

Higiene y Sanidad Ambiental, 20 (1): 1841-1845 (2020)

Análisis de aflatoxina B1 en chocolate y derivados. Efecto de la vigilancia de abril de 2014 a diciembre de 2017

ANALYSIS OF AFLATOXIN B1 IN CHOCOLATE AND DERIVATIVES. EFFECT OF SURVEILLANCE FROM APRIL 2014 TO DECEMBER 2017

I. HERNÁNDEZ GARCIARENA,¹ R. GARCÍA BALUJA,¹ A. M. JORDÁN QUINTÁNS,¹ Y. SÁNCHEZ AZAHARES,¹ M. CARDONA GÁLVEZ,¹ A. VIVAR PEREZ,²

¹ Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología (INHEM), La Habana, Cuba.

² Instituto de Investigaciones para la Industria Alimentaria (IIIA), La Habana, Cuba.

Correspondencia: Iván Hernández Garciarena. Correo-e: ivan@inhem.sld.cu

RESUMEN

Introducción: El chocolate amargo, también llamado chocolate negro o puro posee innumerables beneficios entre los que se encuentran: mejorar la circulación sanguínea, prevenir el cáncer, y hace bien al corazón porque promueve un flujo adecuado de sangre debido a que posee potentes antioxidantes pertenecientes al grupo de los flavonoides. *Objetivo:* Reportar los posibles valores de aflatoxina B1 que pudiera estar contenida en las muestras de chocolate recibidas en nuestros laboratorios. *Material y métodos:* Se analizaron 279 muestras de chocolate y derivados entre los años 2014 al 2017, se realizó un estudio descriptivo transversal para la cuantificación de aflatoxina B1 en las muestras llegadas a nuestro laboratorio que provenían de los departamentos de Registro Sanitario e Higiene e Inocuidad de los Alimentos, utilizando el método propuesto por Barbas et al. *Resultados:* Se presentan las variedades de chocolates recibidas en el laboratorio exponiéndose los niveles de aflatoxinas encontrados durante el periodo de estudio. *Conclusiones:* Se encontró un valor máximo de 1.84 µg/kg y un valor mínimo de 0.04 µg/kg en las muestras de chocolate coincidiendo este resultado con el de otros autores.

Palabras clave: Chocolate, aflatoxina, HPLC.

ABSTRACT

Introduction: Bitter chocolate, also called dark or pure chocolate has innumerable benefits among those found: improve blood circulation, prevent cancer, and does the heart good because it promotes an adequate blood flow because it has powerful antioxidants belonging to the Flavonoid group. *Objective:* To report the possible values of aflatoxin B1 that could be contained in the chocolate samples received in our laboratories. *Materials and methods:* 279 samples of chocolate and derivatives were analyzed between 2014 and 2017, a cross-sectional descriptive study for the quantification of aflatoxin B1 was carried out in the samples arrived at our laboratory that came from the Sanitary and Hygiene and Safety Registry Departments of Food, using the method proposed by Barbas et al. *Results:* The varieties of chocolates received in the laboratory are presented, exposing the aflatoxin levels found during the study period. *Conclusions:* A maximum value of 1.84 µg / kg and a minimum value of 0.04 µg / kg were found in the chocolate samples coinciding with this result with that of other authors.

Keywords: Chocolate, aflatoxin, HPLC.

INTRODUCCIÓN

El chocolate comúnmente viene en tres variedades: negro, blanco y con leche, con el cacao en polvo contribuyendo a su coloración marrón.⁽¹⁾ El chocolate (en náhuatl: xocolātl),⁽²⁾ es el alimento que se obtiene mezclando azúcar con dos productos derivados de la manipulación de las semillas del cacao: la masa del cacao y la manteca de cacao (el famoso gastrónomo francés J. A. Brillat-Savarin definía en 1826 el chocolate de la siguiente manera: Se ha convenido en dar el nombre de chocolate a la mezcla compuesta de la semilla del árbol del cacao tostada, con azúcar y canela; tal es la definición clásica del chocolate. El azúcar forma parte integrante, porque con cacao sólo resulta únicamente pasta de cacao y no chocolate).^(3,4)

Uno de los beneficios del chocolate es proporcionar energía al organismo porque contiene altas calorías, pero existen diferentes tipos de chocolates que tienen composiciones muy diferentes y por esto, sus beneficios para la salud también son muy distintos, treinta gramos de chocolate contiene en promedio 120 calorías. Para que estas calorías no se conviertan en grasas acumuladas, lo ideal es comer el chocolate en el desayuno o máximo como postre después del almuerzo.⁽⁵⁾

El chocolate amargo, también llamado chocolate negro o puro posee innumerables beneficios entre los que se encuentran: mejorar la circulación sanguínea, prevenir el cáncer, y hace bien al corazón porque promueve un flujo adecuado de sangre debido a que posee potentes antioxidantes pertenecientes al grupo de los flavonoides, estimula el sistema nervioso central y a los músculos cardíacos, ya que posee teobromina, da sensación de bienestar, ya que estimula la hormona serotonina mejorando el humor y aliviando el estrés; ayuda a disminuir la presión arterial y a mejorar la circulación sanguínea debido a que produce óxido nítrico; aumenta el colesterol bueno HDL y disminuye el colesterol malo LDL, ayudando también a evitar la formación de placas de aterosclerosis en las arterias, mejorar la función cerebral, debido a que aumenta el flujo sanguíneo al cerebro por contener sustancias estimulantes como la cafeína y la teobromina, ayudando a prevenir enfermedades como el Alzheimer; protege la piel contra el sol y los daños producidos por los rayos UV gracias a sus compuestos bioactivos como los flavonoides; aumenta la sensación de saciedad por lo que es excelente para el control del peso, siempre que sea consumido con moderación; para obtener todas las propiedades del chocolate amargo basta comer un cuadrado de chocolate amargo o medio amargo, que es aproximadamente 6 g por día.⁽⁵⁾

Las micotoxinas, compuestos altamente tóxicos, son el resultado del metabolismo secundario de ciertos hongos, antes de la cosecha o durante la postcosecha en condiciones favorables para la multiplicación fúngica y la producción de micotoxinas,⁽⁶⁾ entre las que destacan factores físicos tales como humedad

y agua disponible, temperatura, zonas de microflora (pequeñas zonas del alimento con alto contenido de humedad) e integridad física del grano o del alimento y factores químicos: composición del sustrato, pH, nutrientes minerales y disponibilidad de oxígeno.⁽⁷⁾

Un estudio de co-ocurrencia de ocratoxina A y aflatoxinas en el chocolate que se comercializa en Brasil, publicado en la revista *Food Control*, evaluó las micotoxinas (ocratoxina A y aflatoxinas) en 125 muestras de chocolate en polvo, de leche, amargo, y blanco de los supermercados en Brasil. Según los autores, raramente se ha reportado la presencia de aflatoxinas en el chocolate. Sin embargo, encontraron aflatoxinas en el 80% de todos los chocolates examinados.⁽⁸⁾ Este hecho nos llevó a nuestro objetivo de trabajo, que fue el de reportar los posibles valores de aflatoxina B1 que pudiera estar contenida en las muestras de chocolate recibidas en nuestros laboratorios.

MATERIAL Y MÉTODOS

Entre los años 2014 y 2017 se analizaron 279 muestras de chocolate en el Laboratorio de Micotoxinas del Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología, debido al programa de vigilancia alimentaria que nuestro país desarrolla. Las muestras provenían de los departamentos de Registro Sanitario e Higiene e Inocuidad de los Alimentos, para el análisis se utilizó el método de extracción propuesto por Barbas et al.,⁽⁹⁾ además de utilizarse la metodología propuesta por AflaStar™ Immunoaffinity Columns para la purificación de aflatoxinas utilizando HPLC, que se fundamenta sobre la base de la extracción de la micotoxina con metanol o acetonitrilo. La muestra es molida en molino de granos con un tamiz de tamaño de poro de 2 mm, luego se agita por 45 minutos y se centrifuga a 3000 rpm durante 20 minutos a 4 °C. A continuación se coloca la columna multifuncional o de inmuno afinidad; (las columnas utilizadas eran de la firma Grace Davison Discovery Sciences) en el adaptador del manifold para extracción en fase sólida, donde el flujo no debe exceder las tres gotas por minuto. Luego se coloca un recipiente adecuado (frasco corazón) debajo de la columna y se eluye el eluato con 1 a 3 ml de metanol en pequeñas porciones, esta solución es llevada a sequedad con corriente de nitrógeno a 40 °C, después se reconstituye con fase móvil y ya está preparada para ser inyectada en el equipo HPLC.⁽⁹⁾

Condiciones del análisis cromatográfico:

Fase Móvil: Acetonitrilo – metanol – agua (90:90:400)

Flujo: 0.8 mL /min

Temperatura: 40 °C

Detector UV: $\lambda=365$ nm

Columna de fase reversa: RP-18 Lichrospher (12,5 cm × 4,5 mmØ × 5m).

Tabla 1. Muestras y tipo de muestras recibidas por año.

| | 2014 | 2015 | 2016 | 2017 |
|------------------------------------|------|------|------|------|
| Granillo de chocolate | 1 | | | |
| Cacao desnatado | 1 | | | |
| Tableta de chocolate | | 2 | 20 | 18 |
| Bombones | | 4 | 59 | 40 |
| Cacao | | 1 | 12 | 3 |
| Chocolate a la taza | | 2 | | |
| Dulce con leche sabor chocolate | | 1 | | |
| Chocolate con leche | | 4 | | |
| Creps al cacao | | 1 | | |
| Barquillas al cacao | | 1 | 1 | |
| Desayuno chocolate | | | 2 | |
| Cobertura de chocolate | | | 9 | 3 |
| Chocolate en trozos | | | 1 | |
| Chocolate con leche | | 5 | 7 | 5 |
| Pasta de chocolate | | | 5 | 2 |
| Chocolate en polvo | | | 13 | |
| Cobertura manteca de cacao | | | 2 | |
| Chocolate | | | 11 | 15 |
| Galleta de chocolate | | | 3 | 4 |
| Africanas | | | 1 | |
| Chocolito | | | 1 | |
| Gotas de cobertura | | | 1 | 1 |
| Mezcla de chocolate para batido | | | 1 | |
| Chocolatin | | | 1 | 10 |
| Natilla sabor chocolate | | | | 1 |
| Cereal de chocolate | | | | 3 |
| Leche semidescremada con chocolate | | | | 1 |

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 1 se aprecia las cantidades y las variedades de bombones y los diferentes tipos de chocolate recibidas por año, como bien se ve, las entradas no son uniformes, o sea, no entra al laboratorio la misma cantidad de muestras ni la misma variedad de chocolate por año, además de que tampoco es así por meses, puede observarse que en el año 2014 solo entraron dos muestras al laboratorio, una de granillo de chocolate y la otra de cacao desnatado y ambas arrojaron resultados positivos en el análisis. Obsérvese también que los bombones, las tabletas de chocolate y el chocolate son las que aportaron la mayor cantidad de muestras para el análisis durante el período de estudio.

También se observa que en el 2014 se analizaron solo dos muestras y estas dieron negativa a la presencia de aflatoxina B1, para un 100 % de negatividad, en el 2015 se analizaron 21 muestras y dos estaban contaminadas para un 90.5 % de negatividad, con

valores por debajo de los LMR establecidos en las normas cubanas e internacionales.^(10, 11) En el 2016 entraron al laboratorio 150 muestras de chocolate y al terminar el análisis, 11 mostraron niveles de aflatoxina B1 y aunque se encontraban dentro de los LMR que establecen las normas cubanas e internacionales, la negatividad fue de 92.66 %; en el 2017, solo 107 muestras llegaron a nuestro laboratorio para ser analizadas y 25 mostraron valores de aflatoxina B1 representando un 76.6 % de muestras con ausencia de aflatoxina B1. Un estudio realizado en Cuenca por el método de ELISA y analizando ocratoxina mostró que sólo el 1.15 % de las muestras analizadas registró ausencia de micotoxina, el 13.8 % se encontraba dentro del límite máximo permitido y el 85.1 % se encontraba fuera de la norma.⁽¹²⁾

En la Tabla 2 se muestran los resultados de los análisis durante el período de estudio, junto con las muestras que resultaron estar contaminadas. En el 2014 no hubo muestras con resultados positivos, en el 2015 solo dos muestras mostraron resultados positivos, una con 0.94 µg/kg y la otra con 0.78 µg/kg, en el 2016, 11 muestras mostraron niveles de contaminación con aflatoxina que se encontraban dentro de los LMR establecidos por la legislación vigente.^(10,11)

En el año 2011, un estudio realizado en la ciudad de Guayaquil acerca de la presencia de micotoxinas en los alimentos de consumo popular concluyó que la contaminación de los alimentos por aflatoxina era del 54%, por vomitoxina del 60%, por zearolenona del 59%, por toxina T-2 del 60% y por ocratoxina del 45%, generando en los pacientes estudiados descompensaciones hemodinámicas y hasta muerte por fallo respiratorio.⁽¹²⁾

Un estudio de dieta total realizado en Panamá en el periodo 2012-2015 no encontró aflatoxina B1 en ninguno de los 79 alimentos seleccionados para el estudio. La aflatoxina B está clasificada por la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer como carcinógeno del Grupo I, con propiedades mutagénicas y teratogénicas.⁽¹³⁾ En nuestro estudio detectamos que el 13.62 % de las muestras analizadas presentaron contaminación con aflatoxina B1.

La Tabla 3 muestra el número de muestras contaminadas por año, la media, la desviación estándar, el error típico de la media el máximo y el mínimo. Se aprecia que el valor máximo se logró en el año 2017 con 1.84 µg/kg y el mínimo también se alcanzó en este año con 0.04 µg/kg.

Tabla 2. Muestras contaminadas por año.

| | 2014 | 2015 | 2016 | 2017 |
|---|------|------|------|------|
| Chocolate a la taza de diferentes tipos | | 0,78 | | |
| Chocolate a la taza de diferentes tipos | | 0,94 | | |
| Tableta chocolate artesanales | | | 0,12 | |
| Bombon turquino café con leche | | | 0,09 | |
| Tabletas macisas chocolate con leche | | | 0,21 | |
| Chocolate con leche, diferentes tipos | | | 0,11 | |
| Tabletas de chocolate amargo leche y avellana | | | 0,19 | |
| Tabletas de chocolate amargo leche y almendra | | | 0,27 | |
| Tabletas macizas de chocolate amargo con almendra | | | 0,19 | 0,61 |
| Chocolate con leche con caramelo | | | 0,37 | |
| Bombón roca amarga | | | 0,08 | |
| Cacao soluble | | | 0,65 | |
| Preparado en pasta para helado | | | 0,24 | |
| Bombon relleno cesta de café | | | | 1,16 |
| Galletas dulces con chocolate blanco | | | | 0,27 |
| Bombón cortado jaguey mandarinana | | | | 0,67 |
| Bombón relleno hierba buena | | | | 0,58 |
| Bombón tipo trufa trufa avellana | | | | 1,05 |
| Bombón tipo trufa delicia romero | | | | 0,55 |
| Bombón relleno hierba buena | | | | 0,98 |
| Tableta chocolate con leche | | | | 1,02 |
| Tableta chocolate amargo | | | | 0,12 |
| Bombón relleno sierra maestra | | | | 0,63 |
| Chocolate con pepitas de cacao | | | | 0,72 |
| Chocolate con piel de naranja | | | | 0,59 |
| Chocolate amargo | | | | 1,84 |
| Chocolate blanco | | | | 0,44 |
| Chocolatin | | | | 0,04 |
| Chocolatin | | | | 1,43 |
| Chocolatin | | | | 1,55 |
| Chocolatin | | | | 0,69 |
| Chocolatin | | | | 0,77 |
| Chocolatin | | | | 0,31 |
| Chocolatin | | | | 0,63 |
| Chocolatin | | | | 0,24 |
| Tableta de chocolate amargo | | | | 0,81 |
| Crema de cacao y avellana | | | | 1,00 |

Tabla 3. Valores medios, máximos y mínimos de las muestras contaminadas por año.

| | 2014 | 2015 | 2016 | 2017 |
|-----------------------|------|------|------|------|
| Muestras contaminadas | | 2 | 11 | 25 |
| Media | | 0,86 | 0,22 | 0,75 |
| Desviación estándar | | 0,11 | 0,16 | 0,44 |
| Error típico | | 0,08 | 0,04 | 0,09 |
| Máximo | | 0,94 | 0,65 | 1,84 |
| Mínimo | | 0,78 | 0,08 | 0,04 |

CONCLUSIONES

Se encontró un valor máximo de aflatoxina de 1.84 µg/kg y un valor mínimo de 0.04 µg/kg durante el período de estudio.

Los valores de aflatoxinas hallados se encuentran dentro de los parámetros que reporta la literatura y las normas internacionales.

Se recomienda continuar con este estudio por un período de tiempo mayor e intentar establecer las causas que provocaron la producción de aflatoxinas en este tipo de alimento; además de intentar determinar otras micotoxinas y en otras matrices de alimentos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Chocolate. <https://es.wikipedia.org/wiki/Chocolate>
2. El Paisaje Cultural de Chocolate: Un Análisis Arqueológico de Los Piples Izalcos y Cambios Semánticos en el Mundo Atlántico, Siglos XVI-XIX; La Universidad 22-24 (2014): 39-54». Consultado el 13 de agosto de 2015.
3. J. A. Brillat-Savarin. Fisiología del gusto. Ed. Óptima, Barcelona, 2001, págs. 113-114.
4. Definición de chocolate. <https://boletinagrario.com/ap-6,chocolate,322.html>
5. Zanin T 2018 Chocolate, Propiedades y cómo debe consumirse <https://www.tuasaude.com/es/beneficios-del-chocolate/>
6. Rodríguez HWM. Micotoxinas y Aflatoxina B1, un problema en salud animal. Revista Teoría y Praxis Investigativa. Centro de Investigación y Desarrollo. CID. Fundación Universitaria de Área Andina. 2010; 5, 71-78.
7. Gimeno A., Martis M. L. Micotoxinas y Micotoxicosis en animales y humanos. 3ª ed. <http://www.specialnutrients.com/pdf/book/3%20edicion%2>

- 0MICOTOXINAS%20LR%20Secure.pdf
8. Hallan toxinas cancerígenas en chocolate con alta concentración de cacao. <http://www.artesblancas.com/hallan-toxinas-cancerigenas-en-chocolate-con-alta-concentracion-de-cacao/>
 9. Barbas C, Dams A, Majors R. E. 2005. Separation of aflatoxins by HPLC. Application, Environmental, Food Safety. Facultad de Ciencias Experimentales y de la Salud, Universidad San Pablo-CEU, Urbanización Montepríncipe, Boadilla del Monte, 28668 Madrid, Spain. Agilent Technologies, Inc. Amstelveen, The Netherlands. Agilent
 10. Codex Alimentarius Norma General para los Contaminantes y las toxinas presentes en los alimentos. CXS 193-195.
 11. NC 1205: 2017. Norma General para los Contaminantes y las toxinas en los alimentos y piensos.
 12. Tinoco Mónica, Rosales María Fernanda, Bonilla Alfredo, Miriam Briones, María Elena Cazar. Análisis de ocratoxina en chocolates de hoja comercializado en los mercados de Cuenca-Azuay. http://www.alimentosecuador.com/2016/07/17/analisis-de-ocratoxina-en-chocolates-de-hoja-comercializado-en-los-mercados-de-cuenca-azuay/?doing_wp_cron=1549986830.7456519603729248046875
 13. Tatis R A G. Valdés V. Estudio de Dieta Total de Panamá 2013. EDTPAN 2013. Organización Panamericana de la Salud. Organización Mundial de la Salud. PNUD. PNUMA