Hidróxido de potasio
L	Litro(s)
M	Molar
m	Metro(s)
mg	Miligramo(s)
mm	Milímetro(s)
ml	Mililitro
MSA	Malta-Sal-Agar
NaOH	Hidróxido de sodio
ng	Nanogramo(s)
pH	Potencial hidrógeno
ppm	Partes por millón

ÍNDICE

p/v	Peso/volumen
rpm	Revoluciones por minuto
SAGARPA	Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
SAS	Sistema de Análisis Estadístico
<i>T. cacao</i>	<i>Theobroma cacao</i>
UNIGRAS	Unidad de Investigación en Granos y Semillas
v/v	Volumen/volumen
Zn(OAc) ₂ /AlCl ₃	acetato de zinc/cloruro de aluminio
ΔE	Diferencia de color
ΔL	Diferencia de L
Δa	Diferencia de a
Δb	Diferencia de b



RESUMEN

En este proyecto, se evaluó el efecto de los procesos de tostado y alcalinizado (Dutching) sobre la estabilidad de las aflatoxinas tipo B (AFB1 + AFB2), para ello se emplearon unidades experimentales de granos de cacao contaminado con aflatoxinas a una concentración de 220.7 ng/g, las cuales fueron sometidas al proceso de tostado con condiciones de 250°C durante 15 minutos. El proceso físico de tostado causó una notable reducción en el contenido de aflatoxinas en el grano de cacao (superior al 71%). Por otra parte, el licor de cacao resultante de la molienda del grano de cacao tostado presentó una concentración de aflatoxinas de 63.9 ng/g y se llevó posteriormente a un tratamiento térmico-alcalino con tres diferentes tipos de agentes alcalinizantes [hidróxido de sodio (NaOH), hidróxido de potasio (KOH) e hidróxido de calcio (Ca(OH)₂)], a tres diferentes concentraciones (1, 2 y 3% p/v). El efecto de las dos variables (tipo de álcali y concentración) fueron analizadas con un diseño factorial 3×3 completamente al azar. A la concentración de 1% (p/v), la reducción en el contenido de aflatoxinas fue más efectiva cuando se utilizó NaOH y Ca(OH)₂ (superior a 94%), que cuando se utilizó KOH (superior a 88%). Sin embargo, a concentraciones de 2% y 3% (p/v), los tres agentes alcalinizantes fueron estadísticamente similares en cuanto a su efectividad sobre la degradación de las aflatoxinas (superior a 98%). La acidificación de los extractos (tal y como ocurre durante la digestión) previo a la cuantificación, no causó reformación de la estructura de la aflatoxina en los licores de cacao alcalinizados. De acuerdo con estos resultados, la reducción más alta en el contenido de aflatoxinas en el grano de cacao, fue durante el proceso físico de tostado, y una extra-reducción fue observada durante el proceso químico de alcalinización (Dutching). Así, los licores de cacao tratados con los tres tipos de agentes alcalinizantes, no sólo mejoraron sus propiedades fisicoquímicas, sino también su calidad sanitaria mediante la reducción en el contenido de aflatoxinas.



INTRODUCCIÓN

La alimentación humana y animal, en gran parte, se basa en el consumo de granos y sus derivados, los que frecuentemente son invadidos por hongos, causando diferentes problemas, entre ellos la contaminación con sustancias tóxicas como las micotoxinas.

México, ha sido la fuente de numerosos alimentos que ahora disfrutan los seres humanos en todo el mundo, tales como: el maíz, el frijol, el tomate verde, el aguacate, la piña, la guayaba, la canela, el chile y el cacao, entre otros.

A pesar de la reputación internacional, el proceso de transformación del cacao en México, es bastante antiguo. La semilla del cacao se obtiene de un fruto carnoso en forma de baya (también conocido como mazorca de cacao). Los granos de cacao son removidos manualmente, fermentados, secados al sol y transportados a las instalaciones de procesamiento, donde son tostados y descascarillados. Los granos de cacao tostados son molidos para formar una pasta llamada licor de cacao. En México, los mejores granos provienen de los bosques fértiles de los estados del sureste tales como: Tabasco, Chiapas, Guerrero y Oaxaca, en donde las condiciones climáticas son favorables para su desarrollo.

Con la proliferación mundial de acuerdos de libre comercio, la palabra clave en el nuevo mundo de la competencia es "calidad", cualquier alteración de la calidad (nutricional, industrial o sanitaria), automáticamente disminuye el valor comercial, reflejando sistemas deficientes de post-cosecha. Por lo tanto, la calidad del cacao mexicano puede apreciarse mejor, cuando la tecnología es aplicada al proceso, con el fin de mejorar su funcionalidad. La alcalinización es una de esas tecnologías y es un proceso con una antigüedad de 183 años, también conocido como "Dutching". Este proceso oscurece el cacao, cambia el sabor al reducir la amargura, e incrementa la capacidad de dispersión del polvo de cacao empleado para diversas aplicaciones, entre otros. Desafortunadamente, ni las condiciones de almacenamiento ni de procesamiento del cacao son estrictamente controladas;



por lo tanto, la contaminación por hongos es inevitable. Los granos de cacao son bastante susceptibles al ataque por hongos durante y después de la fermentación; así, especies de hongos pertenecientes a los géneros *Aspergillus*, *Mucor*, *Penicillium* y *Rhizopus* han sido encontrados en granos de cacao impropriadamente manejados y/o secados. Recientemente, especies de *Aspergillus* han sido los hongos más frecuentemente aislados en muestras a base de cacao. Algunos de estos hongos, suelen producir micotoxinas, las cuales pueden causar intoxicación aguda o crónica y daño a los seres humanos que las consumen. Entre las micotoxinas más comunes, las aflatoxinas (AF) son de especial interés, dada su alta incidencia y toxicidad. Las aflatoxinas, son un grupo de metabolitos tóxicos producidos por cepas toxígenas de *Aspergillus flavus* Link, *Aspergillus parasiticus* Speare y *Aspergillus nomius* Kurtzman et al. Cuatro tipos de aflatoxinas son producidas por estos hongos: aflatoxina B1, B2, G1, y G2. La AFB1 es considerada un hepatocarcinógeno potente entre los agentes de origen natural.

Evidencia de la literatura señala que el proceso de tostado reduce el contenido de aflatoxinas hasta en un 75%. Sin embargo, no hay información disponible en relación con la degradación de las aflatoxinas durante el proceso de alcalinización. Por lo tanto, se considera importante obtener información sobre el efecto que el proceso de alcalinización tiene sobre la inactivación de las aflatoxinas, al utilizar licor de cacao contaminado con un nivel relativamente alto de aflatoxinas totales.



1. ANTECEDENTES

1.1. Cacao

Generalmente, el término "cacao" se refiere al árbol y sus frutos (vainas y semillas). El término también describe la mayor parte del cacao comercial, granos secos fermentados, así como el polvo producido a partir de los granos (Minifie, 1989).

El árbol del cacao (*Theobroma cacao*) es originario de la densa selva tropical de la Amazonia, donde crece en condiciones de semisombra, calor y humedad alta. El género *Theobroma* se compone de más de veinte especies (familia Sterculiaceae), pero sólo *T. cacao* es de gran valor comercial. *T. cacao* se supone que se extendió hacia el oeste y hacia el norte, naturalmente, a Guyana y México, y luego a las islas del Caribe. De este modo, fueron desarrolladas dos subespecies distintas. Morris (1882) clasificó a éstos como el Criollo y el Forastero, y más tarde el Forastero se dividió en diversas variedades. Un tercer grupo llamado el Trinitario es esencialmente una mezcla de el Criollo y el Forastero (Minifie, 1989). El criollo tiene granos con cotiledones blancos y un sabor intermedio. Sin embargo, los árboles dan un rendimiento relativamente bajo. La mayoría del cacao es Forastero, que es el de mayor resistencia y a menudo se cultiva en África occidental. (Beckett, 2002).

Los Mayas de Yucatán y los Aztecas del Valle de México (Tenochtitlán), cultivaron el cacao mucho antes de su introducción en Europa. Se dice que Moctezuma, emperador de los aztecas, consumía una preparación llamada "chocolatl" hecha por el tostado y molienda de las semillas de cacao, que posteriormente eran trituradas y mezcladas con agua, maíz y especias. La riqueza de la mezcla, sin duda hablaba de alguna conexión con la creencia Azteca de que el árbol de cacao era de origen divino, a quien más tarde el botánico sueco Linneo dio el nombre de "Theobroma", que significa: "alimento de los dioses" (Minifie, 1989).

Cristóbal Colón fue el primero en llevar los granos de cacao a Europa, pero sólo como curiosidades. Su compatriota Don Hernán Cortés fue el primero en



reconocer su valor comercial como una nueva bebida, y envió los granos de cacao a España con las recetas para preparar el chocolate. Los españoles agregaron azúcar a la receta, y la bebida ganó gran popularidad. A continuación, se introdujo el cacao en Trinidad, tratando de mantener los métodos de su cultivo y preparación en secreto. Eventualmente, los árboles se cultivaron en otras islas de las Antillas y en Filipinas, donde los holandeses probablemente introdujeron el cacao en Indonesia y Ceilán, Sudamérica y las Antillas manteniéndose así los principales proveedores de granos de cacao hasta alrededor del año 1900, cuando el árbol del cacao fue introducido en África Occidental, donde las condiciones de cultivo fueron tan favorables que la producción de pronto llegó a un nivel muy alto (Minifie, 1989).

Después de ser introducido en Europa por los españoles, la popularidad de la bebida de chocolate se extendió a Italia, Holanda y Francia en el año 1600. Poco tiempo después, se dió a conocer a la aristocracia de Inglaterra, que se menciona en el diario de Pepys en 1664. En ese momento, el chocolate era muy costoso y estaba fuera del alcance de todos. En la década de 1700 se produjo una mejora y el chocolate o, mejor dicho, los productos de cacao, empezaron a hacerse a nivel industrial. La fábrica de Fry en Bristol, Inglaterra, comenzó su producción en 1728; sin embargo, las barras de chocolate y otros dulces cubiertos de chocolate no aparecieron hasta más tarde en el siglo XIX (Minifie, 1989).

1.1.1. Estructura y descripción botánica

El cacao es un árbol relativamente alto, de entre 5 a 7m de altura media, a veces más cuando crece en estado salvaje en la selva. Su talla así como la importancia y el desarrollo de su follaje dependen mucho del medio ambiente (Bradeau, 1970). En la Figura 1.1 se muestra una imagen del árbol de cacao y sus mazorcas.

Las flores son de aproximadamente media pulgada de diámetro y se forman en pequeños grupos entre los troncos y las ramas más bajas de los árboles. Los árboles de cacao son bisexuales, no tienen perfume de néctar, y el polen es demasiado pegajoso para ser dispersado por el viento. Sólo en los últimos años



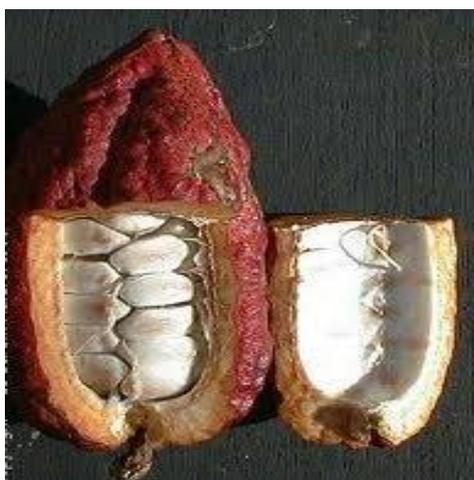
que se descubrió el principal agente de la polinización es un pequeño mosquito de la familia Ceratopogonidae. Muchas flores se producen, pero sólo un pequeño número se poliniza y se desarrolla en vainas. Estas vainas maduran en cinco o seis meses durante los cuales muchas se marchitan y se caen, y esto constituye un proceso de adelgazamiento (Minifie, 1989).



Fuente: <http://www.leader-trade.com> 2012

Figura 1.1. Árbol de cacao y mazorcas

En la Figura 1.2 se puede observar la vaina que es, botánicamente, una "drupa", y alcanza una longitud de 6 a 10 pulgadas con 3 a 4 pulgadas de diámetro. Normalmente contiene de veinte a cuarenta semillas rodeadas de una pulpa mucilaginosa cuando la vaina está madura (Minifie, 1989).



Fuente: <http://www.baobabs.com> 2012

Figura 1.2. Mazorca de cacao en la que se muestran los granos en su interior



La semilla del cacao se llama vulgarmente “haba” o “grano” de cacao. El grano de cacao es una semilla sin albumen que tiene la forma de un haba más gruesa, mide de 2 a 3 cm de longitud y se encuentra recubierta por una pulpa mucilaginosa de color blanco, de sabor azucarado y acidulado (Bradeau, 1970).

Un árbol empieza a tener vainas después de los tres años, y su rendimiento se incrementa hasta el octavo o noveno año; sin embargo, considerando el tamaño de éstos árboles, la cantidad de granos producidos por año es muy pequeña. Las vainas se cosechan por varios meses en los árboles, al mismo tiempo se dan los frutos maduros, las flores y las vainas en crecimiento. Los frutos maduros se cortan de las ramas comúnmente con un machete y son llevadas a un punto adecuado para abrir su centro y remover los granos junto con la pulpa adherida; luego éstos granos con pulpa son llevados a fermentar (Minifie, 1989).

1.1.2. Composición química

Los granos de cacao se componen esencialmente de los cotiledones, que están protegidos por la cáscara. A los fragmentos quebrados de los cotiledones se les llama “nibs”. La cáscara es generalmente considerada como un material de desecho y se utiliza como combustible, abono o se vende como fibra de cacao. Sin embargo, éstos materiales pueden ser utilizados como sustitutos de cacao en polvo o incorporados en el chocolate para mejorar el contenido de fibra (según las regulaciones locales) (Beckett, 1988).

Los nibs son la parte de mayor valor del grano. El nib tostado y molido (pasta de cacao o licor de cacao) se utiliza directamente en la fabricación de chocolate. Alternativamente, se puede pasar a un prensado para extraer manteca de cacao, un ingrediente esencial en el chocolate. El residuo se convierte en polvo de cacao, el cual se utiliza principalmente en bebidas, panadería y postres (Beckett, 1988). La Tabla 1.1 muestra la composición química del cacao.



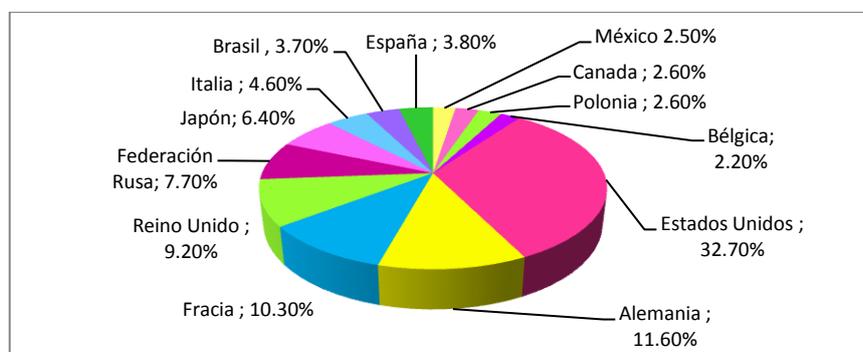
TABLA 1.1. Composición química de grano de cacao

	Nib (%)	Cáscara (%)
Agua	2-5	4-11
Grasa	48-57	2-6
Proteína	11-16	13-20
Almidón	6-9	6.5-9
Fibra cruda	2.1-3.2	13-19
Cenizas	1.6-4.2	6.5-20.7
Teobromina	0.8-1.4	0.2-1.3
Cafeína	0.1-0.7	0.04-0.3

Fuente: Beckett, 1988.

1.1.3. Producción y consumo de cacao en México

El cacao lo cultivan alrededor de 37,000 productores mexicanos, destacando Tabasco con una superficie sembrada y cosechada de 41,117 hectáreas y una producción de 16,560 toneladas; le sigue Chiapas, con 20,203 hectáreas y una producción de 7,855 toneladas, y con un porcentaje menor Guerrero y Oaxaca, con 240 hectáreas (196 toneladas) y 36 hectáreas, respectivamente. En México hay más de 40,000 hectáreas de cacao en los estados de Tabasco y Chiapas, que producen 20,000 toneladas y podrían llegar hacia el final del sexenio hasta las 45,000 toneladas, con programas de fomento. La demanda mundial prevista para los siguientes años es superior a un millón de toneladas por el valor nutricional del cacao, el cual sirve como base para la elaboración de chocolates y confitería. En la Figura 1.3 se ilustra la demanda mundial de cacao considerando los principales países consumidores (SAGARPA, 2010).



Fuente: Organización Internacional del cacao, 2010

Figura 1.3. Demanda mundial de grano de cacao



1.1.4. Proceso de elaboración de licor de cacao alcalinizado.

En la Figura 1.4 se muestra el diagrama de bloques que ilustra las principales etapas durante el proceso de elaboración de licor de cacao.



Figura 1.4. Diagrama de bloques del proceso de elaboración de licor de cacao



A continuación, se tratará con detalle algunas de las principales etapas del diagrama de flujo anteriormente señalado.

1.1.4.1. Limpieza

Los granos crudos de cacao, en general, se reciben en determinados países productores de una manera razonablemente limpia y libre de impurezas, menos de pequeñas cantidades de granos superficialmente quebrados, esto se ha reducido considerablemente como resultado de un mejor manejo poscosecha en el país de origen y sobre todo durante el transporte y el almacenamiento (Minifie 1989).

Es costumbre en muchas fábricas de chocolate fumigar todos los granos entrantes por lo que esto puede dar lugar a residuos de plaguicidas en el grano de cacao. Sin embargo, el primer proceso que debe preceder a la fabricación de chocolate o cacao es el de la limpieza (Minifie 1989). En consecuencia, el proceso de descascarillado puede ser una buena alternativa para reducir este tipo de residuos en los granos de cacao.

El proceso de limpieza consiste de varias operaciones, que por medio de pantallas de diferentes mallas, cepillos, elevadores de aire, y metales magnéticos eliminan las impurezas. La cáscara de algunos granos puede ser de gran molestia si pasa más allá del proceso de limpieza, ya que puede aparecer en el producto final y aumentar la ceniza insoluble hasta en un 0.3%, así como contribuir al desgaste de la maquinaria (Minifie 1989).

1.1.4.2. Fermentación

La fermentación y el correcto secado del cacao son de vital importancia, ya que el posterior procesamiento de los granos no corregirá las malas prácticas en estas etapas. Un buen sabor en el cacao o en el chocolate se relaciona estrechamente con una buena fermentación, pero si el secado después de la fermentación se retrasa, esto también impartirá sabores muy desagradables, incluso si la fermentación se ha realizado correctamente (Minifie 1989).



Después de que las vainas se cortan de los árboles, se extrae la pulpa junto con los granos y se transfieren a cajas de madera para la fermentación. La fermentación se lleva a cabo durante 5-6 días, en los primeros días la pulpa se convierte en líquido y se escurre, con un aumento de la temperatura. Al tercer día, los granos tendrán una temperatura de aproximadamente 45°C, y se mantendrá entre esta temperatura y unos 50°C hasta que la fermentación se haya completado. Es necesario mezclar los granos de vez en cuando para airear (Minifie, 1989).

Durante la fermentación, la temperatura aumenta dramáticamente durante las primeras etapas y se infiere que tres días a esta temperatura son suficientes para reducir su germinación hasta en un 100%. Tras su reducción en la germinación se liberan enzimas (un tipo de catalizador capaz de aumentar enormemente la velocidad de ruptura de sustancias como la grasa en sus componentes esenciales), provocando la rápida descomposición de las reservas nutritivas del grano para dar azúcares y ácidos, que son los precursores del sabor en el chocolate. Sin embargo, el proceso es mucho más complicado, ya que el proceso de fermentación más habitual tiene lugar fuera del grano. Allí hay parte de la pulpa blanca, que es muy rica en azúcares que pueden ser metabolizados por las levaduras que también se encuentran presentes para formar ácidos y etanol, de un modo muy parecido al que tiene lugar en la fermentación de la cerveza. Este etanol activa a otras bacterias, por ejemplo las acéticas y las ácido-lácticas que lo transforman en sus respectivos ácidos. El etanol y los ácidos son capaces de pasar al interior del grano a través de la cascarilla, este cambio en la acidez (pH) también acelera la reducción en el poder germinativo del grano (Beckett, 2002).

También tienen lugar otras reacciones importantes: las proteínas y los péptidos reaccionan con los polifenoles para dar el color marrón asociado al cacao, a la vez que se forman otros precursores del sabor a través de reacciones entre la sacarosa y las proteínas. De especial importancia es la formación de aminoácidos, los cuales mejoran las propiedades nutritivas de este grano (Beckett, 2002).



1.1.4.3. Secado

Tras la fermentación, los granos de cacao deben secarse antes de que puedan transportarse a las fábricas en las que se elabora el chocolate. Si esta operación no se realiza adecuadamente, se produciría un crecimiento de hongos en los granos. Este crecimiento suele conferirle al chocolate un fuerte olor a sucio de manera que no podría emplearse. Sin embargo, tampoco se debe secar en exceso al grano, ya que granos con un contenido de humedad menor a 6%, son altamente quebradizos, lo que hace más complicada su manipulación y procesado (Beckett, 2002).

En donde el clima lo permite, los granos de cacao se secan al sol. Durante el día se extienden en capas de 10 cm de grosor sobre esterillas, bandejas o en terrazas. Se rastrillan a intervalos determinados y por la noche o cuando llueve, se amontonan y se protegen de las inclemencias del tiempo. Habitualmente es necesario una semana para que los granos se sequen a un contenido de humedad entre 7-8%, la cual es suficiente como para evitar el crecimiento de hongos. Uno de los mayores problemas del secado al sol es el riesgo de contaminación que pueda provenir de los alrededores de la granja y de los animales (insectos, roedores, etc) que puedan merodear entre los granos. En donde el clima es demasiado húmedo, es necesario recurrir al secado artificial. Los desecadores de aire forzado son los más efectivos en extraer la humedad de los granos, considerando que éstos son intercambiadores de calor de alta eficiencia. Si el secado es demasiado lento, los granos tendrán un sabor muy ácido por lo que es mejor dejarlas secar durante períodos de tiempo mayores, bien a temperaturas más bajas o bien realizando cambios intermitentes de temperaturas (Beckett, 2002).

1.1.4.4. Tostado

El tostado es un procedimiento aplicado a muchos productos alimenticios como mecanismo para desarrollar sabores, es en realidad una forma de cocción, aunque ésta última expresión es más apropiada si el agua "en cantidad" también está involucrada (Minifie 1989).



Durante el tostado de los granos fermentados y secados, los cambios que se tienen son los siguientes:

- El grano pierde humedad
- La cáscara se remueve
- Los nibs (cotiledón) se vuelven más friables y por lo general se oscurecen
- Hay una cierta degradación de los aminoácidos, como lo demuestra Rohan y Stewart (1996), y las proteínas son parcialmente desnaturalizadas. Akabori (1932) ha mostrado que los azúcares reductores naturales son destruidos casi por completo durante la degradación de los aminoácidos. Por otra parte, existen reacciones de oscurecimiento no enzimático asociadas con el cacao tostado, lo cual ha sido revisado por Foster (1978)
- Hay una pérdida de los ácidos volátiles y otras sustancias que contribuyen a la acidez y la amargura. Un gran número de compuestos se han detectado en los productos volátiles tales como: aldehídos, cetonas, furanos, pirazinas, alcoholes y ésteres

Los cambios durante el proceso de secado están relacionados con el tiempo y la temperatura de tostado, así como la velocidad de pérdida de humedad durante el proceso. Las condiciones de tostado suelen variar de acuerdo a la máquina y el producto requerido. El tratamiento térmico, es una alternativa para el tostado y puede proceder en dos etapas (Fincke, 1965). El primero es un proceso de secado en el que se somete el grano a la baja temperatura de calefacción; esto seca y suelta la cáscara pero prácticamente no tiene ningún efecto sobre los nibs, ya que es poco probable que la temperatura exceda los 100°C. Este calentamiento inicial es seguido de un tratamiento de alta temperatura, la cual puede llegar entre los 125-135°C. Esta temperatura está relacionada con los requisitos de procesamiento posterior, es decir, con la fabricación de chocolate en polvo, cacao o manteca de cacao (Minifie 1989).

1.1.4.5. Descascarillado

El descascarillado es el proceso por el cual se separa la cáscara y parte del germen del resto del grano. Es deseable mantener a los cotiledones centrales (grano) en



trozos lo más grandes posibles de manera que se puedan separar con mayor facilidad de la cáscara. Los trozos pequeños que permanezcan con la cáscara serán descartados con ella, así que económicamente resulta muy importante realizar el descascarillado de una manera correcta (Beckett, 2002).

Los granos rotos se separan al principio, para prevenir que se rompan aún más y van directamente al proceso de separación. El resto del grano se descascarilla, a menudo lanzándolo uno a uno a gran velocidad sobre placas de impacto, posteriormente pasándolos a tamices vibratorios (Beckett, 2002).

La cáscara se compone principalmente de material fibroso y normalmente tiene la forma de una placa plana. Por otro lado, el grano normalmente es mucho más esférico y como más de la mitad es grasa, es mucho más denso. Cuando ambas son sometidas a vibraciones a la vez y se proyecta aire hacia arriba, la cáscara, que es más ligera, va hacia arriba y se separa (Beckett, 2002).

1.1.4.6. Molienda

Después del tostado, y cuando ya están fríos, se hace la trituración de los granos. Esta operación tiene gran importancia, porque, además de romper los granos en pequeños fragmentos, la trituración tiene que eliminar por completo las cascarillas y el germen (Gianola, 1986).

En la molienda del grano de cacao hay varios objetos a cumplir. El primero es hacer que las partículas de cacao sean lo suficientemente pequeñas como para fabricar chocolate. Hay una molturación posterior en el proceso de fabricación del chocolate, de modo que no es necesario realizar una molienda muy fina en esta etapa. La segunda razón, de mayor importancia, es la de extraer la mayor cantidad posible de grasa del interior de las células del cotiledón. La grasa es necesaria para facilitar el flujo del chocolate, tanto en la fabricación de dulces como cuando funde en la boca. La grasa está localizada en unas células de un tamaño medio entre 20-30 micras de longitud y de entre 5-10 micras de profundidad (Beckett, 2002).



Es necesario moler el grano y reducirlo desde un tamaño de partícula de aproximadamente medio centímetro hasta menos de 30 micras; esto implica que se debe reducir el tamaño de las partículas unas 100 veces (Beckett, 2002).

1.1.4.7. Alcalinizado "Dutching"

La alcalinización es el nombre dado al tratamiento de nibs, en masa o en polvo con un agente alcalinizante. El método fue utilizado por primera vez por Van Houten en 1828 y el cacao así tratado puede ser descrito como "alcalino", "Dutched", o "soluble", pero el último término es incorrecto, ya que no hay un aumento en la solubilidad de cacao alcalinizado (Minifie, 1989). El alcalinizado se puede llevar a cabo antes o después del tostado, y los agentes alcalinizantes comúnmente empleados son: el bicarbonato, el carbonato o hidróxido de potasio, hidróxido de sodio, hidróxido de calcio, hidróxido de magnesio, e inclusive el hidróxido de amoníaco. La alcalinización produce, entre otras cosas, la hidrólisis de los almidones y los glucósidos naturales, y la modificación de los taninos y compuestos fenólicos a sustancias menos complejas. Mediante un cuidadoso control se pueden desarrollar una amplia gama de colores (naranja a casi negro), así como niveles en el sabor. Por otra parte la alcalinización también mejora la dispersabilidad (Kick y Sawyer, 1991).

En muchos países, la cantidad de compuestos alcalinos y químicos que se pueden utilizar son controlados por la ley, sin embargo, la manera en que éstos son utilizados no es controlada. El límite máximo permitido es normalmente 2.5 a 3 partes de carbonato de potasio (o su equivalente alcalino) por 100 partes de nibs. Algunos países permiten el uso de ácidos alimentarios, para controlar el pH y la generación de tonos rojizos, pero este efecto es insignificante en comparación con el producido por la dilución de las soluciones alcalinas (Minifie, 1989).

Los aditivos para alimentos permitidos como reguladores de la acidez en el cacao de acuerdo a la norma Norma Oficial Mexicana NOM-186-SSA1/SCFI-2002 se muestran en la Tabla 1.2:



Tabla 1.2. Aditivos permitidos por NOM-186- SSA1/SCFI-2002

Aditivos			
Carbonatos	Hidróxidos	Bicarbonatos	Otros
Amónico	Amónico	Amónico	Ácido cítrico
Cálcico	Magnésico	Potásico	Óxido magnésico
Magnésico	Potásico	Sódico	
Potásico	Cálcico		
Sódico	Sódico		

Las reacciones químicas que ocurren durante la alcalinización no se conocen con precisión, pero seguramente hay más que una neutralización de ácidos libres, pero no hasta lograr una saponificación. Las sustancias polifenólicas también son modificadas debido a el proceso de alcalinización, obteniéndose variaciones de color (Minifie, 1989).

El proceso de alcalinización, aumenta el pH, lo que, para la mayoría de los granos fermentados, oscila entre 5.2 y 5.6. El cambio resultante de la alcalinización depende de la cantidad de álcali utilizado, pero la mayoría de los cacaos alcalinizados o licores presentan un pH entre 6.8 y 7.5. Ciertos cacaos especiales, tales como el llamado cacao negro, presentan un pH tan alto como 8.5, y se utilizan principalmente para la pigmentación, y por lo general, tienen un sabor muy fuerte. El método de alcalinización, ha sido objeto de mucha investigación; sin embargo, a la fecha no ha sido objeto de estudio como método de inactivación de aflatoxinas durante el procesamiento de granos de cacao contaminados con estas aflatoxinas (Minifie, 1989).

1.1.5. Contaminación del cacao por microorganismos

Los granos de cacao están libres de microorganismos mientras se encuentran dentro de la mazorca, pero la pulpa es un medio excelente para su crecimiento y éste es favorecido en el proceso de fermentación. Proliferan allí levaduras y diversas clases de bacterias y se puede esperar que aún después de la desecación haya un gran número de microorganismos, entre los que se encuentran los hongos, que se adhieren a la cubierta. De hecho, la cubierta del cacao está



recubierta con gran número de bacilos (en su mayoría ino cuos) que permanecen allí desde la fermentación y, dependiendo de la higiene del proceso de desecación, puede también haber algunas bacterias menos resistentes pero potencialmente peligrosas. Las bacterias están en estado latente mientras la semilla está seca. El proceso de tostado, normalmente supone temperatura suficiente para eliminar todas las bacterias excepto los bacilos termoresistentes (Beckett, 1994).

Los hongos invaden a los granos de cacao y como se ha indicado, son muy deterioradores, ya que con solamente un 3% de granos invadidos se puede contaminar el chocolate de manera importante, y esta contaminación no se puede subsanar ya por el procesamiento. Cuando se descubrió que algunos hongos podían producir micotoxinas, surgió la necesidad de conocer el efecto del tostado sobre el contenido de estas peligrosas sustancias (Beckett, 1994).

1.2. Micotoxinas

1.2.1. Generalidades

Se ha demostrado que un elevado número de hongos producen sustancias tóxicas denominadas micotoxinas. Algunas son mutágenas y/o cancerígenas, otras son tóxicas para determinados órganos. (Jay, 1994).

Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por ciertos hongos, y en pequeñísimas cantidades pueden ser tóxicos a los animales que las ingieren (Smith *et al.*, 1994). Los metabolitos primarios de los hongos, así como de otros microorganismos, son aquellos compuestos indispensables para su crecimiento. Los metabolitos secundarios son producidos al final de la fase de crecimiento exponencial y carecen de importancia aparente para el microorganismo que los produce con respecto a su crecimiento o a su metabolismo. En general, parece ser que el microorganismo los produce cuando se acumulan grandes reservas de precursores de metabolitos primarios tales como aminoácidos, acetato, piruvato, entre otros. La síntesis de micotoxinas representa un mecanismo que posee el



hongo para reducir la reserva de precursores metabólicos que sus necesidades ya no demandan (Jay, 1994).

Las micotoxinas pueden contaminar los alimentos, o las materias primas utilizadas, originando un grupo de enfermedades y trastornos, denominados micotoxicosis (Soriano del Castillo, 2007).

Seguramente las micotoxinas siempre han estado con nosotros, pero hasta hace unas cuantas décadas se les reconoció como un problema de salud pública y animal. Evidencias actuales, sobre la importancia de los diferentes hongos toxígenos que invaden a los granos indican, que los géneros más importantes son *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* (Brook y White, 1966).

El análisis de las micotoxinas comprende una serie de pasos que inician con el muestreo, la extracción, purificación, separación y cuantificación de la toxina. La principal dificultad en el muestreo de los granos o productos sospechosos de contaminación por micotoxinas es que éstas no se encuentran distribuidas de manera homogénea (Davis *et al.*, 1980; Whitaker *et al.*, 1981).

1.2.2. Aflatoxinas

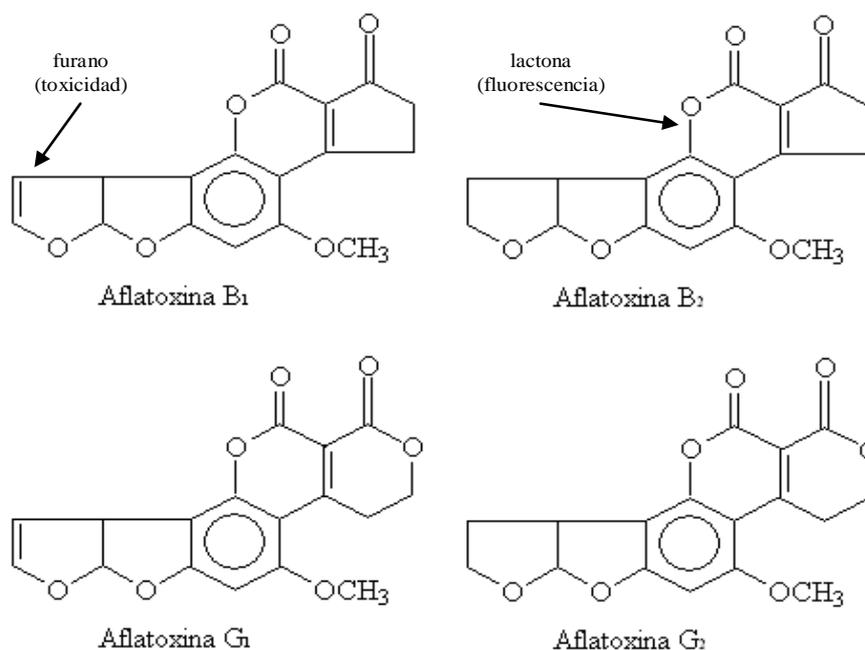
En 1960, murieron 100,000 pavos en Inglaterra de una causa "misteriosa". La mortandad fue asociada con diferentes lotes de alimentos, y todos ellos tenían un ingrediente en común, harina de cacahuate de una sola fuente de procedencia (Sargeant *et al.*, 1961). La investigación permitió concluir que la causa de la muerte de las aves era una sustancia producida por el hongo *Aspergillus flavus*, por lo que a estas sustancias se les llamó aflatoxinas.

Las aflatoxinas son un grupo de metabolitos secundarios, producidos por *Aspergillus flavus* Link, *Aspergillus parasiticus* Speare y *Aspergillus nomius* Kurtzman *et al.* (Feibelman *et al.*, 1998; Weidenbörner, 2007). Las principales aflatoxinas son cuatro: AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂. Generalmente AFB₁ es encontrada en mayores concentraciones que las otras y es la más potente, siendo carcinógena,



teratógena y mutágena, y el órgano que más afecta es el hígado, por lo que es considerada una hepatotóxina (Moreno, 1996).

Químicamente las aflatoxinas son difuranocumarinas (Buchi y Rae, 1969), estos compuestos están formados por anillos heterocíclicos, los furanos relacionados a la toxicidad y un anillo de lactona responsable de la fluorescencia y el cual también hace que estos metabolitos sean susceptibles a la hidrólisis alcalina (Lillehoj, 1983). Las letras B y G se refieren a los colores azul y verde de fluorescencia observados bajo la luz ultravioleta de onda larga; esta propiedad de fluorescencia de las aflatoxinas ha llegado a ser la base para la cuantificación por métodos fisicoquímicos (Asao *et al.*, 1963); y los números se refieren a los patrones de separación de éstos compuestos al utilizar la cromatografía de capa fina (Bullerman, 1979). En la Figura 1.4 se muestran las estructuras moleculares de algunas aflatoxinas.



Fuente: Ellis *et al.*, 1991

Figura 1.5 Estructura de algunas micotoxinas

Desde hace más de 30 años se descubrió que las aflatoxinas son sustancias muy potentes productoras de cáncer en animales de laboratorio (Wogan y Newberne, 1967). Desde entonces numerosas investigaciones se han hecho acerca del efecto



de las aflatoxinas en la salud de los animales domésticos, en los cuales se ha detectado baja ganancia de peso, un desarrollo lento, problemas en la reproducción, diarrea, desórdenes respiratorios, hemorragias, reducción en la producción de leche y huevo; así como la alteración del sistema inmunológico, con el consecuente incremento en el desarrollo de infecciones por bacterias, virus, y otros agentes causantes de enfermedades, lo cual incluso ocasiona la muerte de los animales (Keyl y Booth, 1971; Tung *et al.*, 1975; Guthrie, 1979; Bodine y Mertens, 1983).

Existen evidencias respecto a la ingestión de alimentos contaminados con aflatoxinas y el desarrollo de cáncer en humanos, particularmente en regiones cálidas y húmedas, como la India, en África y en algunos países asiáticos. La Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC), en 1987 consideró que las aflatoxinas eran sustancias con alto poder cancerígeno en humanos, clasificándolas en el Grupo 1. En estudios hechos en Kenya, así como en Tailandia, se ha encontrado una correlación positiva entre la ingestión de aflatoxinas y el desarrollo de cáncer en el hígado (Bhat, 1989). También hay evidencias de que las partículas de grano y el polvo en el aire pueden estar contaminados con aflatoxinas, que al ser inhaladas pueden causar cáncer pulmonar (Dvorackova, 1976); esto es importante para la salud de los trabajadores que están expuestos al manejo de los granos contaminados con estas tóxicas.

La producción de aflatoxinas depende de varios factores: la cepa del hongo, el sustrato, el contenido de humedad, la temperatura y la micoflora asociada. Las aflatoxinas son producidas sólo por algunas cepas denominadas toxígenas, cuyos requerimientos son especiales para su desarrollo, por ejemplo: una actividad de agua mínima de 0.85, equivalente a 16.5% de humedad en granos como el maíz y el cacao. En cuanto al límite de humedad máximo, prácticamente no existe; puesto que en los laboratorios se pueden producir aflatoxinas aún en medio líquido, siempre y cuando sean cultivos puros.



En cuanto a la temperatura mínima para la producción de aflatoxinas es de 12°C, la óptima de 27-30°C y la máxima de 40-42°C. *A. flavus* crece lentamente a temperaturas menores de 12°C, y rápidamente a temperaturas hasta de 55°C; pero no produce aflatoxinas debajo de 12°C, ni arriba de 40-42°C (Diener y Davis, 1966).

1.2.3. Efecto de las aflatoxinas

Elevados niveles de micotoxinas en la dieta pueden causar efectos adversos agudos y crónicos sobre la salud del hombre y gran variedad de especies animales. Los efectos adversos pueden afectar a distintos órganos, aparatos o sistemas, especialmente al hígado, el riñón, el sistema nervioso, el endocrino y el inmune. Los síntomas causados por las micotoxinas suelen ser tan diferentes unos de otros como lo son las propias estructuras químicas de dichas toxinas (Soriano del Castillo, 2007).

Dentro de las micotoxinas, la aflatoxina AFB₁ se considera la más tóxica y en orden decreciente le siguen: G₁, B₂, G₂, M₁ y Q₁ (Betina, 1989). Bioquímicamente, las aflatoxinas pueden alterar el metabolismo de carbohidratos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos, así como el metabolismo energético. Las aflatoxinas pueden ser consideradas como inhibidores biosintéticos tanto *in vitro* como *in vivo*. Altas dosis pueden provocar una inhibición total de los sistemas bioquímicos, y dosis bajas pueden afectar diferentes sistemas metabólicos (Ellis *et al.*, 1991).

1.2.3.1. Efectos biológicos

Son muchos los efectos biológicos causados por la exposición a AFB₁, y pueden enumerarse los siguientes:

1.2.3.1.1. Toxicidad

Las aflatoxinas son tóxicas, principalmente al hígado, dependiendo de la duración de la exposición y de la concentración, puede presentarse una toxicidad aguda o crónica. El mecanismo de acción de AFB₁ hacia las células hepáticas ha sido



ampliamente estudiado; sin embargo, aún no ha sido completamente elucidado (Coulombe, 1994; Roebuck y Maxuitenko, 1994).

1.2.3.1.2. Citotoxicidad

En estudios realizados *in vitro*, mediante el uso de cultivos celulares (humanos y de animales), se ha probado la citotoxicidad causada por las aflatoxinas. En general, los efectos se han estudiado en líneas celulares como células embrionarias de pato, células hepáticas de mono, de riñón, células hepáticas de embrión humano, células epiteliales de mono, entre otras.

También está demostrado que la AFB1 puede afectar el ciclo celular y la mitosis de algunas células, especialmente hepatocitos (Betina, 1989; Roebuck y Maxuitenko, 1994). Consecuentemente, se ha considerado que las aflatoxinas son sustancias con gran actividad citotóxica.

1.2.3.1.3. Efectos inmunopresores

Las aflatoxinas pueden afectar al sistema inmune celular y humoral, provocando un aumento en la susceptibilidad de los animales hacia enfermedades causadas por bacterias, hongos y parásitos. Además, pueden existir efectos inmunotóxicos sin observarse patologías clínicas aparentes (Coulombe, 1994; Miller y Wilson, 1994).

1.2.3.1.4. Mutagenicidad

Dentro de los bioensayos empleados para medir mutagenicidad de las aflatoxinas se pueden citar: detección de aberraciones cromosómicas en linfocitos humanos, cultivos pulmonares embrionarios humanos, células de riñón de rata y hámster, células HeLa, mutaciones en microorganismos como *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Neurospora crassa*, *Salmonella typhimurium*, *Drosophyla melanogaster*, células T de riñón humano, cultivo de leucocitos humanos e inducción de fagos en bacterias lisógenas (Ellis *et al.*, 1991).



1.2.3.1.5. Carcinogenicidad

La capacidad de las distintas aflatoxinas para inducir tumores en especies animales difiere considerablemente, siendo uno de los principales motivos la variabilidad en cuanto a su metabolismo, distribución y excreción, por lo que las cantidades mínimas necesarias para la inducción de cáncer son también dependientes de estas propiedades, sin perder de vista, además, la susceptibilidad relativa de cada especie animal (Loechler, 1994).

1.2.3.1.6. Teratogenicidad

Algunas de las aflatoxinas son capaces de interferir en el desarrollo normal de los fetos, y la respuesta depende del estado del desarrollo del feto, la dosis y la vía de administración. En mamíferos si la administración se realiza durante la organogénesis activa (8 días) ocasiona la muerte fetal y la reabsorción de algunos fetos, siendo posible observar malformaciones en algunos fetos que logran sobrevivir. Si la toxina es aplicada después del día 13, cuando la organogénesis está casi finalizando, no ocurre malformación de fetos, y la reabsorción y muerte fetal ocurre en baja frecuencia (Hayes, 1981).

1.2.3.2. Contaminación de los alimentos con aflatoxinas

Las aflatoxinas se han detectado como contaminantes naturales en un gran número de productos agrícolas, habiéndose confirmado su presencia en prácticamente todas las zonas del mundo y en mayor o menor grado, en casi todos los alimentos de primera necesidad (Soriano del Castillo, 2007).

La infección fúngica y la contaminación por aflatoxinas pueden ocurrir en cualquier punto de la cadena alimentaria, desde el cultivo hasta la recolección, el transporte, el almacenaje y el procesado de los diferentes productos agrícolas. Los factores que favorecen la proliferación de los hongos toxígenos son principalmente las altas temperaturas y una elevada humedad relativa, así como la humedad del suelo, las sequías extremas y los daños producidos en las semillas y frutos por golpes mecánicos y el ataque de insectos, roedores, pájaros, entre otros.



El almacenamiento y transporte en condiciones inapropiadas se han identificado como puntos críticos para evitar la contaminación por aflatoxinas, recomendándose siempre la limpieza y ventilación de los recintos de almacenaje y, sobre todo, el secado de los productos agrícolas hasta un nivel de humedad que impida el crecimiento de los hongos y que puede variar según cada producto agrícola (Soriano del Castillo, 2007).

Los alimentos considerados más susceptibles a la contaminación fúngica y la consiguiente producción de aflatoxinas incluyen típicamente al maíz, los cacahuates, los pistachos, las nueces del Brasil, las semillas de algodón y la copra. También se han encontrado aflatoxinas en otras semillas oleaginosas como el girasol y la soya, en los aceites vegetales sin refinar, en otros frutos secos como las almendras, las avellanas y las nueces, en las especias como el pimentón, el chile, la pimienta, así como también en las frutas desecadas como los higos, las pasas, el café y el cacao (Soriano del Castillo, 2007).

En informes de estudios actuales sobre la incidencia de especies de hongos potencialmente productores de micotoxinas en granos de cacao, se reporta que los hongos predominantes son los del género *Aspergillus*, de las cuales el 64.1% de las cepas de *A. flavus* produjeron aflatoxinas. La mayoría de las cepas de *A. flavus* presentaron una toxicidad moderada, con concentraciones medias que van desde los 100 ng/g hasta 1000 ng/g (Sánchez–Hervás, 2008).

También se ha reportado la presencia de hongos toxigénos y aflatoxinas en muestras de cacao recolectadas de exploraciones agrícolas brasileñas, las cuales fueron tomadas en diferentes etapas de la fermentación, el secado y el almacenamiento (Coppetti, 2011).

1.2.3.3. Control de aflatoxinas (legislación) en cacao

En la literatura se sugieren varios niveles de tolerancia para aflatoxinas, dentro de ellos los siguientes son los establecidos por la FDA (Food & Drug Administration) de los Estados Unidos de Norteamérica:

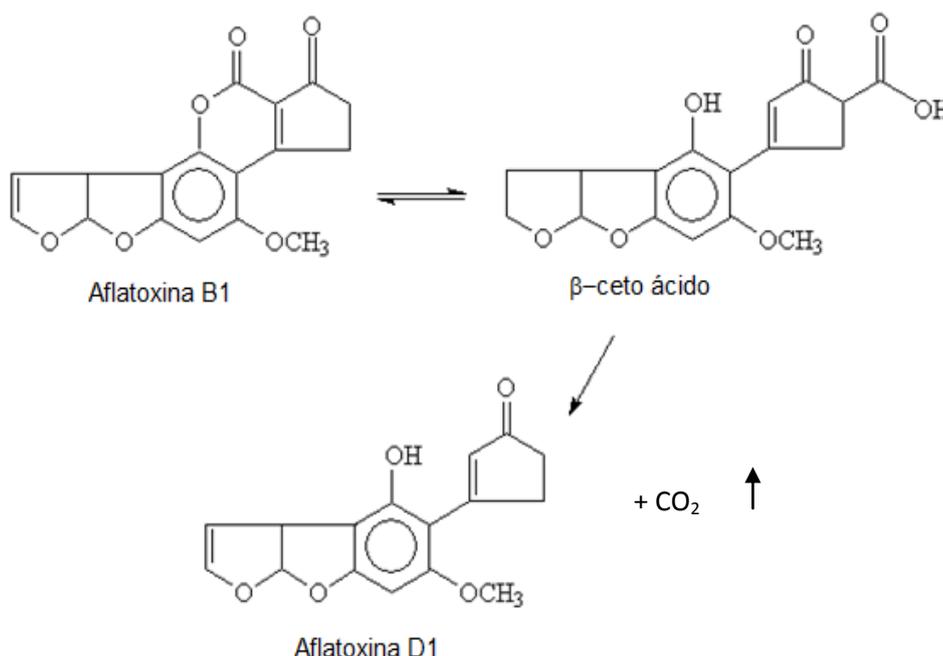


- 20 ng/g para alimento de consumo humano y aves, cerdos y ganado en desarrollo.
- 100 ng/g para aves, cerdos y ganado maduro.
- 200 ng/g para cerdos de finalización.
- 300 ng/g para ganado de finalización.

Mientras que de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-186-SSA1/SCFI-2002, el grano de cacao destinado para la alimentación humana no debe contener más de 20 ng/g de aflatoxinas.

1.2.4. Descontaminación/Destoxificación

Cierto tipo de alimentos como los granos requieren operaciones de procesamiento alcalino, algunos de ellos involucran tratamientos térmico-alcalinos, lo cual compromete la estabilidad de las aflatoxinas (Müller, 1984). La presencia del anillo de lactona en la molécula de aflatoxina las hace susceptibles al tratamiento alcalino (Parker y Melnick, 1966); sin embargo, si éste no es tan severo, la acidificación (Figura 1.5) puede revertir la reacción (Camou-Arriola y Price, 1989).



Fuente: Méndez-Albores *et al.*, 2005

Figura 1.6. Mecanismo químico de alcalinización de aflatoxina B1



Como se mencionó con anterioridad, las aflatoxinas se reactivan al acidificarse, lo cual también ha sido reportado por Price y Jorgensen (1985) cuando acidificaron muestras nixtamalizadas para simular el efecto de los ácidos en el estómago de los monogástricos.

Respecto a la detoxificación de productos para el consumo humano y/o animal, se ha realizado investigación con resultados promisorios, pero sin llegar aún a un desarrollo tecnológico aplicable bajo nuestras condiciones sociales y económicas, ya que el método más deseable y efectivo para controlar la producción de aflatoxinas es la prevención del desarrollo del hongo potencial productor de este metabolito (Moreno *et al.*, 2000).

1.2.5. Estrategias para destoxificar el grano de cacao

La destoxificación de los productos agrícolas contaminados con aflatoxinas, se puede llevar a cabo mediante dos formas: la remoción de la toxina del material y la degradación de estas en el sustrato. Para ello se han utilizado infinidad de tratamientos, los cuales se han basado en mecanismos físicos, químicos e inclusive biológicos. Sin embargo, de la gran mayoría de los métodos investigados, ninguno parece ser universalmente aceptable para degradar las micotoxinas presentes en el alimento, mejor aún, ningún método ofrece reducciones del 100% de contenido de estas toxinas. A continuación, se detallan algunos de los métodos comúnmente aplicados a los granos de cacao y sus derivados con el objetivo de reducir la concentración de estos metabolitos.

1.2.5.1. Métodos físicos

La radiación gamma a 5 kGy (Cobalto 60), en un atmosfera de aire ha mostrado que puede prevenir el desarrollo de los hongos en el grano de cacao (Ivory Coast) bajo condiciones de almacenamiento (humedades relativas mayores al 80% y temperaturas de 35 y 50°C) durante al menos un año. Este tratamiento, puede reducir drásticamente la concentración de esporas de los hongos toxígenos; sin embargo, no eliminarlos. Los autores señalan que este tipo de tratamiento físico para los granos de cacao puede ser de gran ayuda para reducir la carga



microbiana, además de incrementar la vida de anaquel de los granos durante su almacenamiento (Restaino *et al.*, 1984).

Durante el proceso de elaboración del pinole (harina de maíz tostado), se han observado reducciones de hasta un 81% del contenido inicial de aflatoxinas en maíces contaminados con 120.7ng/g de aflatoxinas totales. Las condiciones de procesamiento para lograr estas reducciones fueron: una temperatura de tostado de 285°C durante 7 minutos (Méndez-Albores *et al.*, 2004). Estas condiciones de tostado, pueden ser similares a las empleadas en el tratamiento de los granos de cacao durante el tostado, con la consecuente reducción en las aflatoxinas, para el caso de que los granos de cacao se encuentren contaminados con niveles cercanos a los reportados por los autores anteriormente señalados.

En el caso de otros productos agrícolas como el café, que también requieren una etapa de tostado, se han reportado reducciones en el contenido de aflatoxinas entre 42.2-55.9%. Estas reducciones son dependientes de las condiciones de procesamiento empleadas, entre ellas la temperatura y el tipo de tostado, ya que se han reportado valores más altos en la degradación de aflatoxinas durante el tostado en microondas (150°C, 4 minutos), en comparación con el tostado tradicional (180°C, 10 minutos) (Soliman, 2002).

En general, la degradación de las aflatoxinas se lleva a cabo a temperaturas cercanas al punto de fusión de éstas, 260°C para el caso de las aflatoxinas tipo B y 280°C para el caso de las aflatoxinas tipo G (Betina, 1989). Así que de igual forma, en el grano de cacao el tostado puede ser un tratamiento promisorio para la reducción del contenido de aflatoxinas. A la fecha, no existe ningún trabajo en la literatura internacional que señale el efecto del proceso de tostado sobre el contenido de aflatoxinas en los granos de cacao. Para nuestro conocimiento, este será uno de los proyectos pioneros en estudiar la degradación de las aflatoxinas en el grano de cacao, a través de dos mecanismos: uno físico (tostado), y otro químico (alcalinizado).



1.2.5.2. Métodos químicos

En granos de cacao se han utilizado diferentes concentraciones de aceites esenciales de *Aframomum danielli* a concentraciones de 500, 1000, 1500, 2000 ppm para tratar muestras infectadas de hongos toxígenos, en las cuales se encontró que la eficiencia en la reducción de AFB1 fue de 94.3%, siendo algunos componentes de éstos aceites esenciales, los mono-terpenos, los alcaloides y los ácidos fenólicos, los responsables de la reducción del contenido de aflatoxinas (Aroyeun *et al.*, 2009).

Por otra parte, se ha evaluado el uso de la teobromina a concentraciones de 0, 2, 4 y 8 mg/ml para inactivar el desarrollo del hongo toxígeno y la producción de aflatoxinas en medio de cultivo. Se reportó que este compuesto presente en los granos de cacao tuvo poco efecto sobre el crecimiento y la producción de aflatoxinas en la cepa de *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999, lo que indica que la actividad aflatoxígena no radica en esta metilxantina (Buchanan *et al.*, 1978).

Se han estudiado los efectos de la cafeína en la producción de aflatoxinas por *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999, en 13 tipos de granos de cacao. Los niveles de cafeína en los tipos de cacao oscilaron desde 0.30 hasta 3.6 mg/g. En los granos de cacao que contenían >1.80 mg/g de cafeína se encontraron niveles muy bajos de aflatoxinas. Estos datos proporcionan una evidencia adicional de que la cafeína es un inhibidor eficaz de la producción de aflatoxinas, lo cual explica de alguna manera el porqué las aflatoxinas no se acumulan en los granos de cacao que contienen estas concentraciones de cafeína bajo condiciones naturales de almacenamiento (Lenovich, 1981).

Finalmente, los efectos de la cafeína y la teofilina en el crecimiento y la producción de aflatoxina B1 por *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999, se estudiaron en medio AMY (Agar-Extracto de malta-Extracto de levadura) a pH 4.5. Los niveles de cafeína de 0.5, 1.0 y 2.0 mg/ml disminuyeron la producción de aflatoxinas en un 86, 96 y 100%, respectivamente. Por otra parte, los niveles de teofilina de 2.0, 4.0 y 8.0



mg/ml que fueron evaluados, no presentaron un efecto significativo en la reducción del contenido de aflatoxinas, únicamente la mayor concentración fue inhibitoria para el hongo, disminuyendo la producción de aflatoxinas hasta en un 54%. Los datos ayudan a explicar el porqué las aflatoxinas no suelen aislarse de los productos que contienen cafeína, e indican que la síntesis de aflatoxinas puede estar regulada por el adenosin monofosfato cíclico (Buchanan y Fletcher, 1978).

1.2.5.3. Métodos Biológicos

Para el caso de algunos materiales contaminados con aflatoxinas como el maíz y la crema de cacahuate, se han empleado algunas estrategias biológicas para la reducción de la contaminación. Para ello se han empleado diversos microorganismos, entre ellos algunas bacterias (*Flavobacterium aurantiacum*), algunos hongos macroscópicos (*Armillariella tabescens* Sing), así como algunos hongos microscópicos (*Aspergillus niger*), con muy buenos resultados. Sin embargo, para el caso del tratamiento biológico de los granos de cacao, aún no hay información disponible.

De los métodos anteriormente señalados, los que utilizan estrategias físicas, químicas, y/o su combinación, pueden resultar efectivos en la degradación de las aflatoxinas del grano de cacao. Considerando que el proceso de tostado se emplea comúnmente para la producción de licor de cacao, y que estos licores son a menudo alcalinizados para mejorar sus propiedades fisicoquímicas, el presente proyecto pretende evaluar el destino de las aflatoxinas en ambos procesos al producir licor de cacao partiendo de grano contaminado con un nivel relativamente alto de aflatoxinas. Esto permitirá, además de generar información básica referente a la degradación de las aflatoxinas, incorporar esta tecnología durante el procesamiento del cacao, no solo para mejorar su calidad fisicoquímica sino también para mejorar su calidad sanitaria.



2. PROPUESTA DE INVESTIGACIÓN

2.1. HIPOTESIS

El proceso de tostado y alcalinizado (Dutching) pueden resultar efectivos en la degradación de las aflatoxinas, además de mejorar las características fisicoquímicas de los licores de cacao así tratados.

2.2. OBJETIVO GENERAL

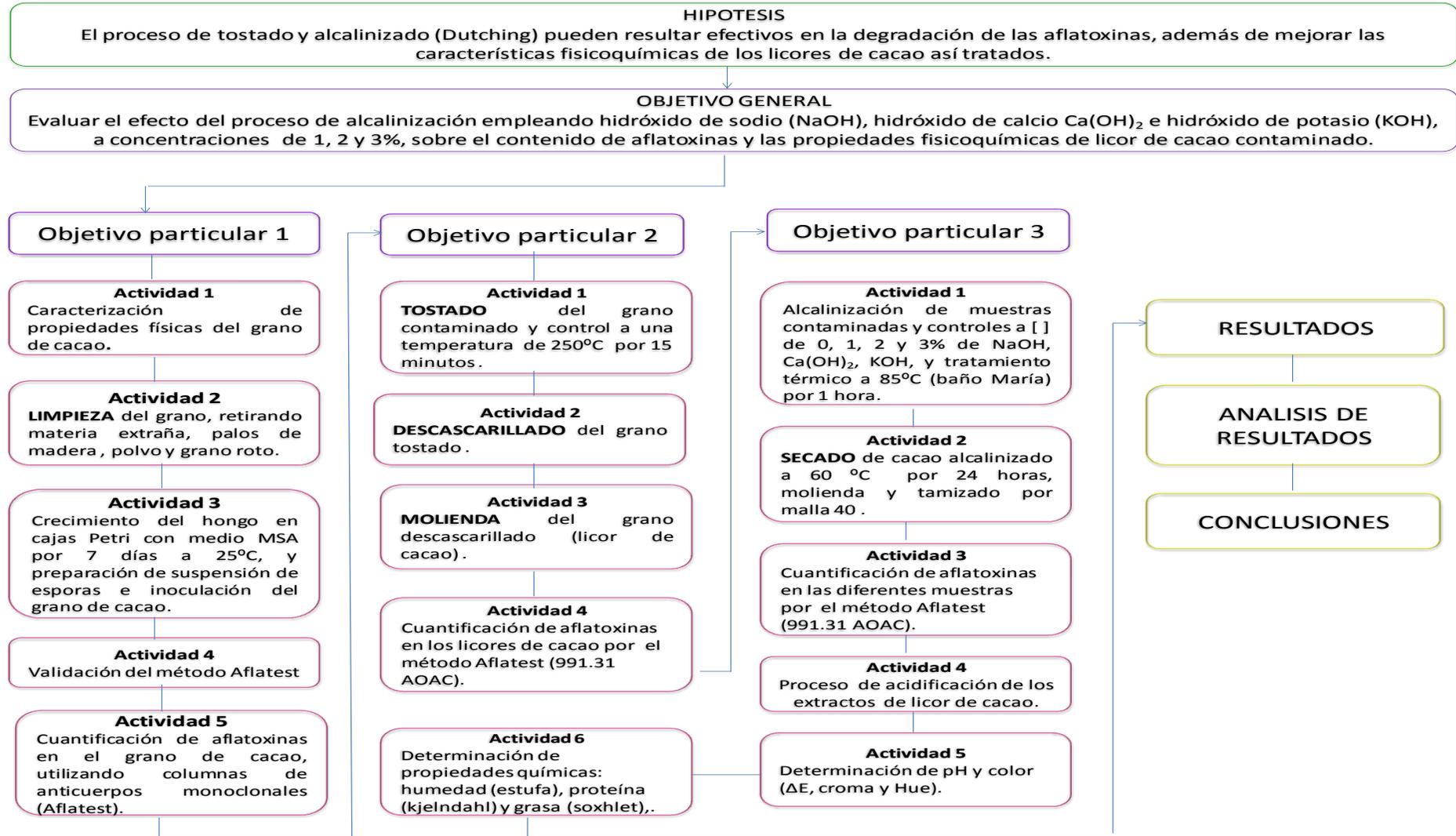
Evaluar el efecto del proceso de alcalinización empleando hidróxido de sodio (NaOH), hidróxido de calcio $[Ca(OH)_2]$ e hidróxido de potasio (KOH), a concentraciones de 1, 2 y 3%, sobre el contenido de aflatoxinas y las propiedades fisicoquímicas de licor de cacao contaminado.

2.3. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Generar un lote de grano de cacao fermentado contaminado con aflatoxinas mediante su inoculación con esporas del hongo *Aspergillus flavus* Link para posteriormente someterlos al proceso de tostado.
2. Evaluar el contenido de aflatoxinas con el método de columna de inmunoafinidad en los lotes de cacao sometidos al proceso de tostado para conocer la calidad sanitaria de los licores de cacao.
3. Determinar el efecto de la alcalinización, mediante el uso de diversos agentes alcalinizantes sobre la degradación de las aflatoxinas, así como la influencia que el proceso tiene sobre algunas propiedades físicas y/o fisicoquímicas para comparar la calidad sanitaria de los licores de cacao tratados de manera térmica-alcalina.



2.4. CUADRO METODOLÓGICO





3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES

3.1.1. Productos químicos

Estándares de aflatoxinas B1 y B2 se obtuvieron de Sigma Chemical Co. Ltd (St Louis, MO, EE.UU.). Los otros productos químicos como el hidróxido de sodio, el hidróxido de potasio y el hidróxido de calcio se obtuvieron de JT Baker (JT Baker, Mallinckrodt Baker, México).

3.1.2. Grano de cacao

Se utilizó grano de cacao de la región del Soconusco (Chiapas-México), tal como se ilustra en la Figura 3.1. Los granos estaban libres de aflatoxinas, según la prueba realizada con el método de columna de inmunoafinidad (Aflatest).



Figura 3.1 Grano de cacao de la región del Soconusco

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Medidas de seguridad

Los procedimientos utilizados para la manipulación de materiales contaminados con aflatoxinas fueron adoptados de las recomendaciones publicadas por la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (Castegnaro *et al.*, 1980).



3.2.2. Caracterización de propiedades físicas del grano de cacao

3.2.2.1. Tamaño del grano

Para determinar el tamaño del grano se midió el largo, ancho y espesor del centro del grano de cacao los cuales se pueden observar en la Figura 3.2. Se midieron 100 granos tomados al azar. Se utilizó un vernier Digimatic, marca Mitutoyo Corp., con rango de medida de 0.01-150mm. Los datos fueron reportados como el valor promedio y la desviación estándar de las mediciones. (Moreno-Martínez, 1984).

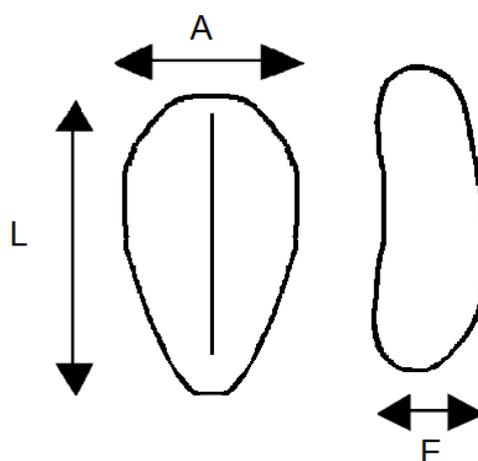


Figura 3.2. Dimensiones (L=largo, A=ancho, E=espesor) en grano de cacao.

3.2.2.2. Peso de 1000 gramos

Se tomaron 1000 granos al azar y se pesaron en una balanza analítica Ohaus, con una capacidad de 0-210g, y una precisión de $\pm 0.0001g$. Se hicieron cinco repeticiones de cada medición, se obtuvo la media y el error estándar en los datos.

3.2.2.3. Peso hectolítrico

Para la obtención de esta medida se siguió la técnica 55-10 de la AACCC (2000). Se llenó de granos en un recipiente de aluminio de volumen conocido, pesándose en una balanza analítica Ohaus. El peso hectolítrico se obtuvo al dividir el peso de los granos entre el volumen del recipiente y relacionándolo a un volumen de 100 litros. Las mediciones se hicieron con cinco repeticiones, se reportó la media y el error estándar.



3.2.3. Limpieza del grano de cacao

Se retiraron manualmente materia extraña tales como: polvo, pajillas, cascarilla y grano en mal estado.

3.2.4. Elaboración del inocular

El hongo *A. flavus* Link fue proporcionado por la Unidad de Investigación en Granos y Semillas (UNIGRAS-1231) de la Universidad Nacional Autónoma de México. El hongo se cultivó en cajas Petri con medio de cultivo MSA (extracto de malta, 2%; cloruro de sodio, 6%; y agar, 2%) durante 7 días a 25°C (Figura 3.3). Esta cepa sólo produce aflatoxina B1 (AFB1) y aflatoxina B2 (AFB2) (Méndez-Albores *et al.*, 2004).



Figura 3.3. Cepa del hongo *Aspergillus flavus*

3.2.5. Técnica de inoculación de cacao

Para la inoculación los granos, las esporas de los hongos sembrados fueron removidas de las cajas Petri con un bisturí, para preparar una suspensión de esporas y agua destilada (1.7 L) con aproximadamente 100000 conidios/ml, misma que se utilizó para aumentar el contenido de humedad del grano. La cantidad de inocular (aproximadamente de 16500 esporas/g de cacao) fue utilizada para evitar la competencia de los hongos de almacenamiento que potencialmente pudieran crecer a las condiciones de incubación del experimento. La cantidad total de grano de cacao que se empleo para el experimento fue de 20 kg. El contenido de



humedad de los granos se ajustó a 18%, mediante la adición de la suspensión de esporas, y se almacenó en garrafrones de plástico (10 kg de grano por tratamiento). Los garrafrones se cubrieron con una película delgada de polietileno para reducir al mínimo la pérdida de humedad del grano; sin embargo, se les hicieron 10 perforaciones con un alfiler a cada película, para evitar la acumulación de bióxido de carbono, el cual es generado por la respiración de los granos y los hongos. Los garrafrones tanto para la unidad experimental inoculada con el hongo, así como para el control (no inoculado), fueron incubados a 28°C, manteniéndose a una humedad relativa entre 70-75%. Los garrafrones se agitaron cada 12 horas a baja velocidad (60 rpm) durante 15 minutos en un mezclador (modelo C-100, Hobart Corp. Troy, Ohio, EE.UU.). Después del período de incubación de 21 días, el grano de cacao fue sometido a una atmósfera de gas de óxido de etileno a una concentración de 1000 mg/L durante 5 horas, para detener el desarrollo del hongo tóxico y evitar la dispersión de las esporas viables (Méndez-Albores et al., 2004). Finalmente, el grano se secó aproximadamente a 4.5% de humedad, y se almacenó a 4 °C en bolsas de polietileno para su posterior análisis.

3.2.6. Cuantificación de aflatoxinas

El contenido de aflatoxinas se determinó de acuerdo al método 991.31 de la AOAC (AOAC, 2000), utilizando columnas de anticuerpos monoclonales para aflatoxinas B1 y B2 (VICAM, Milford, Massachusetts, EE.UU.). La extracción se realizó mediante la molienda de 25 g de muestra (licor de cacao) con 5 g de cloruro de sodio (NaCl) grado reactivo y 100 ml de metanol, utilizando una licuadora de laboratorio (Mod. 51BL30; Waring, de New Hartford, Connecticut, EE.UU.). La mezcla se filtró a través de un papel filtro Whatman N° 1 pre-doblado, de la cual se recolectó una porción de 10 ml y se diluyó en una solución de 40 ml de acetato de zinc/cloruro de aluminio [$Zn(OAc)_2/AlCl_3$]. La preparación diluida se pasó por un segundo filtrado con papel microfibra. Del filtrado se tomaron 10 ml y fueron transferidos a una columna de inmunoafinidad (AflaTest-P; VICAM (2000)). Posteriormente, la columna se lavó dos veces con 10 ml de metanol-agua (20:80 v/v) y se secó en una cámara de flujo de aire estéril. Las toxinas se eluyeron con 1 ml de metanol grado HPLC, posteriormente se adicionó a este eluido 1ml de revelador (solución de



Bromo al 0.002%) y se agitó por espacio de 15 segundos en un vórtex, después de 1 minuto se cuantificó el contenido de aflatoxinas en un fluorómetro VICAM Serie-4 (VICAM Source Scientific. Irvine, California, U.S.A.). El límite de detección de aflatoxinas empleando columnas de inmunoafinidad a través de la medición de fluorescencia es de aproximadamente 0.5 ng/g (Hansen, 1990). Cuando la concentración de aflatoxina total fue superior a 25 ng/g, se hicieron diluciones de los extractos antes de pasarlos por las columnas de inmunoafinidad. En la Figura 3.4 se ilustra el proceso de extracción de aflatoxinas empleando columnas de inmunoafinidad.

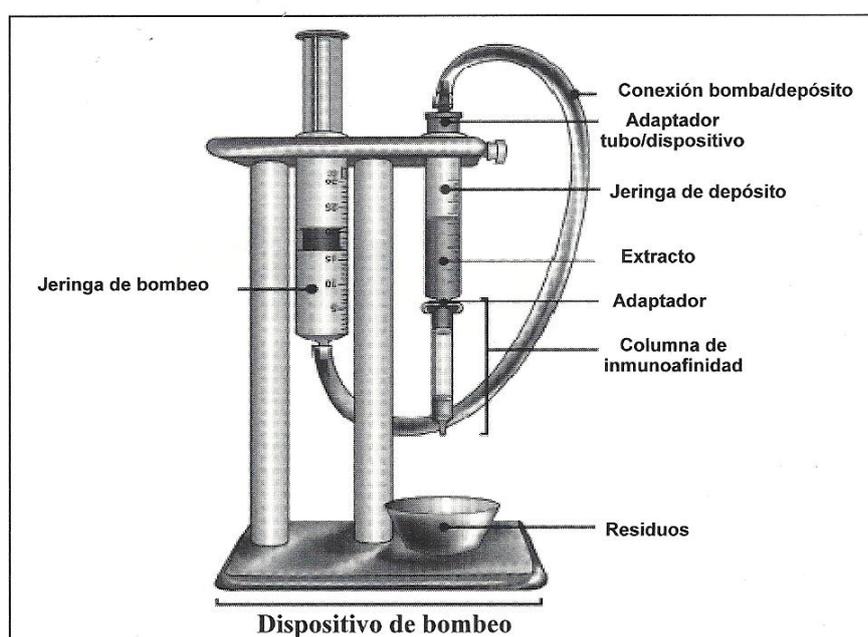


Figura 3.4. Extracción de aflatoxinas por el método de columna de inmunoafinidad

3.2.7. Validación del método

La capacidad de extracción de aflatoxinas en licor de cacao empleando el método 991.31 de la AOAC fue evaluado calculando el porcentaje de recuperación de aflatoxinas utilizando el método de HPLC. Se inyectaron 4 repeticiones a 6 diferentes concentraciones de aflatoxina estándar en licor de cacao (de 0.78, 1.56, 3.13, 6.25, 12.50 a 25 ng/g); logrando una recuperación de 92% de aflatoxinas, con un error estándar de 1.2, y un valor de coeficiente de variación de 4.4%. Estos resultados indicaron que el método utilizado es confiable.



3.2.8. Procedimiento de acidificación de los extractos de licor de cacao

Con la finalidad de conocer si la degradación de las aflatoxinas era permanente, los extractos metanólicos conteniendo a las aflatoxinas provenientes de los licores de cacao contaminados fueron ajustados a un pH de 3 mediante la adición de un buffer comercial a base de ácido clorhídrico-ftalato ácido de potasio (J.T. Baker) para simular la acidez estomacal. El pH fue determinado con un potenciómetro marca Conductronic.

3.2.9. Elaboración de licor de cacao

3.2.9.1. Proceso de tostado

Para producir el licor de cacao, se tomaron los lotes de 10 kg de cacao contaminado y de cacao control (granos libres de aflatoxinas), y se separaron en cuatro sublotos de 2.5 kg cada uno. Posteriormente, los granos fueron tostados en un horno a $250 \pm 5^\circ\text{C}$ durante 15 minutos, y se dejaron reposar durante 1 hora a temperatura ambiente ($22 \pm 1^\circ\text{C}$). En la Figura 3.5 se muestran los granos de cacao después del proceso de tostado.



Figura 3.5. Grano de cacao tostado

3.2.8.2. Proceso de descascarillado y molienda

Transcurrido el tiempo, los granos tostados se descascarillaron manualmente y fueron molidos en un molino de discos tipo C-11-1 (Glen Mills, Inc. Clifton, NJ,



EE.UU.). El licor de cacao obtenido de la molienda, se tamizó para obtener un tamaño de partícula menor a 500 micras (malla 40). En la Figura 3.6 se muestran las imágenes del grano de cacao descascarillado, el molino de discos empleado para la molienda, así como el licor de cacao.



Figura 3.6. Representación de: a) grano de cacao descascarillado, b) cascarilla, c) molino de discos y d) licor de cacao

3.2.9.3. Proceso de alcalinización

Para realizar la alcalización de los lotes de licor de cacao, se dispersaron 250 g de licor de cacao, en la solución correspondiente (500 ml de solución conteniendo 1, 2, 3% de cada uno de los álcalis) en un matraz de fondo redondo de 1 litro, los cuales fueron llevados a baño María (Bellco Glass Inc. NJ, EE.UU.) a 85°C, durante 1 hora. El cuello de los matraces se conectó a un condensador de reflujo con el fin de mantener el volumen de las unidades experimentales constantes y la pérdida por evaporación mínima. Una vez que la alcalinización se realizó, el licor de cacao alcalinizado se transfirió a un papel filtro y se colocó sobre charolas de aluminio para ser secado en una estufa de circulación de aire forzado a 60°C durante 24 horas, hasta alcanzar un contenido de humedad de aproximadamente 3%. Posteriormente, el licor alcalinizado se desprendió de la superficie del papel filtro y fue molido (Glen Mills, Inc. Clifton, NJ, EE.UU.) y tamizado hasta obtener un tamaño de partícula menor a 500 micras (malla 40). En la Figura 3.7 se muestra el licor de cacao alcalinizado y seco.



Figura 3.7 Licor de cacao alcalinizado y secado

3.2.10. Propiedades fisicoquímicas y físicas del licor de cacao alcalinizado

3.2.10.1. pH

La determinación de pH se realizó de acuerdo al método 970.21 de la AOAC (AOAC, 2000). Se colocaron 10 g de licor de cacao en un matraz Erlenmeyer y se añadió 100 ml de agua destilada a una temperatura de 25 °C. La suspensión se agitó por espacio de 15 minutos empleando un agitador magnético (Torrey Pines Scientific). En agitación se introdujo el electrodo y se tomó la lectura directa de pH con un potenciómetro marca Conductronic. En la Figura 3.8 se puede observar la suspensión de licor de cacao en agitación y el potenciómetro con el cual se tomó la lectura.



Figura 3.8. Determinación del pH en el licor de cacao



3.2.10.2. Color

Las muestras de licor de cacao se sometieron a un análisis de color utilizando un colorímetro (Figura 3.9) marca Minolta, modelo CR300.



Figura 3.9. Colorímetro marca Minolta

Muestras de 20g de licor de cacao se colocaron en cajas Petri de vidrio, y las lecturas se hicieron por triplicado. Tres funciones derivadas (ΔE , croma y hue) se calcularon a partir de los valores obtenidos de L, a y b, empleado las expresiones siguientes:

$$\Delta E = [(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2]^{1/2},$$

$$\text{Croma} = (a^2 + b^2)^{1/2}$$

$$\text{Hue} = \arctan (b/a)$$

3.2.11. Propiedades químicas del licor de cacao alcalinizado

3.2.11.1. Humedad

La determinación de la humedad se realizó de acuerdo al método 931.04 de la AOAC (AOAC, 2000). Se utilizaron cajas de aluminio a peso constante con aproximadamente 5g de muestra, las cuales se sometieron a secado en una estufa a $103 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 24 horas. La humedad se expresó con base en el peso húmedo de la muestra.



De los datos obtenidos, el porcentaje de humedad se calculó de acuerdo a la siguiente expresión:

$$\% \text{ Humedad} = \left(\frac{w3 - w2}{w1} \right) \times 100$$

Donde,

w1= peso de la muestra (g) antes de la desecación

w2= peso de la caja sin muestra (g)

w3= peso de la caja con muestra secada (g)

3.2.11.2. Proteína

La determinación de proteína, se realizó de acuerdo al método 970.22 de la AOAC (AOAC, 2000). El licor de cacao se sometió a un tratamiento oxidativo con ácido sulfúrico concentrado en presencia de una mezcla catalizadora. Del sulfato de amonio formado se liberó el amoníaco por el tratamiento alcalino y éste se transportó con ayuda de una destilación en corriente de vapor a un recipiente con ácido bórico y se realizó su titulación con una disolución valorada de ácido clorhídrico. El contenido de proteína en la muestra se calculó teniendo en cuenta el contenido de nitrógeno.

De los datos obtenidos, el porcentaje de nitrógeno se calculó de acuerdo a la siguiente expresión:

$$\% \text{ Nitrogeno total} = \left(\frac{(v_2 - v_1)(N)(0.014)}{W} \right) \times 100$$

$$\% \text{ Proteína} = (6.25)(\% \text{ Nitrógeno total})$$

Donde:

W= Peso de la muestra (g)

V1= Volumen (ml) de la solución de HCl requerido para la muestra control

V2= Volumen (ml) de la solución de HCl requerido para la muestra a analizar

N= Normalidad del HCl



3.2.11.3. Grasa

La determinación de grasa se realizó de acuerdo al método 963.15 de la AOAC (AOAC, 2000). La muestra anhidrida se extrajo con éter de petróleo en un equipo Soxhlet durante 4 horas, determinando gravimétricamente el extracto seco, del que se eliminaron los disolventes por evaporación. Para la extracción de grasa de los licores de cacao sin tratamiento alcalino; primeramente se acidificaron las muestras con ácido clorhídrico 8M, se filtraron hasta que las muestras quedaron libres de Cl, y posteriormente se transfirieron a un cartucho de extracción, secándolas durante 12 horas a 100°C. De los datos obtenidos el porcentaje de grasa se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Grasa} = \left(\frac{w3 - w2}{w1} \right) \times 100$$

Donde:

w1= peso de la muestra (g) antes de la desecación

w2= peso del matraz sin muestra (g)

w3= peso del matraz con grasa (g)

3.2.12. Análisis estadístico y diseño experimental

El experimento se condujo como un diseño completamente al azar bajo un diseño factorial 3×3; el primer factor correspondió al tipo de álcali (hidróxido de sodio, hidróxido de potasio e hidróxido de calcio), y el segundo factor correspondió a la concentración del álcali (1, 2 y 3% p/v). Las condiciones experimentales se llevaron a cabo con tres repeticiones. Los datos fueron evaluados mediante un análisis de varianza (ANDEVA) y la comparación de medias se efectuó mediante la prueba de Tukey, utilizando el paquete estadístico SAS (SAS, 1998). Un nivel de significancia de $\alpha=0.05$ se utilizó para distinguir diferencias significativas entre los tratamientos.



4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. Caracterización física del grano de cacao

En la Tabla 4.1, se muestran los valores de las propiedades físicas del grano de cacao utilizados en esta experimentación. El cacao empleado de la región del Soconusco presentó un tamaño promedio de grano de 20.51×11.71×6.88 mm (largo/ancho/espesor). Las dimensiones del grano de cacao son similares a las reportadas por Bart-Plange *et al.* (2002), quienes analizaron cacao cultivado en Ghana tipo B (granos de cacao que tienen menos de 100 granos en una muestra de 100 g) de la temporada 2000/2001; los autores reportan para los granos de cacao con una humedad de 8.6%, dimensiones de largo de entre 20.0 a 26.0 mm, de ancho entre 10.0 a 14.0 mm y espesor de entre 6.0 a 10.0 mm. El método utilizado para determinar las propiedades físicas del grano de cacao ha sido utilizado por otros autores (Aviara *et al.*, 1999; Deshpande *et al.*, 1993; Shepherd y Bhardwaj, 1986; Visvanathan *et al.*, 1996). A su vez, el grano de cacao empleado en esta investigación presentó un peso de 1000 granos de 901.96 g, atribuible de forma directa a su tamaño. Bart-Plange *et al.* (2003), reportaron valores del peso de 1000 granos en el rango de 1125 a 1247 g, éstos valores son ligeramente más altos que los aquí reportados, lo cual está directamente relacionado con las dimensiones del grano; los autores anteriormente señalados reportaron dimensiones de grano de: largo de 21.5 a 22.5 mm, ancho de 12.03 a 12.86 mm y espesor de 7.36 a 7.62 mm, razón por la cual registraron peso de 1000 granos más altos.

Tabla 4.1. Propiedades físicas del grano de cacao del Soconusco

Parámetro	Cacao del Soconusco
Largo (mm)	20.51 ± 0.03
Ancho (mm)	11.71 ± 0.01
Espesor (mm)	6.88 ± 0.02
Peso de 1000 granos (g)	901.96 ± 4.96
Peso hectolítrico (kg/hL)	58.28 ± 0.07

Media de tres repeticiones ± error estándar



En la Norma Oficial Mexicana NOM-186-SSA1/SCFI-2002, no se hace referencia a las características físicas del grano, el peso de 1000 granos, ni del peso hectolítrico; sin embargo, éstos atributos, son comúnmente utilizados como una medida de la calidad física en el comercio de los granos y las semillas (ISTA, 1996).

4.2. Aflatoxinas en el grano de cacao

La concentración de aflatoxinas totales en el grano de cacao utilizado para el procedimiento de alcalinización se muestra en la Tabla 4.2. El nivel de aflatoxina 1 (N1) corresponde al control, el grano experimental recibió el mismo tratamiento durante la incubación (27°C, 18% de humedad, 21 días) en ausencia de esporas del hongo productor de aflatoxinas; consecuentemente, no se detectaron aflatoxinas en el grano en ningún momento. Para el nivel de contaminación 2 (N2), la concentración de aflatoxinas fue de 220.68 ± 12.24 ng/g.

Tabla 4.2. Concentración de aflatoxinas totales en los granos de cacao inoculados y tostados

Tipo de Muestra	Incubación	Tostado	
	Aflatoxinas (ng/g)	Aflatoxinas (ng/g)	Degradación (%)
N1	ND	-	-
N2	220.68 ± 12.24	63.99 ± 2.59	71

Media de tres repeticiones \pm error estándar

N= Nivel de aflatoxinas

ND= No detectada (por debajo del límite de detección de las columnas de inmovilización, 0.5 ng/g)

La técnica de inoculación de los granos de cacao utilizada en la presente investigación (contenido de humedad, temperatura de incubación, el tiempo, la cantidad de esporas, y la cepa del hongo *A. flavus*) trabajaron muy bien para la obtención del nivel de contaminación de aflatoxinas. Este valor total de



aflatoxinas (220.68 ng/g) representa una concentración que puede ser encontrada en los granos de cacao comerciales, mismos que son utilizados para producir alimentos (Sánchez-Herváz *et al.*, 2008).

La Tabla 4.2 también muestra los porcentajes de reducción de aflatoxinas en los granos de cacao después del proceso de tostado (250°C, 15 min). Para el N2, la reducción de aflatoxinas fue de 71%, por lo tanto el licor de cacao presentó una concentración de aflatoxinas de 63.99 ± 2.59 ng/g. Este resultado concuerda con lo reportado previamente por Méndez-Albores *et al.* (2004), quienes tostaron granos de maíz contaminados con aflatoxinas a una temperatura de $285 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 7 minutos, reduciendo la concentración de aflatoxinas en un rango de 70 a 81%. En este contexto, se conoce que las aflatoxinas son inestables al alcanzar su punto de fusión, el cual se encuentra alrededor de los 250°C (Feuell, 1966). En consecuencia, el contenido de humedad, en combinación con el calor, puede inducir reacciones químicas que tienen lugar en algunas micotoxinas, reduciendo así su concentración.

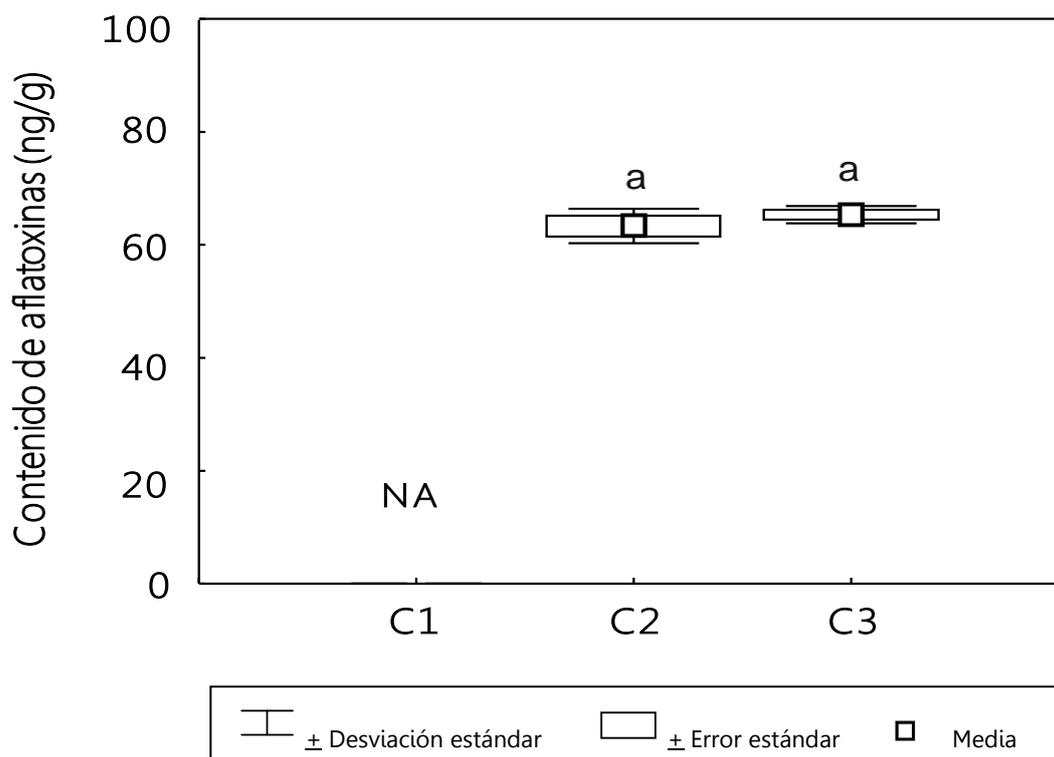
Por otra parte, los tratamientos que emplean el uso del calor degradan las micotoxinas hasta cierto punto durante el procesamiento de los productos alimenticios. Sin embargo, la reducción de las micotoxinas en relación con el tratamiento térmico depende de varios factores, entre ellos: la concentración de la micotoxina, el grado de unión entre las micotoxinas y los componentes del alimento, el poder de penetración del calor, el contenido de humedad y las condiciones de procesamiento, entre otras. En esta investigación, las condiciones de tostado ($250 \pm 5^\circ\text{C}$ durante 15 minutos) no fueron suficientes para degradar totalmente a las aflatoxinas, debido a que una cantidad residual (29%) siempre permaneció en el licor de cacao (63.99 ng/g). Es muy probable que las toxinas depositadas dentro de los granos de cacao, debido a la penetración del micelio del hongo, se encuentren protegidas en mayor medida que cuando están solamente presentes en la superficie de los granos de cacao (cáscara). Sin embargo, los tratamientos con calor siguen siendo un mecanismo



viable para la reducción de la concentración de micotoxinas en los productos alimenticios.

4.3. Aflatoxinas en el licor de cacao con y sin tratamiento térmico

En la Figura 4.1 se puede observar el contenido de aflatoxinas en las muestras de licor de cacao. La primera muestra corresponde al licor de cacao natural (C1), la muestra no fue sometida a la inoculación con esporas del hongo productor de aflatoxinas, ni al tratamiento térmico-alcalino, por lo tanto, no se detectaron aflatoxinas en estas muestras. La siguiente muestra corresponde al licor de cacao natural contaminado (C2), es decir, la muestra inoculada con el hongo productor de aflatoxinas. Finalmente, se muestra el licor de cacao natural inoculado con tratamiento térmico (C3), la cual corresponde a el licor de cacao contaminado con aflatoxinas y con el tratamiento térmico sin la adición del agente alcalinizante.



C1=Licor de cacao natural, C2=Licor de cacao natural contaminado y C3=Licor de cacao natural contaminado con tratamiento térmico. Cajas con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey >0.05)

Figura 4.1. Contenido de aflatoxinas en el licor de cacao natural, el inoculado y el tratado térmicamente a 85°C durante 1 hora sin agente alcalino

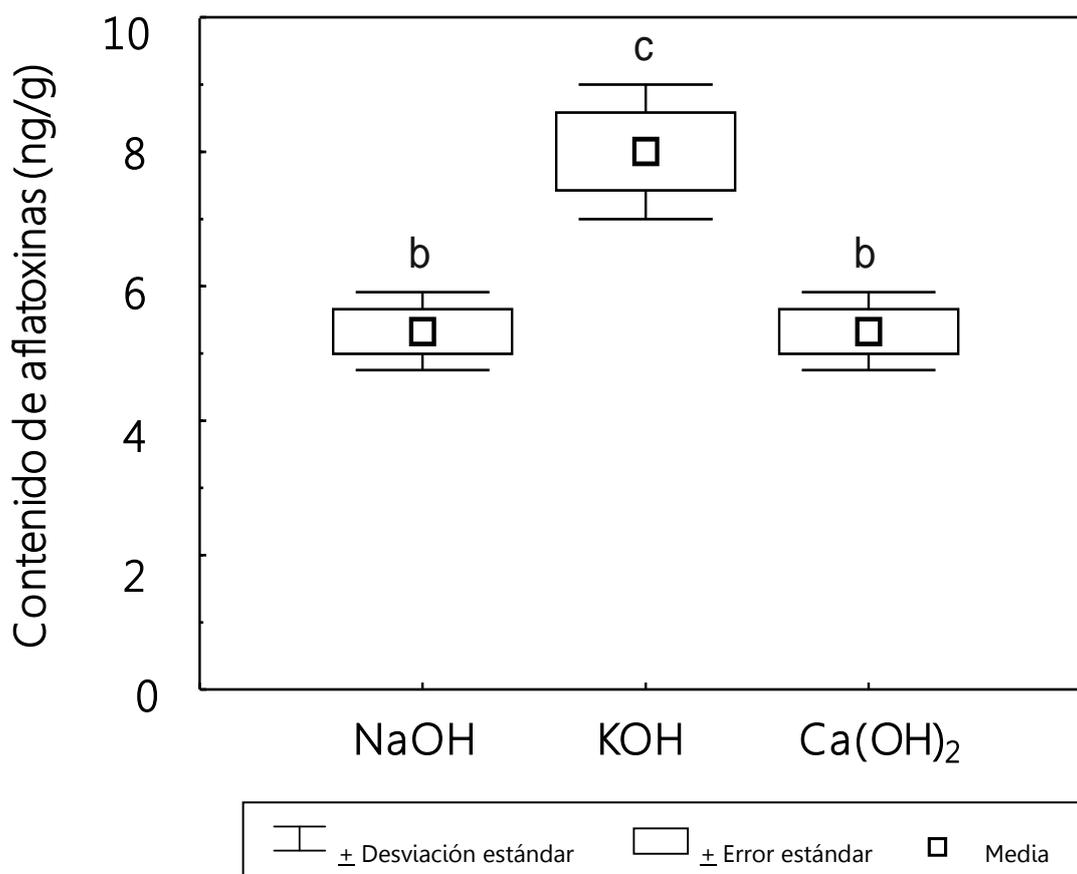


Como se puede observar, las condiciones del tratamiento térmico utilizadas (baño María a 85°C durante 1 h), no presentaron efecto sobre el contenido de aflatoxinas (Tabla 4.2), ya que para el caso de la muestra C3, se obtuvo un valor de 65.33 ± 1.52 ng/g, en comparación con las muestras únicamente contaminadas con aflatoxinas (C2), las cuales presentaron un valor de 63.99 ± 2.59 ng/g. En general, el tratamiento térmico sin adición de álcali, no presentó efecto significativo en la reducción del contenido de aflatoxinas en los licores de cacao. Lo anteriormente señalado, corresponde al hecho de que las aflatoxinas son termoestables (250°C), consecuentemente a la temperatura del tratamiento térmico (85°C), era de esperarse que no hubiese degradación alguna.

4.4. Aflatoxinas en el licor de cacao alcalinizado

4.4.1. Concentración de 1% (p/v) de agente alcalinizante

La Figura 4.2 muestra el efecto del hidróxido de sodio, hidróxido de calcio e hidróxido de potasio, empleados a una concentración de 1% (p/v) sobre la degradación de las aflatoxinas en el licor de cacao. A esta concentración, los tres tipos de agentes alcalinizantes presentaron un efecto significativo sobre el contenido de aflatoxinas en los licores de cacao contaminados con aflatoxinas. A esta concentración, el hidróxido de sodio y el hidróxido de calcio, no presentaron diferencia estadística significativa; ya que los licores de cacao tratados con estos químicos presentaron una concentración promedio de aflatoxinas de 5.3 ng/g. Sin embargo, para el caso del hidróxido de potasio, se observó diferencia estadística significativa, en este caso, las muestras presentaron una concentración de aflatoxinas de a 8 ng/g. En general, dos de los agentes alcalinizantes (hidróxido de sodio e hidróxido de calcio), redujeron el contenido de aflatoxinas en un 91.71%, estadísticamente diferente de lo obtenido con el hidróxido de potasio, con el cual las muestras redujeron su contenido de aflatoxinas en un 87.49%.



Cajas con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey >0.05)

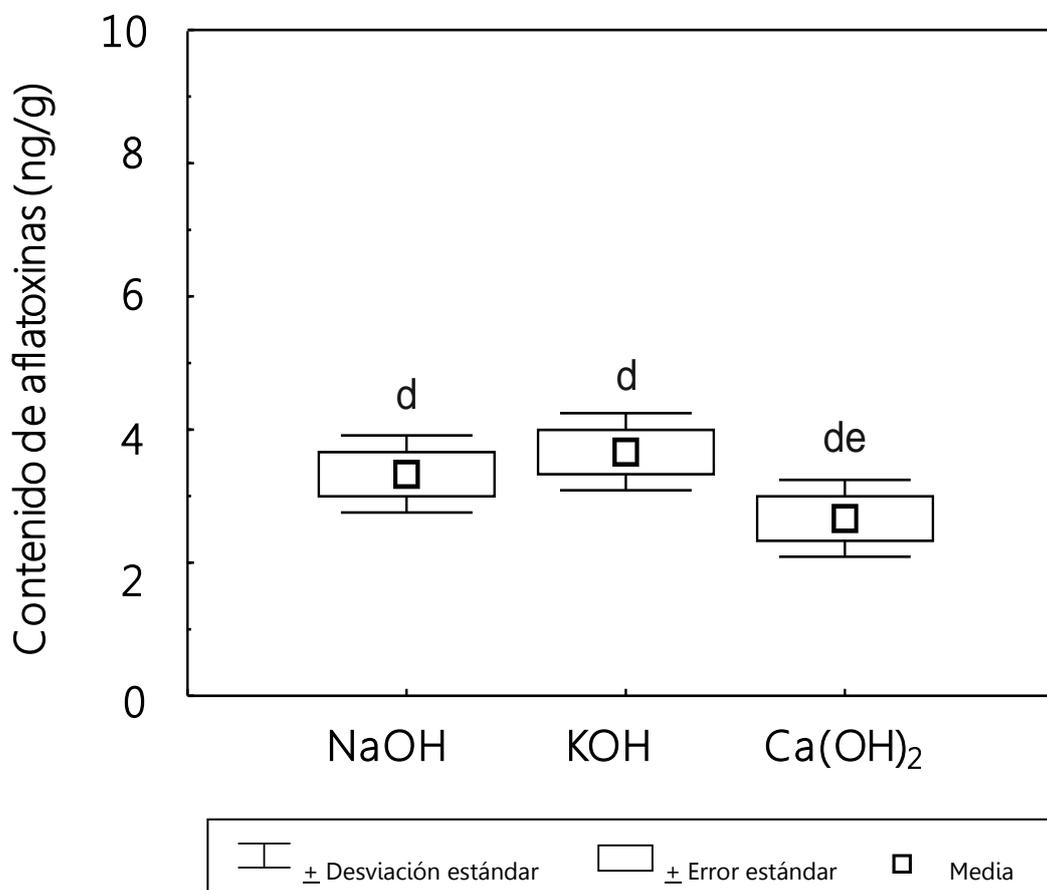
Figura 4.2. Efecto del tipo de álcali sobre el contenido de aflatoxinas en el licor de cacao tratado a una concentración de 1% (p/v)

4.4.2. Concentración de 2% (p/v) de agente alcalinizante

La Figura 4.3 muestra el efecto de los tres diferentes tipos de álcali a una concentración de 2% (p/v), sobre la degradación de las aflatoxinas en los licores de cacao contaminados. Las muestras tratadas a esta concentración, presentaron una ligera reducción en la concentración de aflatoxinas, en comparación con las muestras tratadas con la concentración de 1% (p/v). En general, el contenido promedio de aflatoxinas en estas muestras fue de 3.21 ng/g, y no se observó diferencia estadística significativa en cuanto al tipo de agente alcalinizante. Con estas condiciones (2% (p/v) de agente alcalinizante, 85°C durante 1 hora), el porcentaje de reducción de aflatoxinas totales fue de



94.99%, encontrándose que los tres químicos fueron igualmente efectivos en reducir el contenido de aflatoxinas durante la alcalinización de los licores de cacao

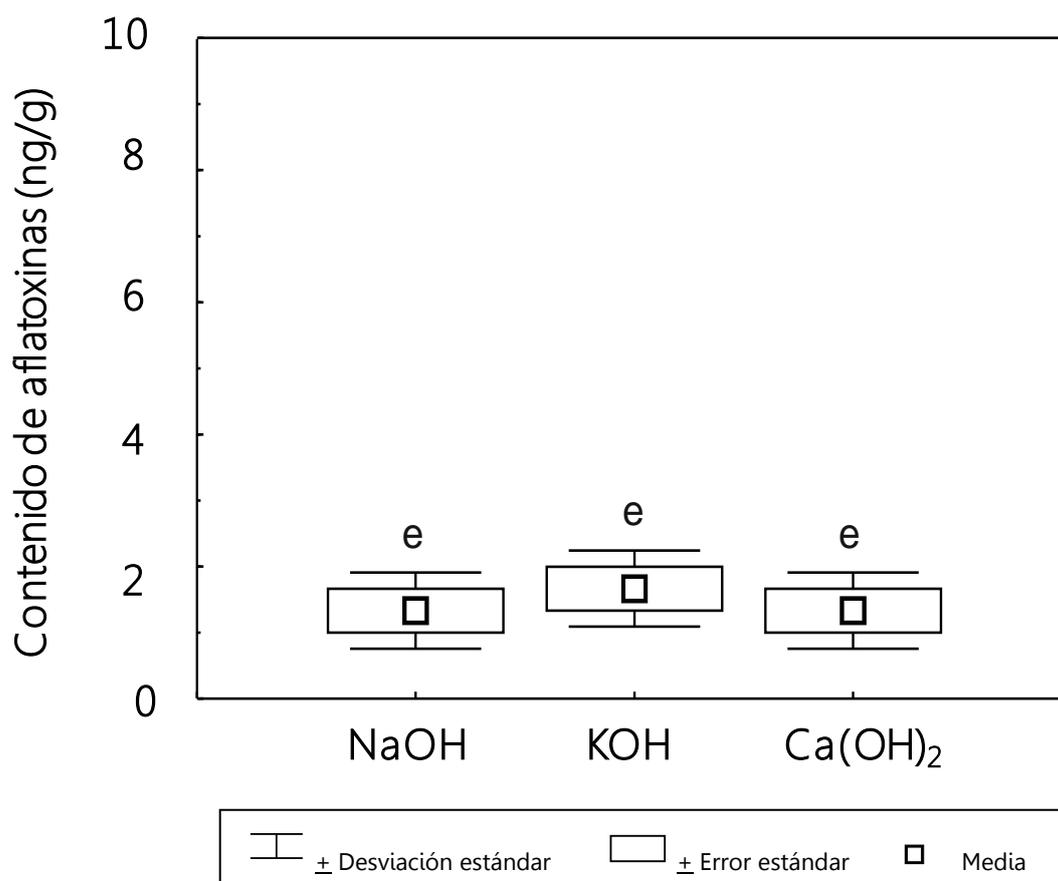


Cajas con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey >0.05)

Figura 4.3. Efecto del tipo de álcali sobre el contenido de aflatoxinas en licor de cacao tratado a una concentración de 2% (p/v)

4.4.3. Concentración de 3% (p/v) de agente alcalinizante

En la Figura 4.4 se muestra el comportamiento de los licores de cacao tratados con los agentes alcalinizantes a una concentración de 3% (p/v). Como puede observarse, el contenido de aflatoxinas fue menor a medida que se incrementó la concentración de agente alcalinizante. Para este caso en particular, las muestras de licor de cacao presentaron un contenido promedio de aflatoxinas de 1.44 ng/g, lo que corresponde a un 97.75% de degradación.



Cajas con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey >0.05)

Figura 4.4. Efecto del tipo de álcali sobre el contenido de aflatoxinas en el licor de cacao tratado a una concentración de 3% (p/v)

El primer paso en la degradación de las aflatoxinas durante el proceso de alcalinización es la apertura del anillo de lactona, produciendo una sal soluble en agua debido a una descarboxilación (Coomes *et al.*, 1966). En consecuencia, la fluorescencia de la aflatoxina, atribuida al anillo de lactona, desaparece en los tratamientos térmicos-alcalinos. Si el tratamiento térmico alcalino no es lo suficientemente severo, las aflatoxinas no son modificadas permanentemente, y bajo condiciones ácidas, el anillo de lactona podría cerrarse y por lo tanto reconvertirse a la estructura original fluorescente (Price y Jorgensen, 1985). En este contexto, los extractos alcohólicos provenientes de los licores de cacao contaminados fueron acidificados a un pH de 3, con el objetivo de simular las condiciones estomacales durante la digestión. Los resultados encontrados



señalan que no se incrementó la fluorescencia en estas muestras por efecto de acidificar los extractos, lo que sugiere que la degradación de las aflatoxinas durante el proceso de alcalinizado es efectiva. Por tal motivo, los datos correspondientes al contenido de aflatoxinas en las muestras acidificadas, no son presentados.

En resumen, los resultados señalan que los tres agentes alcalinizantes (hidróxido de sodio, hidróxido de calcio e hidróxido de potasio) pueden ser promisorios para ser utilizados en el proceso denominado "Dutching", obteniéndose buenos resultados en la reducción del contenido de aflatoxinas. Así, la inactivación química parece ser un método prometedor para la eliminación de las aflatoxinas en este tipo de productos alimenticios (Méndez-Albores *et al.*, 2005), aunado con la inactivación por mecanismos físicos, la cual se da en el proceso de tostado.

4.5 Propiedades fisicoquímicas de los licores de cacao

4.5.1 pH

La Tabla 4.3 muestra los efectos del tipo y la concentración de álcali en el nivel del pH de los licores de cacao no tratados y alcalinizados. En general, al incrementar la concentración de álcali, valores de pH más altos fueron observados. El licor natural presentó un valor promedio de pH de 5.52, estadísticamente igual al valor registrado para el caso de licor de cacao contaminado con aflatoxinas. Este valor es semejante con lo reportado en el licor de cacao proveniente de Ecuador (Luna *et al.*, 2002). Sin embargo, otros autores han reportado valores de pH en el rango de 5.0-5.4 para el licor de cacao de Venezuela (Rodríguez *et al.*, 2009). Estas diferencias podrían estar relacionadas con el origen del cacao, el sistema de poscosecha e incluso con las condiciones de procesamiento de los granos de cacao. En esta investigación, el valor de pH más alto fue el registrado en las muestras de licor de cacao tratadas con hidróxido de sodio a una concentración de 3% p/v (10.64), mientras que el



pH más bajo fue encontrado en muestras de licor de cacao alcalinizadas con hidróxido de potasio a 1% p/v (7.92).

Estos incrementos en el pH, se deben principalmente a la neutralización de ácidos libres, los cuales favorecen la formación de compuestos de oscurecimiento, debido a la deaminación parcial de las proteínas (Serra y Ventura, 2002). Este fenómeno puede ser también confirmado por el análisis de color, el cual demuestra que altas concentraciones de agentes alcalinizantes suelen producir un color más oscuro en los licores de cacao.

Tabla 4.3. Valores de pH en licores de cacao no tratados y alcalinizados

Muestra	pH
C1	5.52 + 0.006 a
C2	5.52 ± 0.005 a
C3	5.54 + 0.004 a
Na-1	8.71 + 0.005 b
Na-2	9.82 + 0.001 c
Na-3	10.64 + 0.010 d
K-1	7.92 + 0.005 e
K-2	8.82 + 0.004 f
K-3	9.77 + 0.049 g
Ca-1	8.33 + 0.050 h
Ca-2	9.18 + 0.051 i
Ca-3	10.09 + 0.006 j

Media de tres repeticiones ± error estándar

Medias con la misma letra en el misma columna no son significativamente diferentes (Tukey >0.05)
 C1=Licor de cacao natural; C2=Licor de cacao natural contaminado; C3=Licor de cacao natural contaminado con tratamiento térmico; Na-1, NaOH a 1%; Na-2, NaOH a 2%; Na-3, NaOH a 3%; K-1, KOH a 1%; K-2, KOH a 2%; K-3, KOH a 3%; Ca-1, Ca(OH)₂ a 1%; Ca-2, Ca(OH)₂ a 2%; Ca-3, Ca(OH)₂ a 3%.

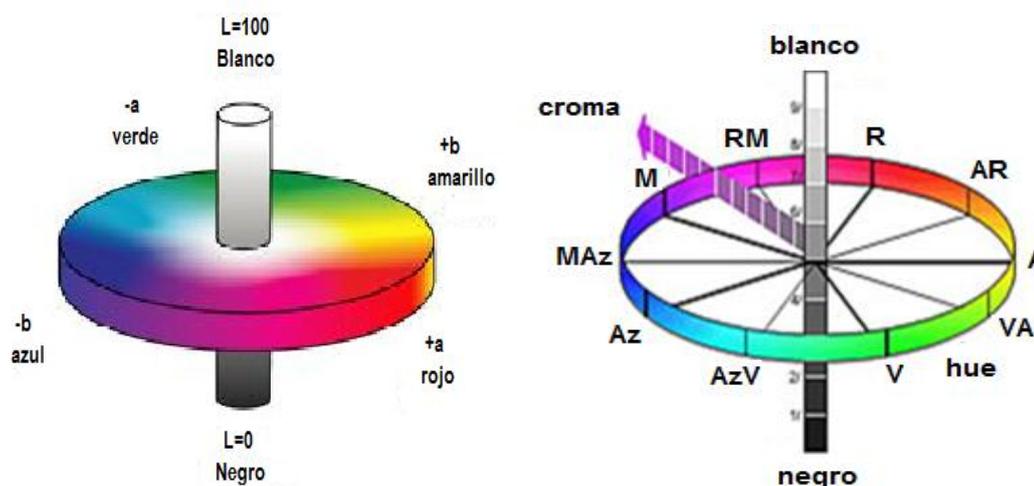
En la literatura científica, se ha reportado que un licor de cacao natural tiene un pH entre 5.3-5.8, mientras que los licores de cacao alcalinizados se pueden agrupar en tres categorías: ligeramente alcalinizados, los cuales presentan un pH entre 6.50-7.20; medianamente alcalinizados, los cuales presentan un pH entre 7.21-7.60 y fuertemente alcalinizados, con un pH superior a 7.61 (Kenneth *et al.*, 2008). Los resultados de esta investigación sugieren que los licores de cacao tratados con estos tres agentes alcalinizantes (hidróxido de sodio,



hidróxido de potasio e hidróxido de calcio), sufrieron un proceso de alcalinización severo, lo cual está fuertemente relacionado con los valores tan altos de pH observados (Tabla 4.3)

4.5.2. Color

Se puede definir el color en el sentido físico como la distribución de energía de una luz reflejada o transmitida por un alimento en particular (Alvarado y Aguilera, 2001). El color de los productos de cacao puede ser especificado a través de las coordenadas de color L^* , a^* , b^* . Donde L^* asume valores de 0 (negro) a 100 (blanco). Los ejes a^* , b^* no tienen límites numéricos específicos; valores positivos de a^* son de color rojo, y los negativos son de color verde; valores positivos de b^* son de color amarillo, y los valores negativos de b^* son de color azul. La saturación del color está definido por el valor de croma y la tonalidad por el valor de Hue, tal y como puede observarse en la Figura 4.5.



Fuente: Munsell, 1912

Figura 4.5. Esquematación de las coordenadas de color (L , a , b), saturación (croma) y tonalidad (Hue)

En esta investigación, ambos tratamientos (calor y alcalinización) afectaron significativamente el valor de L^* (Tabla 4.4). El licor natural presentó un valor promedio de L^* de 46.83, estadísticamente igual al valor observado para el caso del licor natural contaminado con aflatoxinas (46.90); sin embargo, este valor se



redujo debido al tratamiento térmico (41.92). En general, el tratamiento que produjo licores con un valor bajo de L^* , fue el de hidróxido de sodio e hidróxido de calcio a una concentración de 3% (p/v). En tanto, existe una relación inversa entre la concentración de álcali y la luminosidad de las muestras. Terink y Brandon (1984) alcalinizaron cacao con KOH a una concentración de 3.4% (p/v) y una temperatura de 75°C durante 4 horas en recipientes abiertos. Estos autores reportaron un valor de $L^* = 22.1$ para el cacao sin alcalinización, y de $L^* = 12$ para el cacao alcalinizado. En el presente trabajo, se observó una drástica reducción en el valor de L^* por efecto de la alcalinización; sin embargo, los valores de L^* fueron considerablemente mayores a los reportados por los autores antes mencionados. Estas diferencias, se deben probablemente al origen del cacao y a las condiciones de alcalinización, ya que el procedimiento térmico-alcálico se realizó en contenedores cerrados, minimizando así las pérdidas por evaporación.

Tabla 4.4. Datos de color en licores de cacao no tratados y alcalinizados

Muestra	Color			
	L^*	ΔE	Croma	Hue
C1	46.83 + 0.35 a	50.73 + 0.30 a	8.33 + 0.32 a	30.86 + 1.65 a
C2	46.90 ± 0.22 a	50.77 ± 0.26 a	8.39 ± 0.17 a	30.39 ± 1.11 a
C3	41.92 + 0.08 b	55.41 + 0.09 b	6.73 + 0.25 b	30.22 + 1.00 a
Na-1	36.82 + 0.41 c	60.34 + 0.39 c	4.02 + 0.33 c	5.91 + 0.90 b
Na-2	36.18 + 0.23 cd	60.89 + 0.23 cd	2.02 + 0.01 d	0.75 + 0.81 c
Na-3	35.81 + 0.36 d	61.25 + 0.36 d	1.80 + 0.04 d	3.19 + 1.22 b
K-1	41.36 + 0.31 b	56.13 + 0.28 b	8.33 + 0.31 a	34.77 + 0.39 d
K-2	36.89 + 0.03 c	60.26 + 0.02 cf	4.53 + 0.09 e	10.43 + 0.40 e
K-3	36.82 + 0.09 c	60.29 + 0.09 c	2.93 + 0.12 f	15.16 + 1.03 f
Ca-1	37.35 + 0.32 e	59.05 + 0.31 ef	5.23 + 0.19 g	24.59 + 0.64 g
Ca-2	36.06 + 0.15 d	61.02 + 0.15 d	2.99 + 0.05 f	4.51 + 2.82 b
Ca-3	35.99 + 0.23 cd	61.60 + 0.23 cdf	2.65 + 0.06 f	10.63 + 1.14 e

Media de tres repeticiones ± error estándar

Medias con la misma letra en el misma columna no son significativamente diferentes (Tukey >0.05)

C1=Licor de cacao natural; C2=Licor de cacao natural contaminado; C3=Licor de cacao natural contaminado con tratamiento térmico; Na-1, NaOH a 1%; Na-2, NaOH a 2%; Na-3, NaOH a 3%; K-1, KOH a 1%; K-2, KOH a 2%; K-3, KOH a 3%; Ca-1, Ca(OH)₂ a 1%; Ca-2, Ca(OH)₂ a 2%; Ca-3, Ca(OH)₂ a 3%.



Por otra parte, existió una diferencia notable entre el licor natural, licor natural con tratamiento térmico y licor alcalinizado con respecto a la diferencia total de color (ΔE). El licor natural presentó un ΔE promedio de 50.73, estadísticamente igual al observado para el caso del licor de cacao contaminado con aflatoxinas (50.77). Más aun, el tratamiento térmico afectó significativamente la diferencia total de color, por lo cual las muestras presentaron un valor de ΔE de 55.41. El valor máximo de ΔE se observó en las muestras tratadas con 3% (p/v) de NaOH, y en las tratadas con 2 y 3% (p/v) de $\text{Ca}(\text{OH})_2$. Como se muestra en la Tabla 4.4, los valores de ΔE se incrementaron a medida que se aumentó la concentración de agente alcalinizante. El ΔE es un valor que toma en cuenta la diferencia entre los valores de L^* , a^* y b^* de la muestra y de la referencia, y a menudo se utiliza para el control de la calidad. Los valores más altos de ΔE indican que existe gran diferencia entre la referencia y la muestra.

En la Tabla 4.4 también se muestran los valores del croma y del ángulo Hue para los licores de cacao no alcalinizados y para los tratados con álcali. El licor natural presentó un valor promedio de croma de 8.33, similar al registrado para el licor de cacao contaminado con aflatoxinas (8.39), lo cual indica que en este tipo de muestras el color es más "puro", considerando que el croma representa la "pureza" de un color. Por otra parte, en este trabajo, el tratamiento térmico, así como la alcalinización afectaron significativamente el valor del croma de los licores de cacao. A medida que se incrementó la concentración de álcali, se observaron valores más bajos de croma. Sin embargo, en el caso de las muestras tratadas con hidróxido de potasio a una concentración 1% (p/v), no se observaron diferencias estadísticas en comparación con el licor natural y el licor natural contaminado con aflatoxinas. Este efecto puede ser relacionado directamente con el grado de alcalinidad, ya que las muestras tratadas con este tipo de álcali, fueron las que presentaron los valores más bajos de pH (7.92).

Para el caso de los valores Hue, el tratamiento térmico no tuvo ningún efecto sobre este parámetro, las muestras de licor presentaron un valor promedio de 30.49. Sin embargo, el proceso de alcalinización afectó significativamente los



valores de Hue en los licores de cacao, lo que significó que el tratamiento acentuó el color rojo-marrón. La mayoría de los licores de cacao se encuentran en la zona de color rojo, tornándose más oscuros en función del incremento en la concentración de álcali. Silva *et al.* (2005) realizaron un tratamiento con licores de cacao empleando una solución de 47.8 g/kg (p/p) de K_2CO_3 a 108°C, durante un período de 54 min, obteniendo un color marrón más oscuro que los que se alcalinizaron con soluciones de 12.2 o 30 g/kg (p/p) de K_2CO_3 . Sin embargo, otras investigaciones han señalado que la reacción de generación de color no se desarrollará por debajo de una concentración de 10 g/kg (p/p), debido a la baja alcalinidad.

El color característico del licor de cacao se debe a la acción de la enzima polifenoloxidasas, la cual tiene una actividad óptima a un pH de 8 (Razzaque *et al.*, 2000). Esta enzima actúa oxidando compuestos polifenólicos, produciendo melanoidinas (pigmentos de color marrón), con la consecuente degradación y la reducción de las sustancias polifenólicas. A medida que se incrementa el pH, los compuestos fenólicos desarrollan un color marrón rojizo a negro. Cuanto más alto sea el pH, más oscuro es el licor de cacao; por lo tanto, el licor de cacao que ha sido alcalinizado ha reducido el amargor natural y mejorado su color, por lo que estos licores se tornan más oscuros. El cacao alcalinizado es utilizado en una gran variedad de productos alimenticios, mientras que el cacao con un valor de pH cercano a 8.5 (también llamado cacao oscuro), se utiliza a menudo como colorante (Minifie, 1989). Debido a su atractivo color, el cacao fuertemente alcalinizado es preferido como un ingrediente en los productos que implican un procesamiento ulterior (Silva *et al.*, 2005). Dado que el color y el sabor son los atributos del cacao que pueden ser considerablemente alterados por la concentración del álcali, es importante tomar en cuenta algunos factores como por ejemplo: los tiempos y la temperatura del proceso de alcalinización, las condiciones de secado, la humedad y la molienda, todo ello para obtener un licor de cacao alcalinizado con características fisicoquímicas deseables.



4.6. Análisis composicional de los licores de cacao alcalinizados

4.6.1. Humedad

En la Tabla 4.5, se muestran los valores del contenido de humedad del licor de cacao natural, el licor natural contaminado con aflatoxinas, el licor natural contaminado tratado térmicamente, y el licor contaminado con tratamiento térmico-alcalino (Dutching).

El tratamiento térmico (80°C, 1 h) no presentó efecto sobre el contenido de humedad del licor natural; éstas muestras presentaron un valor promedio de 3.31%. En este contexto, Rodríguez *et al*, (2009), reportaron valores en el contenido de humedad de 3.01% para licores naturales de cacao. Esta pequeña variación en el valor de contenido de humedad puede ser debida principalmente al tipo de variedad empleado, y sobre todo a las condiciones de procesamiento.

Por otra parte, el tratamiento con hidróxido de sodio no presentó un efecto significativo sobre el contenido de humedad en las muestras tratadas con éste agente alcalinizante, éstas muestras se registraron una humedad promedio de 3.46%. Sin embargo, las muestras tratadas con hidróxido de potasio e hidróxido de calcio, a las tres concentraciones evaluadas, presentaron una ligera reducción en el contenido de humedad, en estas muestras se registró un promedio de 2.64% (Tabla 4.5).

Este comportamiento, puede ser justificado en función de lo higroscópico que pueda ser el agente alcalinizante, ya que en las muestras tratadas con hidróxido de sodio la retención de humedad fue ligeramente mayor en comparación con las tratadas con hidróxido de potasio y calcio.



Tabla 4.5. Contenido de humedad en licores de cacao con y sin tratamiento térmico-alcalinizados

Muestra	Contenido de Humedad (%)
C1	3.27 ± 0.05 a
C2	3.29 ± 0.11 a
C3	3.36 ± 0.06 a
Na-1	3.48 ± 0.10 a
Na-2	3.42 ± 0.18 a
Na-3	3.49 ± 0.16 a
K-1	2.68 ± 0.07 b
K-2	2.61 ± 0.20 b
K-3	2.91 ± 0.19 b
Ca-1	2.47 ± 0.15 b
Ca-2	2.65 ± 0.13 b
Ca-3	2.51 ± 0.19 b

Media de tres repeticiones ± error estándar

Medias con la misma letra en el misma columna no son significativamente diferentes (Tukey >0.05)

C1=Licor de cacao natural; C2=Licor de cacao natural contaminado; C3=Licor de cacao natural contaminado con tratamiento térmico; Na-1, NaOH a 1%; Na-2, NaOH a 2%; Na-3, NaOH a 3%; K-1, KOH a 1%; K-2, KOH a 2%; K-3, KOH a 3%; Ca-1, Ca(OH)₂ a 1%; Ca-2, Ca(OH)₂ a 2%; Ca-3, Ca(OH)₂ a 3%.

4.6.2. Proteína

En cuanto al análisis del contenido de proteína, no se observó diferencia estadística significativa entre el licor natural, el licor natural contaminado con aflatoxinas y el licor contaminado tratado térmicamente, estas muestras presentaron un valor promedio de proteína cruda de 13.07%. Alvarado *et al*, (1983) reportaron valores del contenido de proteína de 13.98% y 14.22% para variedades de cacao (Arriba y EET-19) cultivadas en Ecuador. Rodriguez *et al*, (2009), reportan valores de proteína de entre 13.21-13.60% para licor de cacao natural y licor natural tratado térmicamente sin la adición de álcali. Otros autores (Axtemayer y Cook, 1942; Offem, 1990) han reportado contenidos más altos de proteína para algunas variedades de cacao Africano entre ellas el Amazon y el Trinitario, con valores de proteína de hasta 26.3%; sin embargo, los autores sugieren que estas variaciones podrían deberse a factores ambientales y ecológicos, pero sobre todo a diferencias genéticas.



Tabla 4.6. Contenido de proteína en licores de cacao no tratados y alcalinizados

Muestra	Proteína (%)
C1	13.09 + 0.02 a
C2	13.10 ± 0.03 a
C3	13.03 + 0.02 a
Na-1	12.16 + 0.06 b
Na-2	11.33 + 0.03 c
Na-3	9.56 + 0.05 d
K-1	12.14 + 0.03 b
K-2	11.29 + 0.08 c
K-3	9.52 + 0.08 d
Ca-1	12.14 + 0.04 b
Ca-2	10.39 + 0.09 e
Ca-3	9.56 + 0.05 d

Media de tres repeticiones ± error estándar

Medias con la misma letra en el misma columna no son significativamente diferentes (Tukey >0.05)

C1=Licor de cacao natural; C2=Licor de cacao natural contaminad ; C3=Licor de cacao natural contaminado con tratamiento térmico; Na-1, NaOH a 1%; Na-2, NaOH a 2%; Na-3, NaOH a 3%; K-1, KOH a 1%; K-2, KOH a 2%; K-3, KOH a 3%; Ca-1, Ca(OH)₂ a 1%; Ca-2, Ca(OH)₂ a 2%; Ca-3, Ca(OH)₂ a 3%.

En general, el tipo de agente alcalinizante y su concentración mostraron un efecto significativo sobre el contenido de proteína cruda, a medida que se incrementó la concentración de álcali, se registraron valores más bajos en el contenido de proteína (Tabla 4.6). Odunsi y Longe (1999) reportaron resultados similares a los aquí presentados, dichos autores argumentan que la disminución en el contenido de proteína se debe en gran parte a la destrucción oxidativa de las proteínas por deaminación.

4.6.3. Grasa

Resultados en la literatura confirman que la grasa es el principal componente en los granos de cacao. En la Tabla 4.7 se muestran los valores del contenido de grasa para los licores de cacao con y sin tratamiento alcalino. En general, no se observó diferencia estadística en el contenido de grasa del licor natural, el licor



natural contaminado y el licor natural contaminado tratado térmicamente, el promedio en el contenido de grasa fue de 53.47%. Estos valores del contenido de grasa son comparables a los reportados por Vivas (1979), quien hace referencia de diferentes cultivos y reporta valores de entre 42 a 53%. Del mismo modo, Liendo *et al.* (1998) reportaron valores del contenido de grasa para granos de cacao de entre 46.08 a 56.37%. Más aun, Luna *et al.* (2002), reportaron datos del contenido de grasa en el rango de 47.2-54.1% para granos de cacao cultivados en Ecuador de una variedad clon de EET-95 de Venezuela. Sin embargo, en las muestras tratadas con los agentes alcalinizantes, a medida que se incrementó la concentración de álcali, valores más bajos en el contenido de grasa fueron observados.

Mientras, las muestras tratadas con hidróxido de sodio al 3% (p/v), presentaron el valor más bajo en el contenido de grasa (37.64%), en comparación con el valor del licor natural (53.32%). De igual forma que en el contenido de proteína, se encontró una reducción proporcional en el contenido de grasa al incrementar la concentración de los tres diferentes agentes alcalinizantes. Reportes previos han señalado que la reducción en el contenido de grasa debido a la alcalinización de licores de cacao es debida a la hidrólisis y saponificación de los triglicéridos, con la consecuente formación de sales (Odunsi y Longe, 1998; 1999). Este hecho debe ser tomado en cuenta, ya que una excesiva adición de álcali puede generar un sabor jabonoso.

En esta investigación, debido a la naturaleza del licor de cacao, un análisis sensorial no se realizó (ya que las muestras contenían aflatoxinas); sin embargo, Rodríguez *et al.* (2009) no reportaron un sabor a jabón en licores de cacao tratados con bicarbonato de sodio, carbonato de sodio e hidróxido de sodio en concentraciones de hasta 3% (p/v).



Tabla 4.7. Contenido de grasa en licores de cacao no tratados y alcalinizados

Muestra	Grasa (%)
C1	53.32 + 0.29 a
C2	53.36 ± 0.15 a
C3	53.75 + 0.19 a
Na-1	50.61 + 1.20 b
Na-2	44.27 + 0.14 c
Na-3	37.64 + 0.32 d
K-1	52.47 + 0.26 e
K-2	50.63 + 0.30 b
K-3	48.62 + 0.27 f
Ca-1	52.37 + 0.29 e
Ca-2	45.48 + 0.24 c
Ca-3	40.49 + 0.19 g

Media de tres repeticiones ± error estándar

Medias con la misma letra en el misma columna no son significativamente diferentes (Tukey >0.05)

C1=Licor de cacao natural; C2=Licor de cacao natural contaminado; C3=Licor de cacao natural contaminado con tratamiento térmico; Na-1, NaOH a 1%; Na-2, NaOH a 2%; Na-3, NaOH a 3%; K-1, KOH a 1%; K-2, KOH a 2%; K-3, KOH a 3%; Ca-1, Ca(OH)₂ a 1%; Ca-2, Ca(OH)₂ a 2%; Ca-3, Ca(OH)₂ a 3%.



CONCLUSIONES

El proceso físico de tostado de los granos de cacao contaminados con aflatoxinas a niveles tan altos como 220.68 ng/g, resultó efectivo para degradar hasta un 71% del contenido inicial de aflatoxinas. Mientras que el proceso de alcalinización, y que se emplea en la industria del chocolate, resultó moderadamente efectivo para disminuir la concentración de aflatoxinas al tratar licores de cacao contaminados con niveles iniciales de 63.99 ng/g.

A la concentración de 1% (p/v), los agentes alcalinizantes NaOH e $\text{Ca}(\text{OH})_2$ resultaron mayormente efectivos en comparación con el KOH. Sin embargo, la degradación de aflatoxinas resultó mayor cuando éstos fueron probados a las concentraciones más altas (2 y 3% p/v).

El proceso de acidificación de los extractos, a un pH de 3 (similar al de la digestión), no produjo reformación de la estructura de la aflatoxina a su forma original fluorescente, por lo tanto, el proceso de alcalinización fue efectivo en reducir de manera permanente la concentración de aflatoxinas.

En lo que respecta a las propiedades fisicoquímicas (pH y color) de los licores de cacao, a medida que se incrementó la concentración de álcali, se observaron valores más altos en el pH, y respecto a la diferencia total de color (ΔE), los licores de cacao alcalinizados fuertemente registraron valores más altos en el ΔE , esto sugiere que existe una relación directa entre el pH y el color, consecuentemente el nivel de alcalinización dictará el color del licor de cacao.

En lo referente a la composición proximal (proteína y grasa) de los licores de cacao alcalinizados, a medida que se incrementó la concentración de álcali, valores más bajos en estos parámetros fueron registrados.

En general, el proceso de alcalinización de licores de cacao con hidróxido de sodio, hidróxido de potasio e hidróxido de calcio se encontró efectivo en: reducir el contenido de aflatoxinas por debajo de los límites permisibles para el consumo humano y al mismo tiempo producir licores de cacao con características tecnológicas (pH, color, proteína, grasa y humedad) deseables para la industria del chocolate.



RECOMENDACIONES

Es de importancia evaluar el efecto que otros tipos de agentes alcalinizantes débiles, como por ejemplo los carbonatos y los bicarbonatos pueden tener sobre el contenido de aflatoxinas al ser empleados durante el proceso de alcalinización (Dutching).

Se recomienda evaluar concentraciones más altas al emplear agentes alcalinizantes débiles, y determinar si estas concentraciones presentan un efecto significativo sobre el contenido de aflatoxinas, lógicamente sin llegar a comprometer las características tecnológicas de los licores de cacao.

Es necesario evaluar la efectividad de los agentes alcalinizantes fuertes utilizados en esta investigación, sobre el contenido de aflatoxinas en licores de cacao con una concentración de toxinas superior a 65 ng/g.

Se recomienda el uso de otra fuente de calentamiento como las microondas, como un método alternativo al tratamiento térmico (baño María), lo cual implicaría la posible reducción en los tiempos de procesamiento, para lograr efectivamente el proceso de alcalinizado (Dutching).

Finalmente, es necesario evaluar el efecto tanto del proceso físico (tostado), como del proceso químico (Dutching) sobre la toxicidad, mutagenicidad y carcinogenicidad de los sub-productos provenientes de la destoxificación.



REFERENCIAS

- AACC (American Association of Cereal Chemists). 2000.** Approved methods. 9ª ed. St. Paul, Minesota. AACC.
- Akabori, S. 1932.** Aminoacids and their derivatives. *Journal of Chemical Society Japan* 52, 606.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 2000.** Official Methods of Analysis Gaithersburg Md, USA.
- Alvarado, J.D., Aguilera, J.M. 2001.** Métodos para medir propiedades físicas en industrias de alimentos. Ed. Acribia, España. pp. 410.
- Alvarado, J.D., Villacis, F.E., Zamora, G.F. 1983.** Effect of harvest season on composition of raw and fermented cotyledons of two varieties of cocoa and shell fractions. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 33, 339-355.
- Asao, T., Buchi, G., Abbel-Kader, M.M., Chang, S.B., Wick, E.L., Wogan, G.N. 1963.** Aflatoxins B and G. *Journal of the American Chemical Society*. 87, 1076-1077.
- Aroyeun, S.O., Adegoke, G.O., Varga, J., Teren, J. 2009.** Reduction of aflatoxin B1 and ochratoxin A in cocoa beans infected with *Aspergillus* via ergosterol value. *World Review of Science Technology and Sustainable Development* 6, pp. 75-89.
- Axtmayer, J.H., Cook, D.H. 1942.** Composición química y valor nutritivo de los alimentos. *Oficina Latinoamericana Panamericana de Nutrición*. pp. 117-118. Washington, DC.
- Aviara, N.A., Gwandzang, M.I., Hague, M.A. 1999.** Physical properties of gunga seeds. *Journal of Agricultural Engineering Research*, 73, 105-111.
- Bart-Plange, Ato, Baryeh, A.E., 2002.** The physical properties of category B cocoa beans. *Journal of Food Engineering*. 60, 219-227.
- Beckett, S.T. 1988.** Industrial Chocolate Manufacture and Use. Blackie and Son Ltd., New York pp. 388.
- Beckett, S.T. 1994.** Fabricación y utilización industrial del chocolate. Traducido por Mariano González Alonso. Ed. Acribia, España. pp. 432.
- Beckett, T.S. 2002.** La ciencia del chocolate. Traducido por Dr. Antonio Vercet Tormo. Ed. Acribia, España. pp. 201.
- Betina, V. 1989.** Biological aspects of mycotoxins. Chap.3 Chemical, Biological and Environmental Aspects. N. Y., U.S.A. pp. 438.
- Bhat, R.V. 1989.** Risk to human health associated with consumption of groundnuts contaminated with aflatoxins. *In: Aflatoxin contamination of groundnut: Proceedings of the International Workshop 6-9 October, 1987, ICRISAT Center, Patancheru, India.* pp. 19-29.



- Bodine, A.B., Mertens, D.R. 1983.** Toxicology, metabolism, and physiological effects of aflatoxin in the bovine. *In: Aflatoxin and Aspergillus flavus in corn.* Diener, U.L., R. L. Asquith, and J. W. Dickens (Eds.). Alabama Agriculture Experimental Station., Auburn University, Alabama. pp. 46-50.
- Bradeau, J. 1970.** El cacao. Blume. Barcelona. pp. 297.
- Brook, P.J. White, E.P. 1966.** Fungus toxins affecting mammals. *Annual Review of Phytopathology.* 4, 171-194.
- Buchanan, R.L., Applebaum, R.S. Conway, P. 1978.** Effect of theobromine on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Journal of Food Safety.* 1, 211–216.
- Buchanan, R.L. Fletcher, A.M. 1978.** Methylxanthine inhibition of aflatoxin production. *Journal of Food Science.* 43, 654–655.
- Buchi, G. Rae, I.D. 1969.** The structure and chemistry of the aflatoxins. In: Aflatoxins. Goldblatt, L. A., Academic Press, New York. pp. 55.
- Bullerman, L.B. 1979** Significance of mycotoxins to food safety and human health. *Journal of Food Protection.* 42(1), 65-86.
- Camou-Arriola, J. P. Price, L. R. 1989.** Destruction of aflatoxin and reduction of mutagenicity of naturally contaminated corn during production of a corn snack. *Journal of Food Protection.* 52, 814-817.
- Castegnaro, M., Hunt, D.C., Sansone, E.B., Schuller, P.L., Siriwardana, M.G., Telling, G.M., van Egmond, H.P., Walter, E.A. 1980.** Laboratory decontamination and destruction of aflatoxins B₁, B₂, G₁, G₂ in laboratory wastes. *International Agency for Research on Cancer Monography* 37, 1-59.
- Coomes, T.J., Crowther, P.C., Fewell, A.J., Francis, B.J. 1966.** Experimental detoxification of groundnut meals containing aflatoxin. *Nature* 209, 406-407.
- Coppetti, M.V. 2011.** Aflatoxigenic fungi and aflatoxin in cocoa. *International Journal of Food Microbiology.* 148, 141-144.
- Coulombe, R.A. 1994.** Nonhepatic disposition and effects of aflatoxin B₁. Chap. 5. The Toxicology of Aflatoxins. D. L. Eaton and J. D. Groopman (Eds.). Academic Press, San Diego, U.S.A. pp. 89-101.
- Davis, W.D., Dickens, J.W., Freil, R.L., Hamilton, P.B., Shotwell, O.L., Wyllie, T.D., Fulkerson, J.F. 1980.** Protocols for surveys, sampling post-collection, handling and analysis of grain samples involved in mycotoxins problems. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists.* 63, 95-102.
- Deshpande, S.D., Bal, S., Ojha, T.P. 1993.** Physical properties of soybean. *Journal of Agricultural Engineering Research.* 56, 89–98.
- Diener, U.L., N.D. Davis. 1966.** Aflatoxin production by isolates of *Aspergillus flavus*. *Phytopathology.* 56, 1390-1393.



- Dvorackova, I. 1976.** Aflatoxin inhalation and alveolar cell carcinoma. *British Medical Journal*. 1, 691.
- Ellis, W.O., Smith, J.P., Simpson, B.K. Oldham, J.H. 1991.** Aflatoxins in food: Occurrence, Biosynthesis, Effects on Organisms, Detection and Methods of Control. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 30 (3), 403-439.
- Feibelman, T.P., Cotty, P.J., Doster, M.A., Michailides, T.J. 1998.** A morphologically distinct strain of *Aspergillus nomius*. *Mycologia*. 90, 618-623.
- Feuell, A.J. 1966.** Aflatoxin in groundnuts. IV. Problems of detoxification. *Tropical Science*, 8, 61-70.
- Fincke, H. 1965.** Handbuch der Kakaoerzeugnisse, Springer-Verlag, Berlin, New York. pp. 579.
- Foster, H. 1978.** What is chocolate flavor? Manufacturer Conference. 46. October.
- Gianola, C. 1986.** La industria del chocolate, bombones, caramelos y confitería. 3ª ed. Paraninfo, Madrid. pp. 278.
- Guthrie, L. D. 1979.** Effects of aflatoxin in corn on production and reproduction in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 62, 134-135.
- Hansen, J.T. 1990.** Affinity column clean-up and direct fluorescence measurement of aflatoxin M1 in raw milk. *Journal of Food Protection*. 53, 75-77.
- Hayes, T. M. 1981.** Mycotoxins and fetal development. Chap. 3. In: Mycotoxins Teratogenicity and Mutagenicity. CRS, Press, INC Boca Raton, FL. pp. 22-39.
- IARC (International Agency for Research on Cancer) 1987.** IARC Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans, Suppl.1. IARC, Lyon, France. pp. 82-87.
- ISTA (International Seed Testing Association) 1996.** International rules for seed testing. Rules 1996. *Seed Science and Technology* 24,1-335.
- Jay, J., 1994.** Microbiología moderna de los alimentos. Ed. Acribia. España. pp. 804.
- Kenneth, B.M., William J.H., Mark J. P., David A. S., Joan A., Daniel S., Sweigart., Boxin O. 2008.** Impact of alkalization on the antioxidant and flavanol content of comercial cocoa powders. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56, 8527-8533.
- Keyl, A.C., A.N. Booth. 1971.** Aflatoxin effects in livestock. *Journal of the American Oil Chemistry Society*. 48, 599-604.
- Kick, Roland S., Sawyer, Roland. 1991.** Pearson's composition and analysis of food. 9 edición, Longman Scientific and Technical, Signapore. pp. 708.
- Lenovich, L. M. 1981.** Effect of caffeine on aflatoxin production on cocoa beans. *Journal of Food Science*, 46, 655.



- Liendo, Rigel., C. Fanny., Padilla., Agricia Quintana. 1998.** Characterization of cacao butter extracted from Criollo cultivars of *Theobroma cacao* L. *Food Research International*. 30, 727-731.
- Lillehoj, E. B. 1983.** Effect of environmental and cultural factors on aflatoxin contamination of developing corn kernels. In *Aflatoxin and Aspergillus flavus in corn*, Southern Cooperative Series Bulletin 279 for Southern Regional Project S-132; Diener, U.L., Asquith, R.L., Dickens, J.W., (Eds.), Auburn University, Opelika AL.
- Loechler, E.L. 1994.** Mechanism by which aflatoxins and other bulky carcinogens induce mutations. Chap. 8. In: *The Toxicology of Aflatoxins*, D. L. Eaton and J. D. Groopman (Eds.). Academic Press INC. San Diego, CA. pp. 149-178.
- Luna, F., Cruzillat, D., Cirou, L., Bucheli, P. 2002.** Chemical composition and flavor of Ecuadorian cocoa liquor. *Journal of Food Chemistry*. 50, 3527-3532.
- Méndez-Albores, A., De Jesús-Flores, F., Castañeda-Roldan, E., Arámbula-Villa, G., Moreno-Martínez, E. (2004)** The effect of toasting and boiling on the fate of B-aflatoxins during pinole preparation. *Journal of Food Engineering*. 65, 585-589.
- Méndez-Albores, A., Arámbula-Villa, G., Loarca-Piña, M.G.F., Castaño-Tostado, E., Moreno-Martínez, E. 2005.** Safety and efficacy evaluation of aqueous citric to degrade B-aflatoxins in maize. *Food and Chemical Toxicology*. 43, 233-238.
- Miller, D.M., Wilson, D.M. 1994.** Veterinary diseases related to aflatoxins. Chap. 16, In: *The Toxicology of Aflatoxins*, D. L. Eaton and J. D. Groopman (Eds.). Academic Press INC. San Diego, CA. pp. 347-364.
- Minifie, B.W. 1989.** Chocolate, cocoa and confectionery: Science and Technology. Chapman & Hall, New York, pp. 904.
- Moreno-Martínez, E. 1996.** El maíz y las aflatoxinas en: La industria de la masa y la tortilla: desarrollo y tecnología. Torres, F., Chong, I y Quintanilla J. PUAL-UNAM. pp. 139-145.
- Moreno, M. E., M. V. Badillo., F. F. Parra. 2000.** Use of propionic acid salts to inhibit aflatoxin production in stored grains of maize. *Agrociencia*. 34, 477-484.
- Moreno-Martínez E. 1984.** Análisis físico y biológico de semillas agrícolas. 1ª ed. Instituto de Biología, UNAM, pp. 383.
- Morris, D. 1882.** Cacao. How to grow and how to cure it. Jamaica. pp.1-45.
- Müller, H. M. 1984.** A survey of methods of decontaminating mycotoxins. *Animal Research and Development* 19, 7-37.
- Munsell, A. H. 1912.** A Pigment Color System and Notation. *The American Journal of Psychology* (University of Illinois Press) 23 (2): 236-244



- Norma Oficial Mexicana NOM-186-SSA1/SCFI 2002.** Productos y servicios. Cacao, productos y derivados. I Cacao. II Chocolate. III Derivados. Especificaciones sanitarias. Denominación comercial. Diario Oficial de la Federación.
- Odunsi, A., Longe, O. 1998.** Nutritive value of hot water- or cocoa-pod ash solution-treated cocoa bean cake for broiler chicks. *British Poultry Science*. 39, 519-525.
- Odunsi, A., Longe, O. 1999.** Effect of alkali or hot water treatment of cocoa bean cake fed to broiler finishers as partial replacement for dietary groundnut cake. *Archivos de Zootecnia*. 48, 337-342.
- Offem, J.O. 1990.** Individual variation in the aminoacid and chemical composition of defatted cocoa meal of three varieties of cocoa (*Theobroma cacao*) from south-eastern Nigeria. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 52, 129-135.
- Parker, A. W., Melnick, D. 1966.** Absence of aflatoxin refined vegetable oils. *Journal of the American oil Chemist's Society*. 43, 635-638.
- Price, R.L., Jorgensen, K.V. 1985.** Effects of processing on aflatoxin levels and on mutagenic potential of tortillas made from naturally contaminated corn. *Journal of Food Science*. 50, 347-357.
- Razzaque, M.A., Saud, Z.A., Absar, N., Karin, M.R., Hashinaga, F. 2000.** Purification and characterization of polyphenoloxidase from guava infected with fruit-rot disease. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 3, 407-410.
- Restaino, L., Myron, J.J.J., Lenovich, L.M., Bills, S., Tscherneff K. 1984.** Antimicrobial effects of ionizing radiation on artificially and naturally contaminated cacao beans. *Applied and Environmental Microbiology*. 47(4), 886-887.
- Rodríguez, P., Pérez, E., Guzmán, R. 2009.** Effect of the types and concentrations of alkali on the color of cocoa liquor. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 89, 1186-1194.
- Roebuck, B.D., Maxuitenko, Y.Y. 1994.** Biochemical mechanisms and biological implications of the toxicity of aflatoxins as related to aflatoxin carcinogenesis. Chap 2, in: The toxicology of aflatoxins, D.L. Eaton y J.D. Groopman (Eds.). Academic Press, San Diego. pp. 27-43.
- Rohan, T. A., Stewart, T. 1966.** The precursors of chocolate aroma. Changes in the sugars during the roasting of cocoa beans. *Journal of Food Science*. London. 31,202-205.
- SAGARPA 2010.** Secretaria de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación. <http://www.sagarpa.gob.mx/saladeprensa/boletines2/Paginas/2010-B115.aspx> consultada el día 10 de mayo del 2011.
- Sargeant, K., Sheridan, A., Kelly J. O., Carnaghan, R.B.A. 1961.** Toxicity associated with certain samples of ground nuts. *Nature* 192, 1096-1097.



- Sánchez-Hervás, M., Gil, J.V., Bisbal, F., Ramón, D., Martínez-Culebras, P.V. 2008.** Mycobiota and mycotoxin producing fungi from cocoa beans. *International Journal of Food Microbiology*. 125, 336-340.
- SAS 1998.** Introductory guide for personal computers. 6.12 Ed. Cary, NC: SAS Institute.
- Serra, J., Ventura, F. 2002.** Factors affecting the formation of alkylpyrazines during roasting treatment in natural and alkalized cocoa powder. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50, 3743-3750.
- Shepherd, H., Bhardwaj, R.K. 1986.** Moisture-dependent physical properties of pigeon pea. *Journal of Agricultural Engineering Research*, 35, 227-234.
- Silva, B., Pupo, V., Radomille, L., Yotsuyanagi, K. 2005.** Perfil sensorial de p'ó de cacao (*Theobroma cacao* L.) alcalinizado. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*. 25, 375-381.
- Smith E.E., Phillips T.D., Ellis J.A., Harvey R.B., Kubena L.F., Thompson J., Newton G. 1994.** Dietary hydrated sodium calcium aluminosilicate reduction of aflatoxins M₁ residue in dairy goat milk and effects on milk production and components. *Journal of Animal Science*. 72, 677-682
- Soliman, K.M. 2002.** Incidence, level, and behavior of aflatoxins during coffee bean roasting and decaffeination. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50, 7477-7481.
- Soriano del Castillo, J.M., 2007.** Micotoxinas en alimentos. Ediciones Díaz de Santos, España. pp. 424.
- Terink, J.L., Brandon, M.J. 1984.** Alkalized cocoa powders and foodstuffs containing such powders. US Patent 4435436.
- Tung, H.T., Cook, F. W., Wyatt, R.D., Hamilton, P.B. 1975.** The anemia caused by aflatoxin. *Poultry Science*. 54, 1962-1969.
- Vicam 2000.** Aflatest Instruction Manual. Watertown, MA. U.S.A.
- Visvanathan, R., Palanisamy, P.T., Gothandapani, P.T., Sreenarayanan, V.V. 1996.** Physical properties of neem nut. *Journal of Agricultural Engineering Research*. 63, 19-26.
- Vivas, J. 1979.** Estudio de algunas características químicas y físicas en almendras de cacao venezolano. Séptima Conferencia Internacional de Investigaciones en Cacao. Duala Cameroon. pp. 611-615
- Weidenbörner, M. 2007.** Mycotoxins in Feedstuffs. Springer-Verlag, New York Inc.
- Whitaker, T.B., Dickens, J.W., Wiser, E.H., Monroe, R.J. 1981.** Sampling Techniques. In: Food Analysis: Principles and Techniques. D.W. Gruenwedel y J.R. Whitaker (Eds.), Marcel Dekker, New York.
- Wogan, G. E., Newberne, P. M. 1967.** Dose-response characteristics of aflatoxin B₁ carcinogenesis in the rat. *Cancer Research*, 27, 543-548.