# **ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO**

# DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

"EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE AFLATOXINAS B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> Y G<sub>2</sub> EN MANÍ A GRANEL COMERCIALIZADO EN LA CIUDAD DE SANGOLQUÍ MEDIANTE EL MÉTODO DE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN CON DETECTOR DE FLUORESCENCIA Y CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DEL HONGO PRODUCTOR DE AFLATOXINAS"

Previa a la obtención del Título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

**ELABORADO POR:** 

KARLA ALEJANDRA FIERRO AGUILAR

**SANGOLQUÍ, OCTUBRE DEL 2012** 

# **HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS**

<b>ELABORADO POR</b>
Karla Alejandra Fierro Aguilar
DIRECTORA DE LA CARRERA
Ing. Grace Tatiana Páez Barrera

Sangolquí, Octubre del 2012.

# **CERTIFICACIÓN**

Bioq. Elena Mafla.

Ing. Norman Soria.

#### Certifican:

Que el trabajo titulado "EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE AFLATOXINAS B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> Y G<sub>2</sub> EN MANÍ A GRANEL COMERCIALIZADO EN LA CIUDAD DE SANGOLQUÍ MEDIANTE EL MÉTODO DE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN CON DETECTOR DE FLUORESCENCIA Y CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DEL HONGO PRODUCTOR DE AFLATOXINAS", realizado por KARLA ALEJANDRA FIERRO AGUILAR, ha sido guiado y revisado periódicamente y cumple normas estatutarias establecidas por la ESPE, en el Reglamento de Estudiantes de la Escuela Politécnica del Ejército.

SI se recomienda su publicación

El mencionado trabajo consta de un documento empastado y un disco compacto el cual contiene los archivos en formato portátil de Acrobat(pdf). Autorizan a que KARLA ALEJANDRA FIERRO AGUILAR lo entregue a ING. GRACE TATIANA PÁEZ BARRERA, en su calidad de Coordinador de la Carrera.

Sangolquí, Octubre del 2012	
Bioq. Elena Mafla	Ing. Norman Soria
Directora	Codirector

# **DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD**

Yo, k	(ARLA /	ALEJANDR	RA FIERR	O AGUILAR
-------	---------	----------	----------	-----------

Declaro	que:
---------	------

El proyecto de grado denominado "EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE AFLATOXINAS  $B_1$ ,  $B_2$ ,  $G_1$  Y  $G_2$  EN MANÍ A GRANEL COMERCIALIZADO EN LA CIUDAD DE SANGOLQUÍ MEDIANTE EL MÉTODO DE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN CON DETECTOR DE FLUORESCENCIA Y CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DEL HONGO PRODUCTOR DE AFLATOXINAS", ha sido desarrollado con base a una investigación exhaustiva, respetando derechos intelectuales de terceros, conforme las citas que constan al pie de las páginas correspondientes, cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía. Consecuentemente este trabajo es de mí autoría.

En virtud de esta declaración, me responsabilizo del contenido, veracidad y alcance científico del proyecto de grado en mención.

Sangolquí, Octubre del 2012

KARLA A. FIERRO AGUILAR

# **AUTORIZACIÓN**

Yo, KARLA ALEJANDRA FIERRO AGUILAR
Autorizo a la Escuela Politécnica del Ejército la publicación, en la biblioteca virtual de la Institución del trabajo (título de la tesis), cuyo contenido, ideas y criterios son de mi exclusiva responsabilidad y autoría.
Sangolquí, Octubre del 2012
Karla Alejandra Fierro Aguilar
Naria Alejanura Flerro Aguilar

# **DEDICATORIA**

A Dios por guiarme cada día con su infinito amor, sabiduría y paciencia en especial en los momentos más díficiles.

A mis padres quienes siempre han confiado en mí y me han apoyado incondicionalmente, quienes han sacrificado todo por hacer realidad los sueño de sus hijos, gracias por ser mi apoyo y fuerza incondicional, a mis hermanos Roberto, Carlos Alberto y Popis por ser mis amigos, ayudarme y apoyarme en cada uno de los pasos que he dado en el transcurso de estos cinco años.

Karla Alejandra Fierro Aguilar.

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar agradezco a Dios y mi Churonita por darme la oportunidad de vivir, acompañarme en cada paso que doy y haber puesto en mi camino personas maravillosas que han sido mi compañía y han marcado mi vida durante todo este periodo académico.

A mi padre por ser mi ejemplo a seguir, su perseverancia y constancia me han enseñado a salir adelante a pesar de las adversidades que se presentan en la vida, a mi madre por ser mi amiga, apoyarme en todo momento, por sus consejos, valores y sobre todo por su amor incondicional, gracias papis por ser mi fortaleza. A mis hermanos Roberto y Carlos Alberto por estar a mi lado, acompañándome en los momentos buenos y malos, gracias porque sé que siempre puedo contar con ustedes.

De igual forma mi agradecimiento hacia los directivos y responsables de AGROCALIDAD por haberme brindado la oportunidad de desarrollar mi tesis en los laboratorios de Inocuidad Alimentaria y por su ayuda incondicional en el transcurso de la presente investigación, en especial a la Dra. Olga Pazmiño, Ing. William Villacis, Francisco Iturra gracias por ser más que maestros para mí.

A mis directores y codirectores: Ing. Abraham Oleas, Bioq. Elena Mafla e Ing. Norman Soria por su gran apoyo y motivación para la elaboración de la presente tesis, gracias por su tiempo compartido y apoyo para la culminación de la misma.

A mis amigos: Cinty, Rosita, Christian, Richard, Daysi, Jenny, gracias por su apoyo incondicional no solo en nuestra formación profesional sino por su apoyo personal, seguiremos siendo amigos y próximamente colegas, gracias por su apoyo para la realización de este trabajo.

Karla Alejandra Fierro Aguilar.

# **ÍNDICE DE CONTENIDO**

Hoja d	e legalización del proyecto ii	
Certificación		
Declaración de responsabilidadiv		
Autoriz	zaciónv	
Dedica	atoria vi	
Agrade	ecimientos vii	
Abrevi	aturas xvi	
Resum	nenxvii	
Abstra	ctxviii	
1	CAPÍTULO: INTRODUCCIÓN1	
1.1	Formulación del problema1	
1.2	Justificación del problema1	
1.3	Objetivo del proyecto:	
1.3.1	Objetivo general3	
1.3.2	Objetivos específicos 3	
1.4	Marco referencial4	
1.4.1	Micotoxinas: concepto y origen4	
1.4.2	Aflatoxinas: generalidades5	
1.4.3	Aflatoxinas: B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> y G <sub>2</sub> 6	
1.4.4	Estructura6	
1.4.5	Características químicas	
1 / 6	Mecanismo de acción	

1.4.7	Biotransformación de las aflatoxinas	9
1.4.8	Mecanismo de carcinogenicidad de AFB <sub>1</sub>	11
1.4.9	Toxicidad crónica	12
1.4.10	Presencia de aflatoxinas en maní	13
1.4.11	Ciclo productivo del maní	15
1.4.12	Enfermedades del maní	15
1.4.13	Hongos de Almacenamiento	18
1.4.14	Ecología de los hongos de almacenamiento	18
1.4.15	Hongos productores de aflatoxinas	19
1.4.16	Etiología del hongo	20
1.4.17	Marco legal de las aflatoxinas	21
1.5	Método de análisis de aflatoxinas en maní	22
1.5.1	Cromatografía líquida de alta resolución con detector de fluoresc	encia 24
1.5.2	Columnas de inmunoafinidad	24
1.6	Cultivo de hongos	24
1.7	Identificación de hongos	25
1.8	Importancia económica	26
2 C	CAPÍTULO: MATERIALES Y MÉTODOS	27
2.1	Localización geográfica	27
2.2	Análisis cromatográfico de las muestras	27
2.2.1	Equipos	27
2.2.2	Reactivos	28
2.2.3	Material de análisis	29
2.2.4	Preparación y normalización de las soluciones de patrón de	aflatoxinas
		31

2.2.5	Determinación de la concentración de aflatoxinas	32
2.2.6	Preparación de las soluciones estándares de las aflatoxinas	33
2.2.7	Evaluación por cromatografía líquida de las soluciones de aflatoxinas condiciones establecidas en el laboratorio	
2.2.8	Prueba de recuperación de aflatoxinas en el procedimiento de extracció	n.
		36
2.2.9	Extracción de aflatoxinas en las muestras de maní a granel	36
2.2.10	Cuantificación de aflatoxinas en HPLC	38
2.2.11	Proceso de descontaminación	39
2.3	Análisis microbiológico de las muestras	40
2.3.1	Equipos	40
2.3.2	Reactivos	40
2.3.3	Selección de material	40
2.3.4	Preparación de los medios de cultivo	40
2.3.5	Desinfección de las muestras de maní	41
2.3.6	Siembra de las muestras	41
2.3.7	Aislamiento de los hongos.	42
2.3.8	Identificación de los hongos	43
3. C	CAPÍTULO: RESULTADOS	44
3.1.	Grupo bodegas	44
3.1.1.	Análisis estadístico	44
3.1.2.	Análisis microbiológico de muestras de maní de bodegas	48
3.2.2.	Análisis microbiológico de muestras de maní de supermercados	55
3.3.	Análisis comparativo	57
4 (	CAPÍTULO: DISCUSIÓNL	LL

5	CAPÍTULO: CONCLUSIONES	SSS
6	CAPÍTULO: RECOMENDACIONES	TTT
7	CAPÍTULO: REFERENCIAS	<b>VVV</b>
8	CAPÍTULO: ANEXOS	А

# Listado de Gráficas

Capít	ulo 1	
Gráfica 1.1	Estructura de las micotoxinas	7
Gráfica 1.2	Principales rutas metabólicas de AFB <sub>1</sub>	9
Gráfica 1.3	Mecanismos detoxificación de AFB <sub>1</sub> 1	0
Gráfica 1.4	Colonias de Aspergillus flavus	1
Capít	ulo 2	
Gráfica 2.1	Reacción de derivatización de las aflatoxinas B <sub>1</sub> y G <sub>1</sub>	8
Gráfica 2.2	Cromatograma de estándares para determinar la pureza 3	5
Gráfica.2.3	Siembra de la muestra de maní	1
Gráfica 2.4	Colonias de hongos en caja petri con PDA 4	2
Gráfica 2.5	Conservación de los hongos en tubos de ensayo con PD inclinado	
Capíti	ulo 3	
Gráfica 3.1	Concentración promedio en µg. kg <sup>-1</sup> de aflatoxinas en las 5 muestra de bodegas	
Gráfica 3.2	Densidad de puntos, histograma y gráfico de cajas de concentración de aflatoxina $B_1$ en $\mu g$ . $kg^{-1}$ en bodegas 4	la 6
Gráfica 3.3	Densidad de puntos, histograma y gráfico de cajas de concentración de aflatoxina B <sub>2</sub> en µg. kg <sup>-1</sup> en bodegas 4	la 6
Gráfica 3.4	Densidad de puntos, histograma y gráfico de cajas de concentración de aflatoxina $G_1$ en $\mu g. kg^{-1}$ en bodegas 4	
Gráfica 3.5	Densidad de puntos, histograma y gráfico de cajas de	

Gráfica 3.6	Porcentaje de los géneros de hongos aislados de las muestras maní Bodegas	
Gráfica 3.7	Concentración promedio de aflatoxinas en µg. kg <sup>-1</sup> en 5 muestras supermercados	
Gráfica 3.8	Densidad de puntos, histograma y gráfico de cajas de concentración de aflatoxina $B_1$ en $\mu g.\ kg^{-1}$ en supermercados	
Gráfica 3.9	Densidad de puntos, histograma y gráfico de cajas de concentración de aflatoxina $B_2$ en $\mu g$ . $kg^{-1}$ en supermercados	
Gráfica 3.10	Histograma y gráfico de cajas de la concentración de aflatoxina G <sub>1</sub> μg. kg <sup>-1</sup> en supermercados	
Gráfica 3.11	Densidad de puntos, histograma y gráfico de cajas de concentración de aflatoxina $G_2$ en $\mu g.\ kg^{-1}$ en supermercados	
Gráfica 3.12	2 Porcentaje de los géneros de hongos aislados de muestras de Supermercados	
Gráfica 3.13	Concentración promedio de aflatoxinas en µg. kg <sup>-1</sup> en las muest de bodegas y supermercados	
Gráfica 3.14	Porcentaje global de hongos aislados en muestras de maní a gra en comercializado bodegas y supermercados	

# Listado de tablas

Capít	ulo 1	
Tabla 1.1	Propiedades químicas de las Aflatoxinas	8
Tabla 1.2	Valores de DL50 de aflatoxinas dependiendo de la especie	13
Tabla 1.3	Taxonomía del maní	14
Tabla 1.4	Ciclo productivo del maní	16
Tabla 1.5	Principales enfermedades del cultivo de maní	17
Tabla 1.6	Factores físicos de influyen en el crecimiento de hongos	19
Tabla 1.7	Géneros de hongos productores de micotoxinas	20
Tabla 1.8	Niveles máximos permisibles de micotoxinas	22
Capít	ulo 2	
Tabla 2.1	Valores de PM (peso molecular) y ε (absortividad molar prometolueno-acetonitrilo)	edio
Tabla 2.2	Preparación de las soluciones de calibración	34
Tabla 2.3	Condiciones utilizadas en el HPLC	35
Tabla 2.4	Criterios de análisis de Aflatoxinas	36
Capít	ulo 3	
Tabla 3.1	Géneros de hongos aislados en bodegas	49
Tabla 3.2	Géneros de hongos aislados en supermercados	56
Tabla 3.3	Intervalos de confianza para aflatoxinas B <sub>1</sub> ; B <sub>2</sub> ; G <sub>1</sub> y G <sub>2</sub> clasifica por sitio de procedencia y global con una probabilidad 90%	

Tabla 3.4	Porcentajes globales de hongos aislados de granos de maní qu	e se
	expiden en bodegas y supermercados, de la jurisdicción de la ciu	udad
	de Sangolquí	62

# Listado de ANEXOS

ANEXO 1: Ejemplos de cromatogramas obtenidos	. A
ANEXO 2: Concentración de aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 en las muestras de a granel de bodegas y supermercados	
ANEXO 3: Curva de calibración	М
ANEXO 4: Claves utilizadas para la identificación morfológica de los hongos	Q
ANEXO 5: Fundamento estadístico	S
ANEXO 6: Imagen microscópica de los hongos aislados de las muestras de de bodegas y supermercados	

# **ABREVIATURAS**

**ADN:** Ácido Desoxirribonucleico

AF: Aflatoxinas

**AFB**<sub>1</sub>: Aflatoxina B<sub>1</sub>

**AOAC:** Association of Official Analytical Chemist

ARN: Ácido Ribonucleico

**AS:** Peso de la muestra total

**CF:** Factor de corrección

CIT: Citrina

**DON:** Deoxinivalenol

FAO: Organización de las Naciones Unidad para la Alimentación y la

Agricultura (Food and Agricultural Organization)

**GSH:** Ácido glutámico, L-Cisteína y Glicina

HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (High Perfomance

Liquid Chromatography)

**IP:** Peso del envase individual

**IS:** Peso de la muestra elemental

LT: Peso de Lota

OMS: Organización Mundial de la Salud

**OTA:** Ocratoxina A

**PDA:** Agar Papa Dextrosa (Potato Dextrose Broth)

**ppb:** Partes por billón (μg.kg<sup>-1</sup>)

PSI: Libra-fuerza por pulgada cuadrada

**SF:** Frecuencia de muestreo

**UV:** Radiación Ultravioleta

**ZEA:** Zearalenona

## **RESUMEN**

La contaminación de aflatoxinas en maní es un tema de investigación a nivel mundial, sin embargo en el Ecuador no se han realizado estudios sobre este tipo de contaminación y no existe alguna regulación que ayude a controlar los niveles de contaminación de micotoxinas en alimentos. El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar los niveles de aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 y caracterizar morfologicamente a los hongos presentes en maní a granel comercializado en bodegas y supermercados en la ciudad de Sangolqui. La contaminación de aflatoxinas en las muestras de maní se determinó mediante el método de Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC). Se obtuvo como resultado que las muestras de bodegas presentaron una elevada contaminación de aflatoxina B<sub>1</sub> que superó los límites permisibles por la Unión Europea de 5 y 8 ppb (µg.kg<sup>-1</sup>), los valores de esta toxina oscilaron entre: [17,65 hasta 87,51] (µg.kg<sup>-1</sup>) mientras que B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> mantuvieron niveles de contaminación inferiores a los límites permisibles. En las muestras de supermercados se obtuvo similares resultados, la concentración de aflatoxinas B<sub>1</sub> osciló entre: [2,23 hasta 12,95] (µg.kg<sup>-1</sup>), superó los límites permisibles, los niveles de B2, G1 y G2 no superaron los límites permisibles. La caracterización morfológica de los hongos se desarrolló con ayuda de claves taxonomicas, se determinó que el 56% presentaron contaminación con Aspergillus, 15% Fusarium, 9% Rhizopus y 6% Penicillum que son los principales géneros de hongos de almacenamiento productores de Aflatoxinas.

## **ABSTRACT**

The aflatoxin contamination in peanuts is a subject of worldwide investigation, however studies on this type of contamination have not been carried out in Ecuador and furthermore there isn't any regulation that helps to control the levels of mycotoxin contamination in food. This study aimed to assess the levels of aflatoxins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub> and morphologically characterize fungi present in bulk peanuts marketed in grocery store and supermarkets in Sangolqui city. The aflatoxin contamination in peanut samples was determined by the method of High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The result was that 60% of the samples from grocery store presented contamination of aflatoxin B<sub>1</sub> that surpassed the permissible limits set by the European Union of 5 and 8 ppb (µ g.kg<sup>-1</sup>), his toxin values oscillated between: [17,65 until 87,51] (μ g.kg<sup>-1</sup>) whereas B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub> maintained a level of contamination below permissible limits set. In the supermarket samples were obtained similar results, the B<sub>1</sub> aflatoxinas concentration oscillated between: [2,23 until 12,95] (µ g.kg<sup>-1</sup>), that surpassed the level permissible, of the same form the levels of B2, G1 and G2 did not overcome the permissible limits. The morphological characterization of the fungi was developed with help of taxonomical keys that helped to determine that in a 56% showed contamination with Aspergillus, 15% Fusarium, 9% Rhizopus, and 6% Penicillium who are the main genera of fungi aflatoxin producing storage.

# 1 CAPÍTULO: INTRODUCCIÓN

# 1.1 Formulación del problema

Las micotoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> son llamadas aflatoxinas, las mismas que son compuestos cancerígenos producidos principalmente por dos hongos: *Aspergillus flavus y Aspergillus parasiticus*. Este tipo de micotoxinas son metabolitos secundarios, que se producen en forma natural en los hongos y dependiendo sus niveles pueden afectar gravemente al hígado y provocar cáncer en los seres humanos y animales que consumen alimentos contaminados, los altos niveles de los productos contaminados en países en desarrollo representan un grave problema de salud pública por su alta peligrosidad (Shami & Ahmed, 2010).

El maní (*Arachis hypogaea* L.), es un alimento de consumo humano directo y es por esto que se debe procurar mantener a los granos de maní limpios. Una buena aireación favorece la disminución del crecimiento de hongos y la formación de aflatoxinas, de igual forma, el maní es considerado por la FAO como uno de los muchos productos alimenticios con mayor riesgo de contaminación de aflatoxinas, el riesgo de toxicidad para los seres humanos por la ingestión de alimentos contaminados por aflatoxinas, dependerá de la dieta alimenticia (Aguirre, 2006; FAO, 1993a).

#### 1.2 Justificación del problema.

La presencia de aflatoxinas en los alimentos, animales o incluso en los seres humanos es continuamente valorada a nivel mundial. En la actualidad la mayoría de países industrializados cuentan con estudios sobre aflatoxinas, a diferencia de los países subdesarrollados, que no lo cuentan por falta de

recursos económicos y humanos; por esta razón la carencia de regulaciones sobre micotoxinas, ausencia de vigilancia y control por parte de los organismos encargados presenta un problema para la sanidad alimenticia (Combita & Mildenberg, 2009).

Los altos niveles de humedad y temperaturas promedio sobre los 25°C en zonas de producción de este cultivo en nuestro país, presentan las condiciones ideales para que los hongos produzcan aflatoxinas. Las condiciones de almacenamiento y pilación de maní aumentan las probabilidades que el producto contaminando genere altas concentraciones de estos.

El desarrollo de investigaciones acerca de estas toxinas, la formulación de normas y reglamentos que permitan establecer niveles máximos permisibles, en materia prima y alimentos terminados, son trabajos que hoy en día se están desarrollando en Ecuador, con ayuda de instituciones públicas como AGROCALIDAD que tiene como objetivo principal ofrecer al país alimentos seguros, acogiéndose siempre a estrictas normas de calidad internacionales y nacionales.

Con el presente trabajo de investigación se procuró verificar la existencia de aflatoxinas en maní que se distribuye a granel en la ciudad de Sangolquí, tanto en supermercados como en bodegas de la zona, así mismo se identificaron microscópicamente a los hongo que generan estas toxinas. De igual forma, se pretendió abordar la problemática del consumo de alimentos contaminados con aflatoxinas, que afecta gravemente la salud del consumidor y es por esto que AGROCALIDAD, está desarrollando investigación acerca de esta problemática en alimentos, para lo cual necesita apoyo económico, logístico y trabajo multidisciplinario con universidades para generar investigación básica y formular procedimientos de control de aflatoxinas en alimentos como el maní a granel, que se consume en el país.

De acuerdo a datos estadísticos del Banco Central del Ecuador, la producción y consumo de maní es mayor frente a otro tipo de cereales como la avena y semillas de girasol que en su mayoría son alimentos importados más no cultivados en nuestro país.

# 1.3 Objetivo del proyecto:

# 1.3.1 Objetivo general

Evaluar los niveles de aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> en maní a granel comercializado en la ciudad de Sangolquí, mediante el método de cromatografía líquida de alta resolución, con detector de fluorescencia y caracterizar al hongo productor de aflatoxinas.

# 1.3.2 Objetivos específicos

- Construir curvas de calibración de las aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>.
- Aplicar columnas de inmunoafinidad para la extracción de aflatoxinas en muestras de maní a granel.
- Analizar la detección de aflatoxinas mediante cromatografía líquida de alta resolución con detector de fluorescencia con la aplicación de celdas electroquímicas para la derivatización de las mismas.
- Calcular y analizar la concentración de aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> en cada una de las muestras de maní a granel mediante regresiones lineales.
- Relacionar los datos estadísticos obtenidos con estudios concernientes a concentraciones permisibles de aflatoxinas por entidades internacionales.

 Caracterizar al hongo contaminante que genera la producción de aflatoxinas en maní.

#### 1.4 Marco referencial

# 1.4.1 Micotoxinas: concepto y origen

Desde la antigüedad el hombre ha conocido los hongos y los han utilizado desde siempre en su beneficio como alimento directo, para mejorar alimentos y especialmente con fines terapéuticos (antibióticos). Sin embargo, al ser los hongos microorganismos ubicuos en la naturaleza y crecer en todo tipo de materia orgánica, frecuentemente se encuentran como contaminantes en productos alimenticios, causando pérdidas significativas en los mismos. Se los considera como los agentes deteriorantes más comunes en todo tipo de alimento; gracias a su gran resistencia, este tipo de hongos pueden generar sustancias químicas con carácter tóxico, comúnmente conocidas como micotoxinas (Combita & Mildenberg, 2009).

Las micotoxinas son metabolitos secundarios fúngicos, producidos por algunas cepas de hongos ya que solo algunas especies son capaces de sintetizar micotoxinas; estos compuestos producidos por los hongos, difieren mucho en propiedades químicas, biológicas y toxicológicas (Pozas & Abad, 2010).

Estos compuestos conocidos como micotoxinas se originan al final de la fase exponencial o al principio de la fase estacionaria del crecimiento del hongo, la mayoría de estos metabolitos se producen en la ruta policetónica, son compuestos pequeños ya que su peso molecular es menor a 700 (Soriano, 2007).

Hoy en día se conocen entre 300 a 400 clases de micotoxinas, entre las más importantes por su gran toxicidad y presencia en los alimentos son:

Aflatoxinas (AF), Ocratoxina A (OTA), Citrina (CIT), Deoxinivalenol (DON), Zearalenona (ZEA) (Combita & Mildenberg, 2009).

Entre las micotoxinas indicadas en el párrafo anterior, las aflatoxinas han sido las micotoxinas más estudiadas, debido a que son reconocidas como potentes carcinógenos y es por esto que se conoce que desempeñan un rol muy importante, en la incidencia de carcinoma hepático humano a nivel mundial.

#### 1.4.2 Aflatoxinas: generalidades.

Las aflatoxinas B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> son compuestos químicos que están relacionados en su estructura respectivamente, su peso molecular oscila entre 312 y 350. La mayoría de micotoxinas son poco solubles en agua, pero es fácil su extracción con disolventes orgánicos, son bastante termoresistentes y pueden soportar un amplio rango de pH que puede variar entre 3 y 10 (Soriano, 2007).

Las aflatoxinas se pueden encontrar en varios tipos de alimentos, las más estudiadas son  $B_1$ ,  $B_2$ ,  $G_1$ ,  $G_2$ ,  $M_1$  y  $M_2$ . A pesar que la aflatoxina  $B_1$  es la aflatoxina que se encuentra en mayor cantidad frente a las otras y presenta un poder más tóxico (Combita & Mildenberg, 2009).

Los efectos como daños agudos en el hígado, cirrosis y efectos teratogénicos por el consumo de alimentos contaminados han sido documentados, la presencia de las aflatoxinas  $B_2$ ,  $G_1$  y  $G_2$  son menos frecuentes o nulas en ausencia de la presencia de aflatoxina  $B_1$  (Urrego & Gonzalo, 2006).

De las cuatro micotoxinas antes mencionadas, la aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), está clasificada por la Agencia Internacional de Investigaciones para el Cáncer (IARC) como genotóxica y dentro del primer grupo de sustancias cancerígenas, por ser considerado un compuesto carcinógeno humano (EFSA, 2004).

Gracias a ensayos establecidos en ciertos organismos se ha podido destacar el tiempo de vida media plasmática de AFB<sub>1</sub> que es de 36,5 minutos y

aproximadamente el 80% de la dosis total de AFB<sub>1</sub> ingerido por alimentos contaminados es excretado alrededor de una semana (Valdivia, 2000).

# 1.4.3 Aflatoxinas: B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>

A principios de 1960 fue acuñada por primera vez la palabra "Aflatoxinas" cuando por una intoxicación alimenticia, cientos de pavos, patos y otros animales murieron, se atribuyó esta muerte a la presencia de micotoxinas de *A. flavus* en la harina de maní con la que fueron alimentados dichos animales (Sitio Argentino de Producción Animal, 2010).

A estas aflatoxinas se las ha referido así gracias al color de la fluorescencia que emiten bajo la luz UV, *Blue* y *Green* respectivamente, mientras que su estructura química fue deducida a inicios de 1962 (Soriano, 2007).

Factores tales como el grado de acidez, alimento, temperatura, humedad y la presencia de microflora influyen directamente en el crecimiento de los hongos y la producción de micotoxinas, de la misma forma la composición gaseosa y la luz influyen debido que se trata de hongos aerobios (Soriano, 2007).

Para disminuir los niveles de aflatoxinas se han utilizado varios métodos como la utilización de diferentes disolventes en los alimentos, tratamientos térmicos, uso de energía ionizante, tratamientos alcalinos, uso de amoniaco pero estos tratamientos tienen ciertas desventajas tales como: económicas, poca eliminación de la toxina y daños en los alimentos (Valle & Florentino, 2000).

#### 1.4.4 Estructura

Químicamente las aflatoxinas son sustancias heterocíclicas, contienen un núcleo de cumarina fusionada con bifurano con un alto contenido de oxígeno. Las aflatoxinas  $B_1$  y  $G_1$  son el resultado del metabolismo de los hongos micotoxigénicos; sin embargo,  $B_2$  y  $G_2$  son derivados dihydroxy de  $B_1$  y  $G_1$ , las aflatoxinas  $B_1$  y  $B_2$  tienen una estructura pentanona que está unida al núcleo de

cumarina, mientras que las aflatoxinas  $G_1$  y  $G_2$  poseen una estructura lactona de seis miembros (FAO, 2003).

Los números 1 y 2 en cada uno de los grupos de micotoxinas hace referencia al tiempo de movilidad relativa en la cromatografía, en la gráfica 1.1 se presenta las estructuras químicas de las aflatoxinas.

Gráfica 1.1 Estructura de las micotoxinas.

Fuente: (FAO, 2003b)

La resistencia de las moléculas de aflatoxinas es conferida por el núcleo bifurano, lo que favorece a la interacción con algunos de los componentes celulares, de la misma forma la parte más reactiva de la estructura es el anillo lactónico (Combita & Mildenberg, 2009).

# 1.4.5 Características químicas

La mayor parte de estudios de estas micotoxinas desde su descubrimiento hasta la actualidad han referido que son sustancias incoloras, sin sabor e inodoras. Químicamente son sustancias estables en los alimentos, son resistentes a la degradación bajo procedimientos físico-químico y su eliminación en los alimentos resulta una tarea imposible, a pesar de la eliminación de los hongos la contaminación de las micotoxinas en los alimentos no se elimina (Urrego & Gonzalo, 2006). En la tabla 1.1 se indica las propiedades químicas de cada aflatoxina.

**Tabla 1.1** Propiedades químicas de las aflatoxinas.

Tipo Aflatoxina	Formula Estructural	Peso Molecular (g.mol <sup>-1</sup> )	Punto de Fusión °C	Fluorescencia
B <sub>1</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	312	268 – 269	Azul
B <sub>2</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	314	286 – 289	Azul
G <sub>1</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	328	244 – 246	Amarillo-verdoso
G <sub>2</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	330	237 – 240	Amarillo-verdoso

Fuente: (Urrego & Gonzalo, 2006)

#### 1.4.6 Mecanismo de acción

Desde los inicios se ha considerado a las aflatoxinas como responsables de intoxicaciones en animales por consumo de piensos contaminados, pero la importancia de las aflatoxinas reside principalmente, en los efectos nocivos para los animales y el ser humano, debido que se trata de sustancias que tienen la capacidad de actuar como agentes tóxicos, carcinógenos, teratogénicos, mutagénicos e incluso como sustancias inmunosupresoras (Combita & Mildenberg, 2009).

La exposición a las micotoxinas no solo se produce por ingestión, sino también por inhalación y por contacto cutáneo, los efectos producidos por una intoxicación por micotoxinas se conoce como micotoxicosis, cuya gravedad va a depender exclusivamente de la toxicidad de la micotoxinas.

Además de daños al hígado, las aflatoxinas pueden unirse covalentemente con los centros nucleofílicos de macromoléculas celulares como el ADN, ARN, proteínas, después de ser absorbidas por el intestino delgado y ser transportadas por los glóbulos rojos y proteínas plasmáticas, hacia el hígado para ser biotransformadas por las enzimas oxidasas (Sacarrás & Bolet, 2005).

#### 1.4.7 Biotransformación de las aflatoxinas

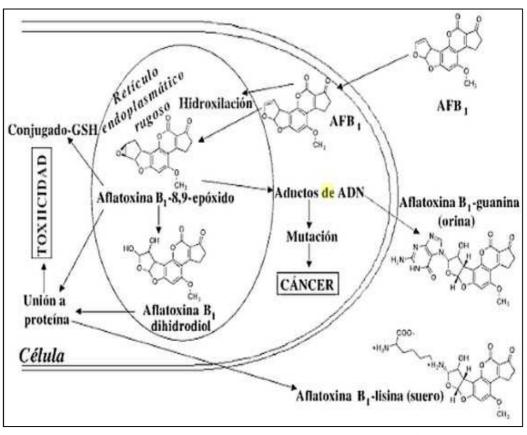
Entre todas las aflatoxinas presentes en los alimentos, la más investigada debido a su frecuente presencia en éstos y su alta concentración frente a otras micotoxinas es la AFB<sub>1</sub>. La exposición de los seres vivos a las aflatoxinas se produce principalmente por la ingestión de comidas contaminadas, se conoce que las aflatoxinas son absorbidas por el tracto gastrointestinal gracias a su alta liposolubilidad y es transportado por los glóbulos rojos y las proteínas plasmáticas hasta el hígado (Soriano, 2007; Urrego & Gonzalo, 2006).

Las micotoxinas dentro de la célula hepática son metabolizadas inicialmente por el citocromo P<sub>450</sub>, entre las más importantes en este sistema de oxidasas se encuentran: CYP1A2, 3A4, 3A5 y 3A7, las mismas que están localizadas en el retículo endoplásmático de las células hepáticas y renales para ser hidrolizada y formar ciertos compuestos intermedios de aflatoxinas conocidos como: P<sub>1</sub>, M<sub>1</sub>, Q<sub>1</sub>. También da lugar a la formación de la aflatoxina B<sub>1</sub>-8,9-epóxido, en la gráfica 1.2 se ilustra la formación de este compuesto intermedio que es altamente reactivo y tiene una fuerte atracción electrofílica hacia el ADN, reacciona covalentemente con los centros nucleofílicos de esta macromoléculas como también puede reaccionar con ARN o proteínas que intervienen en la división celular; este tipo de reacción ejerce efectos tóxicos, mutagénicos y carginogénicos (Urrego & Gonzalo, 2006; Valdivia, 2000).

Gráfica 1.2 Principales rutas de biotransformación de AFB<sub>1</sub>.

Fuente: (Valdivia, 2000)

Así como la célula puede sintetizar metabolitos tóxicos también posee un mecanismo de detoxificación frente а estos compuestos intermedios principalmente al metabolito aflatoxina B<sub>1</sub>-8,9-epóxido, este mecanismo se da frente a la acción de una transferasa inducible, la cual da como resultado un conjugado con el glutatión en su forma tiólica (GSH). Esta reacción de conjugación es catalizada por la enzima GST, formando la molécula 8-(S-glutationil)-9-hidroxy-8-9dihidro-AFB<sub>1</sub>, al final este compuesto puede ser eliminado como ácido mercaptúrico-AFB<sub>1</sub> a través de la secreción biliar (Urrego & Gonzalo, 2006; Valdivia, 2000), en la gráfica 1.3 se ilustra la biotransformación de AFB<sub>1</sub> en la célula hepática.



Gráfica 1.3 Mecanismos de detoxificación de AFB<sub>1</sub>.

Fuente: (Soriano, 2007)

El GSH (Ácido glutámico, L-Cisteína y Glicina) es un tripéptido. Su concentración en mamíferos alcanza concentraciones de 6 a 7 μmol. g<sup>-1</sup> y su concentración en células hepáticas está relacionada con la edad, se ha encontrado que en aves jovenes su concentración es menor frente a aves adultas. Bajo condiciones fisiológicas el 98% de está enzima se encuentra en forma tiolica (GSH) y el resto de enzima se encuentra en forma de disulfuro (GSSG), una reducción del 20 al 30% del total de la enzima genera una incapacidad marcada de la célula para amortiguar los ataques nucleofílicos (Valdivia, 2000).

Este mecanismo de conjugación competitivo con la GSH representa el mecanismo más importante de destoxificación frente a otros tipos de biotransformación para la obtención de metabolitos menos tóxicos que AFB<sub>1</sub>, algunas otras especies pueden metabolizar AFB<sub>1</sub> y generar la formación de aflatoxicol que es también un metabolito tóxico al igual que B<sub>1</sub>-8,9-epóxido, su importancia radica en su reacción de formación que es reversible y sirve como reservorio de AFB<sub>1</sub> en los animales que lo producen (Combita & Mildenberg, 2009). En general se conoce que la respuesta frente a la intoxicación de AFB<sub>1</sub> varía dependiendo a la especie y al nivel de intoxicación.

## 1.4.8 Mecanismo de carcinogenicidad de AFB<sub>1</sub>

El mecanismo de mutagenicidad de AFB<sub>1</sub> establecido en ensayos indica que AFB<sub>1</sub> requiere primeramente una activación para producir mutaciones, la ruta de activación es la conversión de aflatoxina B<sub>1</sub> en el metabolito B<sub>1</sub>-8,9-epóxido. La presencia del doble enlace entre los carbonos C8-C9 permiten la formación del epóxido a diferencia de las aflatoxinas B<sub>2</sub> y G<sub>2</sub>, la aflatoxinas G<sub>1</sub> también presenta el doble anillo pero su magnitud de toxicidad es dos veces menor que AFB<sub>1</sub> (Urrego & Gonzalo, 2006).

El fenómeno de mutagenicidad en el ADN a causa de B<sub>1</sub>-8,9-epóxido se debe a la formación de un compuesto estable entre el nitrógeno N-7 de los residuos guanil del ADN, mediante la inducción de depurinación y escisión de la

hebra lo que induce en la célula somática a la mutación. Este fenómeno se da en regiones ricas de guanina, en el proceso de replicación de ADN, en donde la guanina sufre transversión a timina en el codón 249 del gen *p53*. De la misma forma B<sub>1</sub>-8,9-epóxido puede formar dihidrodioles (8,9-dihidro-8,9- dihidroxiaflatoxina B<sub>1</sub>), que se une a proteínas celulares induciendo a daños celulares o muerte celular (Urrego & Gonzalo, 2006).

La comparación entre la activación y detoxificación de la AFB<sub>1</sub>-epóxido en diferentes especies animales provee la base para entender por qué las especies varían en su sensibilidad a los efectos tóxicos y carcinogénicos inducidos por la AFB<sub>1</sub>. (Urrego & Gonzalo, 2006).

#### 1.4.9 Toxicidad crónica

El consumo durante semanas o incluso meses de alimentos contaminados con bajos niveles de aflatoxinas es la forma más común de intoxicación crónica, la disminución de peso, menor índice de conversión y mayor susceptibilidad frente a diversas enfermedades infecciosas, son los principales síntomas que se pueden presentar (Soriano, 2007).

El comité mixto FAO/OMS evaluó el potencial carcinógeno de las aflatoxinas y los riesgos que están asociados a su ingestión, a pesar que aún no se tiene estimado la dosis de ingestión diaria permisible, se evaluaron varios estudios toxicológicos que se han realizado en animales, los mismos que han suministrado información suficiente para corroborar la carcinogenicidad hepática de las aflatoxinas (FAO, 2003). En la tabla 1.2 se indica la dosis letal media DL<sub>50</sub> de aflatoxinas para varios animales.

**Tabla 1.2** Valores de DL<sub>50</sub> de aflatoxinas dependiendo de la especie.

Especie	DL <sub>50</sub> (mg/kg)	Especie	DL <sub>50</sub> (mg/kg)
patico conejo pavo gato cerdito perro curiel ovejas	0.3 - 0.6 0.3 - 0.5 0.5 - 1.0 0.55 0.62 1.0 1.2 - 2.0 2.0	cerdo caballo mono pollo rata ratón hámster trucha	2.0 2.0 2.0 2.0 - 6.3 5.5 - 18.0 9.0 10.0 0.8

Fuente: (Soriano, 2007)

En países en desarrollo, principalmente en China y países Africanos se registran anualmente más de 190 mil casos de cáncer hepático, en América Latina, el cáncer hepático se registra en cuarto lugar de muertes por cáncer, sin que esto se asocie a altas tasas de hepáticis B, cirrosis u otras enfermedades hepáticas (Urrego & Gonzalo, 2006).

#### 1.4.10 Presencia de aflatoxinas en maní

El maní es un producto de consumo humano directo, se cree originario de regiones tropicales de América del Sur, en el Ecuador se disponen dos subespecies llamadas comúnmente: Virginia y Spanish. Se conoce que la producción de maní en el Ecuador se centra en cuatro provincias Manabí, Guayas, El Oro y Loja, actualmente la demanda del maní supera ampliamente la oferta, lo que ha generado grandes oportunidades de mercado en especial su producción orgánica (Aguirre, 2006). En la tabla 1.3 se da a conocer la taxonomía del maní.

Tabla 1.3 Taxonomía del maní.

Nombre Científico:	Arachis hypogaea L.
Nombres comunes:	Maní, cacahuate
Reino:	Vegetal
Clase:	Agiosperma
Subclase:	Dicotiledónea
Orden:	Oleaginosa
Género	Arachis
Especie:	hypogaea L.

Fuente: (Aguirre, 2006)

En el ciclo productivo del maní se tienen varias etapas en las que el alimento puede contaminarse con hongos productores de aflatoxinas, pero las etapas más críticas son el secado y el almacenamiento, debido a las condiciones ambientales que favorecen el crecimiento de hongos y la producción de aflatoxinas.

El secado es una etapa que se debe completar lo más rápido posible con el principal objetivo de impedir el crecimiento de hongos, que pueden generar aflatoxinas, se debe efectuar estrictos controles de humedad en los lotes de maní, ya que un nivel de humedad elevado aumenta las posibilidades del crecimiento de hongos (FAO, 2003).

Las bodegas deben mantener un grado de humedad suficientemente bajo, para que el maní tanto descascarado o con cáscara, se pueda conservar en condiciones que no puedan generar moho o un notable deterioro (FAO, 2003).

# 1.4.11 Ciclo productivo del maní

El maní es un producto de consumo humano directo y por esta razón, se debe evitar desde un principio que ciertos factores ambientales generen daños o contaminación en el producto. En la tabla 1.4 se detallan ciertas problemáticas que se deben considerar durante la siembra, desarrollo del cultivo, cosecha y poscosecha que permiten reducir los daños en las diferentes fases de cultivo de maní (Gráfica 1.4).

## 1.4.12 Enfermedades del maní

Las enfermedades y plagas de insectos son los limitantes más importantes para la obtención de cualquier producto vegetal, en el caso del maní se conocen que algunas enfermedades que afectan tanto a la planta como a la semilla son provocadas por hongos, en la tabla 1.5, se detallan las principales enfermedades que afectan a los cultivos de maní (Gráfica 1.5).

Tabla 1.4 Ciclo productivo del maní.

Para la siembra se prepara el suelo de maner profunda, suelto y no demasiado fino para evita encenagamiento durante la lluvia. Para lograr l germinación homogénea y para evitar fallos, l
encenagamiento durante la lluvia. Para lograr l SIEMBRA germinación homogénea y para evitar fallos, l
SIEMBRA germinación homogénea y para evitar fallos, I
profundidad de siembra debería ser uniforme entre 3.
cm. Las semillas de (2 a 4) se las apisona ligerament
con el pie o pasando un rodillo
La cosecha del maní se realiza cuando las planta
toman un color amarillento, entonces se arrancan de
suelo y se separan los frutos, la mejor calidad de lo
COSECHA frutos resultan con un contenido de humedad de 20
25% debido a que todas las vainas se separan co
facilidad e íntegramente
Después de la cosecha las vainas son secadas con lu
solar o artificial hasta que el contenido de humeda
sea 6-7% . Este proceso se debe realizar de una form
inmediata para evitar el crecimiento de hongo
productores de aflatoxinas. Entre los factores qu
predisponen el ataque de hongos micotóxicos son: falt
de madurez, exceso de madurez, estrés hídrico en e
período de madurez, daño mecánico, daño de insectos
impurezas, alta humedad de los granos, condicione
de alta humedad y temperatura ambiente.
Los principios en el almacenamiento del man
acopiado e industria son los mismos, requieren sanida
ALMACENAMIENTO y limpieza de las instalaciones además de un bue
control en la ventilación para proveer un ambient
fresco y seco.

Fuente: (Aguirre, 2006)

Tabla 1.5 Principales enfermedades del cultivo de maní.

NOMBRE	SÍNTOMAS Y SIGNO	AGENTE CAUSAL
VIRUELA	Enfermedad foliar, se observa principalmente en los folíolos, pero también en pecíolos, tallos y ginecóforos, son manchas aéreas de tejido necrosado, en su etapa inicial son manchas de color marrón de forma circular irregular	Cercospora arachidicola
TIZON	Esta enfermedad se produce a nivel de la corona, toda la planta presenta una coloración verde de apariencia seca sin brillo, sobre las lesiones se observa micelio blanco, abundante y algodonoso. A partir del micelio se forman los esclerocios	Sclerotium rolfsii Sclerotinia minor
CARBÓN	Enfermedad que afecta a las semillas, las mismas que presentan pequeñas áreas o toda la semilla hipertrofia con decoloración del tegumento, las semillas presentan una masa carbonosa.	Thecaphora frezii
ROYA	Ocasiona manchas visibles a ambos lados de la hoja, mientras la infección adquiere una coloración amarillo "oxidado", llevando finalmente a la defoliación y muerte de la planta	Puccinia arachidis

Fuente: (Fernandez & Giayetto, 2006)

## 1.4.13 Hongos de Almacenamiento

Las pérdidas por acción de hongos e insectos de almacenamiento pueden variar del 6 al 45%, dependiendo de las condiciones ambientales y físicas en cada una de las etapas del ciclo de cultivo de maní ya antes mencionadas, estas pérdidas son especialmente por *Aspergillus spp* y *Penicillium spp* (ICA, 1984).

Entre los principales efectos que produce la presencia de hongos en el maní, son los siguientes:

- Disminución en el poder de germinación
- Ennegrecimiento de las semillas y granos
- Calentamiento y putrefacción
- Cambios bioquímicos
- Producción de toxinas
- Pérdida de peso

Como se mencionó anteriormente el ataque de los hongos en campo o almacenamiento va a depender de las condiciones ambientales y físicas, especialmente de la humedad relativa, los hongos que invaden a las semillas de maní antes de la cosecha son: *Alternaria, Cladosporium, Diplodia, Helminthosporium* y *Fusarium*; sin embargo, cuando los granos son secados y llevados a condiciones de almacenamiento muchos de los hongos mencionados desaparecen y se comienza a detectar la presencia de diferentes especies de *Aspergillus* y *Penicillium* (ICA, 1984).

#### 1.4.14 Ecología de los hongos de almacenamiento

Entre los principales factores físicos que influyen en el crecimiento de hongos de almacenamiento se tiene: humedad, temperatura, tiempo de grano almacenado, y presencia de material extraño. A continuación se detalla en la tabla 1.6 como evitar el crecimiento de microorganismos en cada factor.

Tabla 1.6 Factores físicos de influyen en el crecimiento de hongos.

Humedad	Existen muchos hongos que pueden soportar niveles de humedad bajos como <i>Aspergillus;</i> sin embargo, niveles de humedad inferiores al 65% inhibe el crecimiento de este tipo de hongos.
Temperatura	Este factor está ligado a la humedad, de acuerdo a varios ensayos realizados se comprobó que las temperaturas bajas pueden controlar el crecimiento de hongos micotoxicos.
Tiempo de almacenamiento	Este factor al igual que la temperatura está ligado a la humedad relativa del grano, entre menor sea la humedad y temperatura, el grano puede mantenerse en almacenamiento durante meses sin presentar algún deterioro por microorganismos.
Material extraño	La presencia de hojas, insectos, malezas proporciona un medio ideal para el desarrollo de hongos de almacenamiento debido a la interferencia de aireación y el desarrollo de una temperatura mayor.

Fuente: (ICA, 1984)

# 1.4.15 Hongos productores de aflatoxinas

Los hongos productores de aflatoxinas se encuentran primordialmente en la división *Ascomycota*, esta división incluye más de 30 000 especies, pero solo un número reducido de hongos están relacionados con intoxicaciones que se producen por la ingesta de alimentos o piensos contaminados (Soriano, 2007). En la tabla 1.7 se detallan los principales géneros de los hongos productores de micotoxinas ordenados según el número aproximado de especies micotoxígenas que incluyen.

**Tabla 1.7** Géneros de hongos productores de micotoxinas.

GÉNERO	ESPECIES MICOTOXÍGENAS
Penicillium	32
Aspergillus	15
Fusarium	12
Byssochlamys	2
Stachybotrys	2
Trichoderma	2
Alternaria	1
Chaetomium	1
Paecilomyces	1
Rhizopus <sup>1</sup>	1

Fuente: (Soriano, 2007)

# 1.4.16 Etiología del hongo

Aspergillus es el género del principal grupo de hongos que se conoce que genera la mayor producción de aflatoxinas. A. flavus y A. parasiticus son las principales especies de este género que se han aislado de alimentos almacenados contaminados por aflatoxinas.

La contaminación del hongo en los alimentos se puede producir en cualquier fase de su ciclo, pero principalmente en las etapas de pilación y almacenamiento; de la misma forma es importante considerar, que la presencia de aflatoxinas no requiere siempre la presencia de hongos, debido a que éstos se pueden eliminar por procesos físico-químico pero no así las aflatoxinas (Montoya, 1995)

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> El género *Rhizopus* pertenece a la división *Zigomycota*.

A Aspergillus flavus se le atribuye la presencia de aflatoxinas en cereales como el maní, es por esto que la FAO/OMS han establecido como nivel máximo total de aflatoxinas de 15 μg. kg<sup>-1</sup> (Delgado & *Hernández*, 2009). En la gráfica 1.4 se muestra una colonia de *Aspergillus flavus*.

**Gráfica 1.4** Colonias de *Aspergillus flavus*.



Fuente: (Fermentek, 2010)

# 1.4.17 Marco legal de las aflatoxinas

Después del descubrimiento de las aflatoxinas a inicios de la década de 1960, muchos países desarrollaron legislaciones específicas para este tipo de toxinas, hoy en día existen leyes en muchos países industrializados que prohíben o limitan la presencia de las aflatoxinas en los alimentos (Combita & Mildenberg, 2009).

Las unidades en las que se expresan las concentraciones máximas permisibles son denominadas "partes por billón" (ppb), que equivale a µg de toxina por cada kg de alimento.

Existen muchos reglamentos para las cantidades de aflatoxinas en las raciones de alimentos, algunos países han reglamentado los límites solo para la aflatoxina B<sub>1</sub>, estableciendo un límite máximo de 5 μg. kg<sup>-1</sup>, pero hoy en día la mayoría de países han establecido niveles máximos permisibles para la suma de las cuatro principales aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>, fijando un límite de acción para las mismas de 15 μg. kg<sup>-1</sup>, a pesar que requiere un mayor trabajo analítico para

establecer un límite de la suma de las cuatro toxinas, de esta forma se contribuye de manera significativa a la protección de salud pública (FAO, 1993a). En la tabla 1.8 se presenta los niveles máximos permisibles de algunas micotoxinas en ciertos países como también los métodos de análisis utilizados.

Tabla 1.8 Niveles máximos permisibles de micotoxinas.

PAÍS	PRODUCTO	TOXINA	TOLERANCIA µg/kg	MÉTODO DE
				ANĀLISIS
Argentina	manies	aflatoxinas	20	
	leche y derivados	**	0,1-5,0	-
Brasil	harina mani exportac.		50	_
	maiz	ocratoxina A	50	- 1
		zearalenona	200	2
Australia	harina Inpino	fomopsina	5	-
Belgica	alimentos	esterigmatocistina	no detectable	2
Canadá	forrages	aflatoxinas	20	HPLC
	trigo	DON*	2.000	-
España	alimentos	aflatoxina B	5	_
550	pienso lecheras		10	TLC
	otros forrajes		50	TLC
E.E.U.U.	alimentos trigo	DON	1.000-2,000	TLC, HPLC
	forrajes	aflatoxinas	20	TLC, HPLC
	trigo p/piensos	DON	4.000	TLC
Dinamarca	derivados cerdo	ocratoxina A	25	_
Francia	ingo manzana	parolina	50	2
	granos p/piensos	aflatoxina B <sub>1</sub>	300	-
Israel	forrages	toxina T-2	100	2
		DAS*	100	deal .
Italia	manies	aflatoxinas	50	
Romania	forrajes	toxinas Stachybotys	no detectables	20
	**	quetomina	no detectable	
Senegal	manies p/piensos	aflatoxinas	300	TLC
Snecia	leche	aflatoxina M1	0,05	***
	pienso pollos	aflatoxinas	5	TLC
	#	ocratoxinas	1.000	finorométrico
	*	DON	2.000	TLC
	pienso cerdos	ocratoxinas	200	finocométrico
	· *	DON	400	TLC
Taiwan	torta maní	aflatoxinas	1000	

Fuente: (Van Egmond, 1991)

### 1.5 Método de análisis de aflatoxinas en maní

El descubrimiento de las aflatoxinas y su gran toxicidad desde las décadas de los sesenta han sugerido el desarrollo de muchas investigaciones para el análisis de estas sustancias (Combita & Mildenberg, 2009).

La estructura química de las aflatoxinas le confiere propiedades muy importantes para la detección cromatográfica, su polaridad y fluorescencia bajo la luz UV.

Independiente del método instrumental empleado para el análisis del nivel de aflatoxina, la determinación específica de las micotoxinas en un alimento implica: un muestreo adecuado que permita obtener una muestra representativa, homogenización de la muestra y separación de una cantidad pequeña a partir de la muestra original para su análisis posterior. Uno de los componentes críticos en la detección de aflatoxinas es el programa de muestreo y los pasos de preparación de la muestra (Gimeno, 2003).

Procedimientos de muestreo rigurosos son necesarios para superar la desigualdad de la distribución de aflatoxinas en los alimentos, pues se conoce que la contaminación de aflatoxinas es heterogénea, donde solo un pequeño número de granos pueden estar contaminados (Altech, 2005).

Los métodos de análisis de aflatoxinas pueden ser métodos de screening y analíticos cuantitativos. Entre los métodos de screening se utiliza ELISA o pruebas fluorométricas (enzimo – inmuno análisis) mientras que métodos analíticos cuantitativos implica generalmente a la cromatografía de capa fina o cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Un procedimiento de limpieza químico, utilizando columnas de inmunoafinidad ayuda a la captura de aflatoxinas de una forma más cuantitativa El uso de columnas de inmunoafinidad para la captura de aflatoxinas en el proceso de extracción apoya de forma significativa a la recuperación de las micotoxinas a diferencia de la extracción en fase solida en la que se puede perder considerables cantidades de micotoxinas en el proceso de extracción. La combinación de columnas de inmunoafinidad con HPLC hoy en día ofrece un método con mejores resultados frente a sensibilidad y confiabilidad (ROMER Labs, 2011).

# 1.5.1 Cromatografía líquida de alta resolución con detector de fluorescencia

La cromatografía líquida de alta resolución con detector de fluorescencia es un método de multidetección por el que se pueden determinar la mayoría de micotoxinas, se utiliza una columna de fase inversa (C18). Para la cuantificación de las aflatoxinas B<sub>1</sub> y G<sub>1</sub> se necesita una reacción de derivatización para poder cuantificarse, la celda electroquímica Kobra Cell genera una reacción con bromuro de potasio que permite la fluorescencia de las aflatoxinas más rápido y sin necesidad de equipos adicionales al cromatógrafo (R-BIOPHARM RHÔNE LTD, 2005).

#### 1.5.2 Columnas de inmunoafinidad

Las columnas de inmunoafinidad han sido diseñadas para un rápido y simple aislamiento de las aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>, este tipo de columnas están diseñadas con anticuerpos monoclonales los cuales permiten recuperar las aflatoxinas presentes en los alimentos (ROMER Labs, 2011).

#### 1.6 Cultivo de hongos

La solución que permite el desarrollo de un microorganismo es llamado medio de cultivo, mientras que el cultivo es el producto del crecimiento de un microorganismo. Los medios de cultivo que se utilizan para el crecimiento de este tipo de microorganismos deben contener los requerimientos nutricionales necesarios como nitrógeno, fósforo, carbono, vitaminas, etc. Muchas veces es necesaria la utilización de ciertos antibióticos para inhibir el crecimiento de otro tipo de microorganismos (Cañedo & Ames, 2004).

Se conoce que los medios de cultivo pueden ser líquidos o sólidos, para lo cual solo basta colocar una sustancia solidificante como el agar para cambiar de estado al medio de cultivo, el mismo que no variará las condiciones nutritivas del

medio sino que únicamente ayudará a mantener las condiciones de humedad por un tiempo más prolongado.

Los medios de cultivo sólidos que se vierten en cajas Petri favorecen al crecimiento del hongo, debido a que tiene mayor superficie para su crecimiento que se produce en los extremos de las hifas, es por esto que se le denomina crecimiento distal o apical. En este proceso, la hifa se va extendiendo y se va ramificando y a su vez cada ramificación, hasta conseguir una maraña de filamentos (Vera & García, 2006).

# 1.7 Identificación de hongos

Los hongos que producen aflatoxinas en granos como el maní son catalogados hongos de almacén, debido a las condiciones que se presentan en el almacenamiento de este tipo de granos, los hongos que generalmente se encuentran son de las especies *Aspergillus* y *Penicillium* (Moreno, 1988).

Entre los hongos que contaminan los granos almacenados se han descrito a: Aspergillus restricus, A. flavus, A. candidus. A. versicolor, A. parasiticus. Este tipo de hongos está integrado por características morfológicas muy similares y su clasificación se basa principalmente en morfologías específicas tales como: forma, tamaño y color y también fisiológicas como: reproducción y crecimiento (Moreno, 1988).

Para la identificación de hongos es necesario aislarlos, para lo cual se utilizan medios de cultivo específicos que permitan el crecimiento únicamente del hongo que se desea identificar. Generalmente los medios de cultivo que se utilizan para el tipo de hongo que se desea identificar son: papa dextrosa agar y Czapek (Arauz, 1998).

#### 1.8 Importancia económica

La valoración de pérdidas económicas debido por la presencia de aflatoxinas en los alimentos, es muy compleja, ya que son muchos los factores que se deben tomar en cuenta. La detección de aflatoxinas en muestras de materias primas puede ocasionar la pérdida absoluta de los cultivos (Combita & Mildenberg, 2009).

Australia anualmente gasta cerca de tres a seis millones de dólares en tratamientos e investigaciones de aflatoxinas, lo que ha llevado a realizar procedimientos de detección rápida como la utilización de mini columnas, pero los resultados no son tan satisfactorios (Dietzgen, 1999).

En Estados Unidos los agricultores estiman que sus pérdidas económicas por contaminación de aflatoxinas en cultivos de maní sobrepasan los veinte y seis millones de dólares desde 1993 hasta 1996, en la actualidad los agricultores no cuentan con un método para controlar la concentración de aflatoxinas en sus cultivos (Agriculture Research Service, 2005).

La presencia de aflatoxinas en materias primas en la mayoría de países industrializados resulta un desafío, debido a las grandes pérdidas económicas que esto representa; sin embargo, en países subdesarrollados la presencia de estas toxinas resulta más preocupante debido a que una de sus principales fuentes de ingresos es la exportación de materias primas, pero si las mismas no cumplen con los controles de calidad de los países industrializados las pérdidas económicas serán más significativas. En el Ecuador las condiciones climáticas presentan un punto a favor para la presencia de aflatoxinas en materias primas como también las condiciones de almacenamiento y procesamiento.

# 2 CAPÍTULO: MATERIALES Y MÉTODOS

## 2.1 Localización geográfica

El estudio se desarrolló en dos etapas:

- Muestreo: Se realizó en la principal zona comercial de la ciudad de Sangolquí del cantón Rumiñahui con una extensión de 137.2 Km², ubicada al Sur Oriente del cantón Quito, provincia de Pichincha.
- Laboratorio: El proyecto de investigación se desarrolló en dos fases experimentales la primera fase se efectuó en los laboratorios de la Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro (AGROCALIDAD) ubicado en el valle de Tumbaco, provincia de Pichincha y la segunda fase en los laboratorios de Fitopatología de la Carrera de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias IASA-I ubicado en barrio San Fernando, parroquía Sangolquí, cantón Rumiñahui, provincia de Pichincha.

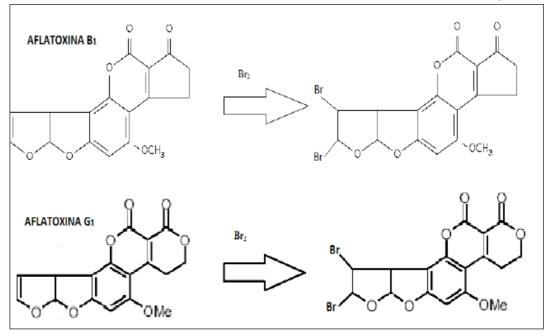
#### 2.2 Análisis cromatográfico de las muestras

#### 2.2.1 Equipos

- Cromatógrafo de líquidos Alliance Waters 2695 Separation
   Module
- Detector de fluorescencia Waters 2475 Multi λ Fluorescence
   Detector
- Columna de fase inversa Waters Spherisorb® 5µm ODS2 4.6 X
   250 mm Analytical
- Espectrofotómetro Spectronic® Genesys™ 5 Spectronic
   Instruments

- Celdas de cuarzo 1 cm
- Agitador Vortex mixter
- Vap-Evaporador Thermo scientific Reacti-Therm #TS 18822
- Columnas de inmunoafinidad AflaStar <sup>™</sup>R (Romer Labs<sup>®</sup>)
- Licuadora con jarra de 1 litro de capacidad
- Manifold
- Celda electroquímica Kobra Cell: celda electroquímica que permite la derivatización de las aflatoxinas B<sub>1</sub> y G<sub>1</sub> lo que facilita su detección incrementando su fluorescencia. La reacción de derivatización ocurre en 4 segundos y a temperatura ambiente y no necesita soluciones derivatizantes.

Gráfica 2.1 Reacción de derivatización de las aflatoxinas B<sub>1</sub> y G<sub>1</sub>



Fuente: (Vallejo, 2012)

#### 2.2.2 Reactivos

- Estándares de aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> (SIGMA ALDRICH)
- Acetonitrilo grado cromatográfico (MERK)

- Metanol grado cromatográfico (MERK)
- Metanol grado reactivo (MERK)
- Tolueno
- Bromuro de potasio
- Dicromato de potasio K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>
- Ácido sulfúrico
- Ácido nítrico (4M)
- Agua filtrada con el sistema Mili-Q
- Hipoclorito de sodio 5%
- Buffer fosfato (PBS): Se disolvió 8 g de cloruro de sodio (NaCl), 0,2 g de cloruro de potasio (KCl), 1,44 de fosfato ácido de sodio (NaHPO<sub>4</sub>), 0,24 g de fosfato diácido de potasio (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), en 800 ml de agua, se ajustó el pH a 7,44 con ácido clorhídrico (HCl) o hidróxido de sodio (NaOH) 0,1 M y se aforó a 1litro.

#### 2.2.3 Material de análisis

Para la ejecución del presente trabajo se elaboró un plan de muestreo adaptado, sobre la base del protocolo descrito por la FAO en el *CODEX STAN 209* – 1999, Rev. 1- 2001, el mismo que ha sido desarrollado para controlar los niveles de aflatoxinas totales en maní a granel destinado a ulterior elaboración. El procedimiento de muestreo para el análisis del contenido de aflatoxinas constó de tres fases: selección de muestra, preparación y cuantificación de las aflatoxinas.

#### 2.2.3.1 Protocolo de muestreo

Debido a que la contaminación de aflatoxinas en este tipo de alimentos es heterogénea, el procedimiento para la toma de muestras elementales tiene una importancia significativa, ya que todo grano de maní debe tener la misma posibilidad de ser elegido.

El plan de muestreo que recomienda la FAO se refiere a la toma de una muestra única de 27 kg, de un lote de maní sin cáscara teniendo como referencia un nivel máximo de de 15 µg. kg<sup>-1</sup> como contenido total de aflatoxinas.

El estudio se ejecutó en lotes de maní fijos (estántes), por lo cual el muestreo se realizó de forma aleatoria en cinco bodegas y cinco supermercados escogidos de la ciudad de Sangolquí, la frecuencia del muestreo aconsejado por el CODEX está establecido en función del: peso del lote, peso de la muestra elemental, peso de la muestra total y peso del envase individual, la misma que se calculó conforme a la siguiente fórmula<sup>2</sup>:

$$SF = \frac{LT \times IS}{AS \times IP}$$

Donde:

- Frecuencia de muestreo (SF): Es el número de envases de donde se tomaron las muestras elementales para el análisis.
- Peso de Lote (LT): Es la cantidad identificable del producto alimenticio que se entrega una sola vez y respecto del cual se determinaron características comunes como: origen, variedad, tipo de embalaje, embalador, consignador o marcas.
- Peso de la muestra elemental (IS): Es la cantidad de material que se tomó al azar de un único lugar del lote o sublote.
- Peso de la muestra total (AS): Es la suma de todas las muestras elementales tomadas del lote o sublote.
- Peso del envase individual (IP): Cantidad del material que se encontró en los envases.

El CODEX tiene establecidos algunos de estos datos: peso de la muestra elemental (IS) 200 gramos, y peso de la muestra total (AS) 27 kg en maní a granel sin cáscara.

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> CODEX.2001

Según datos recopilados en los sitios de comercialización de maní a granel, se estimó la frecuencia de muestreo, la misma que fue calculada a partir de la ecuación ya antes mencionada obteniendo una frecuencia de muestreo de 5 repeticiones por cada sitio a evaluar.

# 2.2.4 Preparación y normalización de las soluciones de patrón de aflatoxinas.

Para la preparación de las soluciones patrones de aflatoxinas se utilizaron los protocolos de la AOAC<sup>3</sup>, la preparación y normalización de las soluciones patrones constituyen una parte esencial de la presente investigación.

# 2.2.4.1 Calibración del espectrofotómetro

De acuerdo a los procedimientos de la AOAC se efectuó la calibración del espectrofotómetro.

- a) Preparación de soluciones y lectura en el espectrofotómetro
   Se prepararon tres soluciones de K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0.25 mM, 0.125 mM,
   0.0625mM) y se realizaron las lecturas de absorbancias en el espectrofotómetro
   en un margen de 347 a 350 nm usando como blanco H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.009M.
- b) Cálculo de los coeficientes de extinción molar  $(\epsilon_{350})$  Se evaluaron los coeficientes de extinción molar a partir de la siguiente ecuación<sup>4</sup>:

$$\varepsilon = \frac{Abs \times 1000}{Conc. K2Cr2O7}$$

c) Calculo del factor de corrección (CF)
 A partir de los coeficientes de extinción se calculó el factor de corrección:

\_

<sup>&</sup>lt;sup>3,4</sup>Association of official analytical chemist, 2005

$$CF = \frac{3160}{\varepsilon}$$

#### 2.2.5 Determinación de la concentración de aflatoxinas

Los estándares de aflatoxinas utilizados en esta investigación ya habían sido formulados con anterioridad con tolueno-acetonitrilo (9:1), siendo la concentración madre de cada una de ellas de: 0,5 mg. ml<sup>-1</sup>, a partir de esto se realizaron soluciones de trabajo tomando en cuenta que la concentración de las soluciones madre podrían haber variado con el tiempo.

Antes de la preparación de las soluciones de trabajo, las soluciones madres fueron agitadas en el vortex por 30 minutos, las soluciones de trabajo fueron preparadas en frascos ámbar individuales de 5 ml para cada aflatoxina que contenía 100 ng  $B_1$ , 20 ng  $B_2$ , 100 ng  $G_1$ , 20 ng  $G_2$ , fueron agitadas por 15 minutos y almacenadas a -20 °C.

Obtenido el factor de corrección y el coeficiente de extinción de molar, se determinó la concentración de cada aflatoxina con la siguiente ecuación<sup>5</sup>:

$$\mu gAflatoxinas/ml = \left(\frac{Abs \times PM \times 1000}{\varepsilon}\right) \times CF$$

Donde:

Abs: Absorbancia

PM: Peso Molecular

CF: Factor de corrección

ε: Coeficiente de extinción a 350 nm.

<sup>5</sup> Association of official analytical chemist, 2005

\_

**Tabla 2.1** Valores de PM (peso molecular) y ε (absortividad molar promedio tolueno-acetonitrilo)

Aflatoxinas	Peso molecular	ε tolueno-		
	relativo	acetonitrilo (9:1)		
B <sub>1</sub>	312	19300		
B <sub>2</sub>	314	21000		
G <sub>1</sub>	328	16400		
G <sub>2</sub>	330	18300		

Fuente: (AOAC, 2005)

# 2.2.6 Preparación de las soluciones estándares de las aflatoxinas.

Adaptado de: Aflatoxin B₁ and Total Aflatoxin in Peanut Butter, Pistachio Paste, Fig Paste, and Papikra Powder. AOAC official Method 999.07 (AOAC, 2005).

Para la curva de calibración se prepararon cinco soluciones *mix* a diferentes concentraciones, listados en la tabla 2.2 en viales de 2 ml. A cada solución *mix* se evaporó la solución de tolueno-acetonitrilo (9:1) bajo corriente de Vap-Evaporador con una presión de 2 PSI de nitrógeno, posteriormente se reconstituyó con 400 µl de metanol grado HPLC y se diluyó con 600 µl de agua tipo 2. Estas soluciones se agitaron durante 15 minutos antes de ser evaluado en cromatografía.

Tabla 2.2 Preparación de las soluciones de calibración.

CONCENTRACIÓN FINAL PARA CURVA DE CALIBRACIÓN ηg/ml							
Estándar de trabajo	Alícuota a tomar en µl	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>		
1	4	0,4	0,08	0,4	0,08		
2	12	1,2	0,24	1,2	0,24		
3	20	2	0,4	2	0,4		
4	28	2,8	0,56	2,8	0,56		
5	36	3,6	0,72	3,6	0,72		

Fuente: (AOAC official method 999.07, 2005)

Las soluciones *mix* se requirieron preparar cada vez que se realizó una curva de calibración.

# 2.2.7 Evaluación por cromatografía líquida de las soluciones de aflatoxinas en condiciones establecidas en el laboratorio.

Debido a que las soluciones madres de Aflatoxinas ya habían sido preparadas, fue necesario evaluar el cromatograma de las mismas para determinar la pureza y degradación de las soluciones.

Para lo cual se preparó una solución *mix* del punto medio de la curva y se inyectó 100 µl en el equipo de HPLC con las condiciones descritas en la tabla 2.3, y de esta forma se evaluó la pureza de los estándares.

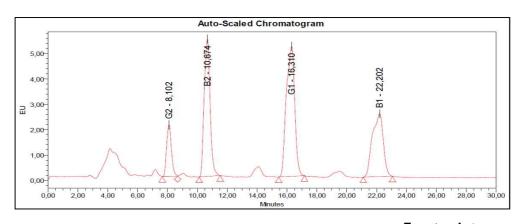
Tabla 2.3 Condiciones utilizadas en el HPLC

CONDICIONES DE CROMATÓGRAFO					
Fase Móvil	(60:20:20) agua:metanol:acetonitrilo + 199 mg de bromuro de potasio + 350 µl de ácido nítrico 4M				
Flujo	1 ml.min <sup>-1</sup>				
Volumen de Inyección	100 μΙ				
Temperatura de reacción	40 °C				
Tiempo de reacción	30 min				
Kobra Cell	Seteo 100 Ma				
Detector de fluorescencia	Emisión:455; Excitación: 362				

Fuente: (Aflaprep, 2005)

La evaluación de las soluciones estándares mediante un corrida cromatográfica permitió comprobar que el estado de las aflatoxinas era el favorable, no se observó contaminación ni degradación en ninguna de las cuatro toxinas, tal como se indica en la gráfica 2.2.

Gráfica 2.2 Cromatograma de estándares para determinar la pureza



Fuente: Autor.

# 2.2.8 Prueba de recuperación de aflatoxinas en el procedimiento de extracción

Después de comprobar que los estándares de las aflatoxinas no se encontraban deteriorados, se realizó una prueba de recuperación de las mismas en una matriz de maní sin contaminación, el porcentaje de recuperación total de aflatoxinas fue del 81%; este porcentaje de recuperación se encuentra entre los márgenes que propone la FAO como un criterio de evaluación, en la tabla 2.4 se indica los criterios de análisis para aflatoxinas en maní.

Tabla 2.4 Criterios de análisis de aflatoxinas

Criterio	Margen de	Valor	Valor máximo		
Cinterio	concentración	recomendado	permitido		
Testigos	Todo	Insignificante	-		
Recuperación –					
contenido total de	1 – 15 (µg. kg <sup>-1</sup> )	70 a 110 %			
aflatoxinas					

Fuente: (FAO, 2003)

Según los métodos analíticos descritos por Waters la recuperación de aflatoxinas en matrices como el maíz, pistachos, maní e higos secos se sitúan entre 63 y 78% para aflatoxina  $B_1$ , entre 85 y 101% para aflatoxina  $G_1$  y entre 52 y 71% para las aflatoxinas  $B_2$  y  $G_2$ .

# 2.2.9 Extracción de aflatoxinas en las muestras de maní a granel

Adaptado de: AflaStar ™ R- Immunoaffinity Columns for the purification of Aflatoxins in conjunction with HPLC. (ROMER Labs, 2010).

Para la evaluación de los niveles de aflatoxinas en las muestras de maní a granel comercializadas en la ciudad de Sangolquí, se utilizaron columnas de inmunoafinidad Romer Labs<sup>®</sup> para la extracción.

#### a) Método de extracción

Se pesaron 25 gramos de muestra de maní molido y 2 gramos de cloruro de sodio (NaCl) en un vaso de licuadora de 1 litro de capacidad. Se agregaron 100 ml (60:40) de metanol:agua grado HPLC y se licuó durante 3 minutos a alta velocidad. Se agitó durante una hora en shaker a velocidad media el licuado y posteriormente se filtraron aproximadamente 50-80 ml a través de papel filtro Whatman No. 1.

#### b) Dilución del extracto

Se tomó una alícuota del extracto filtrado y se diluyó con buffer PBS hasta disminuir el contenido de metanol en un 20%, se verificó que el pH de la dilución sea entre 6 a 8.

#### c) Preparación de las columnas

Antes de utilizar las columnas de inmunoafinidad se debió controlar que estén a temperatura ambiente. Se removieron las tapas inferiores de las columnas y se colocaron sobre adaptadores apropiados sobre el Manifold teniendo precaución de no secar la columna, finalmente se retiraron las tapas superiores de las columnas y se ajustaron firmemente las columnas al cuerpo de la jeringuilla.

# d) Captura de las aflatoxinas

Se tomaron 10 ml del extracto diluido con PBS y se colocaron en el cuerpo de la jeringuilla, se encendió el Manifold y se dejó pasar un flujo de 1 ml. min<sup>-1</sup> por la columna de extracción.

### e) Enjuague

Después de que todo el extracto pasó completamente a través de la columna, se agregaron 10 ml de agua tipo 2 al cuerpo de la jeringuilla y se dejó pasar con un flujo de 5 ml.min<sup>-1</sup> a través de la columna, se removió todo el

excedente de la columna aplicando una ligera presión, sin que el gel no quede completamente seco.

#### f) Elusión de aflatoxinas.

Se colocó un vial ámbar directamente bajo la columna y se pipeteó 1 ml de metanol grado HPLC en el cuerpo de la columna, se permitió un flujo muy leve de una gota por segundo y con reflujo del eluyente de 3 a 5 veces para asegurarse una completa desnaturalización del anticuerpo monoclonal seguido se pipeteó 0,5 ml de metanol grado HPLC para la elusión total de aflatoxinas dando como volumen final de 1,5 ml.

#### 2.2.10 Cuantificación de aflatoxinas en HPLC

Se inyectó 100 µl de la muestra en el equipo HPLC y se cuantificó la concentración de cada aflatoxina comparando las áreas de los picos de las muestras con la curva de calibración de los estándares que presentaban los mismos tiempos de retención. Las condiciones cromatográficas utilizadas fueron las establecidas en la *tabla 2.3.* 

Cálculos: para calcular la concentración de cada aflatoxina en las muestras de maní se aplicó la siguiente relación "*Plot data*" [concentración de aflatoxinas (ng/ml; eje y) contra el área del pico (unidades; eje x)] de la solución experimental de calibración dentro de la tabla, usando la regresión lineal. Se utilizó la siguiente función (y=ax+b) para calcular la concentración de aflatoxinas en la solución.

La fórmula de la calibración lineal, describe una correlación entre la señal de detección (x) y el concentración correspondiente del analito (y). La constante (a) es el valor correspondiente a la pendiente de la función lineal, mientras que (b) es el valor de la intersección de la función en el eje x. Este cálculo fue desarrollado en el software del equipo de cromatografía *EMPOWER*.

Después de obtenidos los datos de la regresión lineal en el equipo (*Ver Anexo 1*), se calculó la contaminación de aflatoxinas (ηg. g<sup>-1</sup>) en las muestras de maní de acuerdo a la siguiente ecuación (*Ver Anexo 2*):

$$Contaminación \left(\frac{\eta g}{g}\right) = \frac{c_{smp} \left(ng. \, g^{-1}\right) \times Solvente(ml) \times Elución(ml)}{W_t(g) \times Alícuota \, (ml)}$$

### Donde;

- $C_{smp}$  ( $\eta g.g^{-1}$ ): Concentración de aflatoxinas calculada por la regresión lineal.
- Solvente (ml): Solvente para la extracción, (100 ml).
- Elución (ml): Volumen final colectado después de la elución en las columnas, (1,5 ml).
- $W_t$  (g): Porción de la muestra tomada para el análisis, (25 g).
- Alícuota (ml): Alícuota tomada para la elución en las columnas de inmunoafinidad, (6,5 ml).

#### 2.2.11 Proceso de descontaminación

El material de vidrio y plástico utilizado para la extracción y purificación de las aflatoxinas, fue sumergido durante 12 horas en una solución al 5% de hipoclorito de sodio, seguido se lavó el material con el protocolo elaborado en el laboratorio. El material orgánico y desechable fueron eliminados en fundas de plástico rojas etiquetadas como material peligroso y los desechos líquidos fueron descartados en envases especiales para solventes.

#### 2.3 Análisis microbiológico de las muestras

# 2.3.1 Equipos

- Balanza analítica Metter Toledo PG203-5
- Autoclave All American electronic pressure steam sterilizer Model
   25X-1
- Cabina de flujo laminar LAB-CONCO purifier class II biosafety cabinet
- Cámara Thermo Forma Airflow Workstation
- Baño maría WWR Scientific Products
- Incubadora Memert
- Microscopio binocular. Olympus CH20
- Mecheros de busen

#### 2.3.2 Reactivos

- Agar papa dextrosa PDA
- Cloranfenicol M©K invectable 1gm
- Alcohol
- Hipoclorito de sodio al 10%
- Azul de lactofenol: Reactivo utilizado para la identificación de hongos bajo microscopio.

## 2.3.3 Selección de material

Después de evaluar los niveles de micotoxinas en las muestras de maní seleccionadas de la ciudad de Sangolquí mediante el método de cromatografía líquida, se identificaron las muestras que presentaron aflatoxinas y consecutivamente de éstas se realizó el análisis microbiológico.

# 2.3.4 Preparación de los medios de cultivo

Se pesaron 39 gramos de agar papa dextrosa PDA y se disolvieron en 1 litro de agua destilada se homogenizó el medio y se lo autoclavó, posterior a esto se llevó el medio a una temperatura de 45 °C en baño maría y se colocó 250

miligramos de cloranfenicol, se dispensaron aproximadamente 20 ml en cada caja petri y se mantuvo durante un tiempo considerado bajo luz UV para evitar cualquier tipo de contaminación en las cajas. De la misma forma se prepararon tubos de ensayo con PDA inclinado para el aislamiento de los hongos.

#### 2.3.5 Desinfección de las muestras de maní

Se colocaron las almendras de maní durante un minuto en una solución de hipoclorito de sodio al 2,5%, seguido se realizaron lavados con agua esterilizada hasta que las almendras queden totalmente libres de residuos de hipoclorito de sodio.

#### 2.3.6 Siembra de las muestras

Terminada la desinfección y secadas las almendras de maní, se dividieron las mismas en cuatro fracciones y se colocaron diez porciones en cada caja petri. Por cada lote se realizaron 5 repeticiones con diez porciones de la muestra en cada caja, tal como se lo indica en la gráfica 2.3. Las cajas se dejaron por 3 días en incubación a 25 °C y en oscuridad.



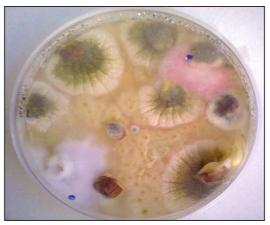
Gráfica.2.3 Siembra de la muestra de maní

Fuente: Autor

# 2.3.7 Aislamiento de los hongos.

Pasado siete días de la siembra se observó (gráfica 2.4) un crecimiento acelerado de hongos en las muestras de maní, por lo cual se procedió transferir los hongos en tubos con medio PDA inclinado. Debido a la peligrosidad de los hongos productores de aflatoxinas, se utilizó una cámara de tipo II para su aislamiento.

**Gráfica 2.4** Colonias de hongos, en caja petri con PDA, luego 7 días del cultivo a 25 °C.



Fuente: Autor

Para el aislamiento de los hongos presentes en cada lote se realizaron evaluaciones morfológicas bajo el microscopio, de cada repetición, para purificar y conservar una sola vez al mismo hongo por cada lote. Catorce hongos fueron conservados de las 35 repeticiones.

Gráfica 2.5 Conservación de los hongos en tubos de ensayo con PDA inclinado



Fuente: Autor.

#### 2.3.8 Identificación de los hongos

Para la identificación de los hongos, en la cámara de flujo se tomó una pequeña fracción del micelio aéreo de cada tubo con la ayuda de una aguja de disección, la porción extraída de micelio se colocó en un portaobjetos con una gota de azul de lactofenol. Por cada hongo conservado en los tubos se prepararon dos placas.

Para la identificación del género de los hongos aislados, se utilizaron claves taxonómicas (*Ver Anexo 3*), para lo cual se tomaron en cuenta ciertas características macro y microscópicas. Se distinguió características macroscópicas en su forma y color de colonia; sin embargo, para el análisis de características microscópicas se utilizó el programa CyberLink YouCam para la captura de imágenes de cada placa bajo el microscopio y posteriormente se confrontó estas imágenes con ciertas claves reportadas por algunos autores para la identificación de hongos.

# 3. CAPÍTULO: RESULTADOS

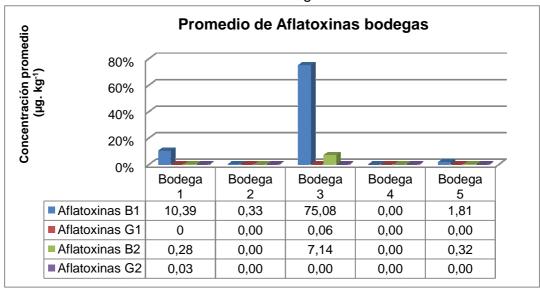
Como se mencionó en el capítulo 2, para la ejecución del presente trabajo se elaboró un plan de muestreo adaptado sobre la base del protocolo descrito por la FAO, en el *CODEX STAN 209 – 1999, Rev. 1- 2001,* en el cual se dividió en dos grupos al maní en granel comercializado en la ciudad de Sangolquí, en: supermercados y bodegas.

# 3.1. Grupo bodegas

#### 3.1.1. Análisis estadístico

En la gráfica 3.1 se muestra la tabla y gráfico de barras de los promedios de las 5 repeticiones que se realizaron en cada una de las bodegas que fueron evaluadas al azar en la ciudad de Sangolquí, estos datos demostraron que el contenido medio de aflatoxinas  $B_1$ ,  $G_1$ ,  $B_2$  y  $G_2$  presente en el maní a granel fue: 17,52; 0,01; 1,56 y 0,01  $\mu$ g.  $kg^{-1}$ , respectivamente.

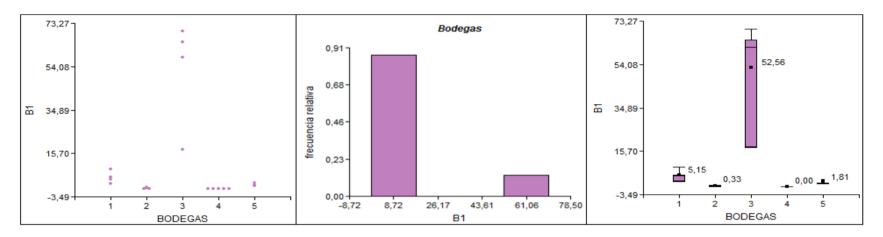
**Gráfica 3.1** Concentración promedio en μg. kg<sup>-1</sup> de aflatoxinas en las 5 muestras de bodegas



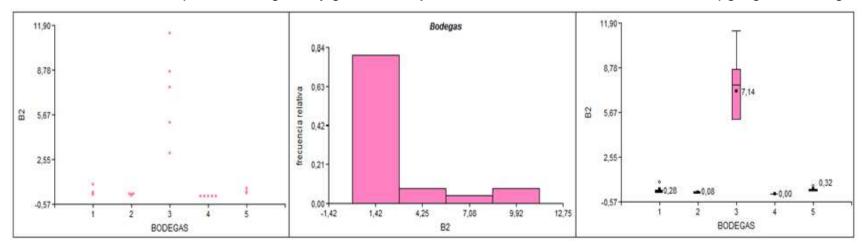
En la gráfica de promedios se observa que la concentración de aflatoxinas  $B_1$ ,  $B_2$ ,  $G_1$  y  $G_2$  en cada bodega es heterogénea y sus concentraciones no están relacionadas entre sí.

Al comparar los datos obtenidos de aflatoxinas con los valores permisibles de la Unión Europea y la FAO para el contenido total de aflatoxinas ( $Ver\ Anexo\ 2$ ) en maní destinado para algún procedimiento físico, se pudo valorar que existió una contaminación superior a los límites permisibles en dos bodegas debido a la alta concentración de aflatoxina  $B_1$ . Este único valor superó lo permisible por la Unión Europea, que es de 5  $\mu$ g. kg $^{-1}$  si el maní es para consumo humano directo y 8  $\mu$ g. kg $^{-1}$  si el mismo será sometido algún proceso físico antes del consumo humano. Sin embargo las aflatoxinas  $B_2$ ,  $G_1$  y  $G_2$  no superaron los límites permisibles.

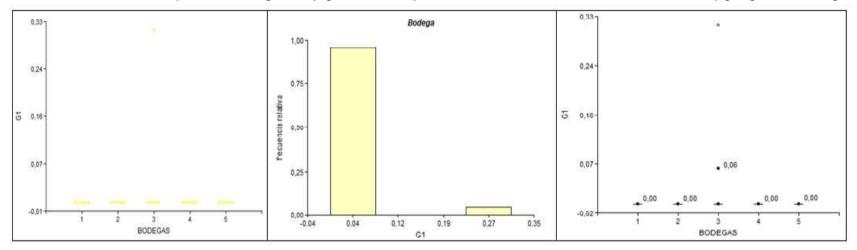
Gráfica 3.2 Densidad de puntos, histograma y gráfico de cajas de la concentración de aflatoxina B₁ en μg. kg⁻¹ en bodegas



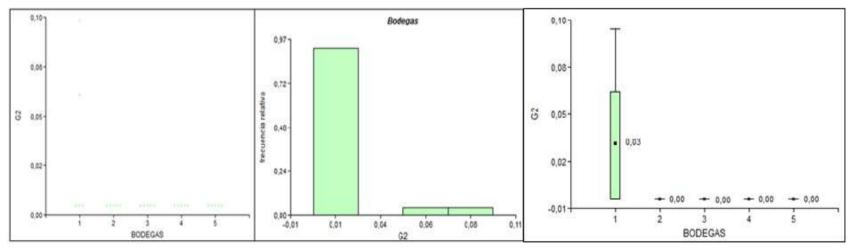
Gráfica 3.3 Densidad de puntos, histograma y gráfico de cajas de la concentración de aflatoxina B2 en µg. kg-1 en bodegas



Gráfica 3.4 Densidad de puntos, histograma y gráfico de cajas de la concentración de aflatoxina G<sub>1</sub> en µg. kg<sup>-1</sup> en bodegas



Gráfica 3.5 Densidad de puntos, histograma y gráfico de cajas de la concentración de aflatoxina G₂ en μg. kg⁻¹ en bodegas



Los gráficos de densidad de puntos 3.2; 3.3; 3.4 y 3.5 de cada aflatoxina permitió evidenciar una gran dispersión de los datos obtenidos para la concentración de aflatoxinas  $B_1$  y  $B_2$  en las bodegas que presentan una alta contaminación con estas toxinas; a diferencia, con las otras bodegas que mantuvieron constantes con la contaminación de estas toxinas; lo mismo se puede evidenciar en la gráfica de dispersión de puntos para la concentración de  $G_1$  y  $G_2$  en las que se observó el mismo comportamiento, es decir se mantuvieron constantes. Así mismo en las ilustraciones de los histogramas de cada una de las aflatoxinas evaluadas en bodegas se observó una inclinación positiva que se ajustaron a una distribución exponencial en las aflatoxinas  $B_1$  y  $B_2$ , sin embargo  $G_1$  y  $G_2$  no se ajustaron a ninguna distribución debido a que muchos de los valores de contaminación fueron nulos.

En los gráficos de cajas de cada una de las aflatoxinas se determinó una concentración de: 11,97  $\mu$ g. kg<sup>-1</sup> de B<sub>1</sub>; 1,56  $\mu$ g. kg<sup>-1</sup> de B<sub>2</sub>; 0,01  $\mu$ g. kg<sup>-1</sup> de G<sub>1</sub> y 0,01  $\mu$ g. kg<sup>-1</sup> de G<sub>2</sub>, lo que expone que la concentración de aflatoxina B<sub>1</sub> superó los límites permisibles por la FAO y Unión Europea a diferencia de las toxinas restantes que se encuentraron bajo el límite permisible.

#### 3.1.2. Análisis microbiológico de muestras de maní bodegas

Después de caracterizar morfológicamente a los hongos presentes en los granos de maní se procedió al análisis estadísticos de la frecuencia de aparición de cada uno de los géneros de hongos aislados en cada repetición. Cabe señalar que esto se aplicó exclusivamente para las muestras de maní que dieron resultados positivos de aflatoxinas de las bodegas muestreadas.

En las muestras de maní recolectadas de bodegas se obtuvo un total de siete géneros de hongos que se desarrollaron en las diferentes repeticiones con un total de 200 aislamientos, estos datos se presentan en la tabla 3.1.

**Tabla 3.1** Géneros de hongos aislados en bodegas

	BODEGAS								Total	
Géneros	В	1	В	2	В3		B5		Total	
aislados	Nro. A	%Nro.	Nro. A	%Nro.	Nro. A	%Nro.	Nro. A	%Nro.	Nro. TA	%Nro.
		Α		A		Α		Α		ΤA
Rhizopus	-	-	-		-	-	17	34%	17	9%
Aspergillus	27	54%	50	100%	50	100%	33	66%	160	80%
Penicillium	10	20%	-	-	-	-	-		10	5%
Fusarium	13	26%	-		-	-	-		13	7%
Total de	50		50		50		50		200	
Aislamientos										
Total de										
géneros	3			1 1		1	2		7	
aislados										

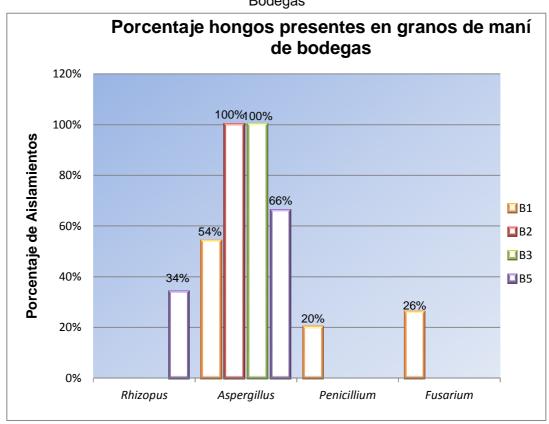
- Nro. A: Número de aislamientos (frecuencia de repeticiones del mismo género).
- %Nro A: Porcentaje del número de aislamientos de cada género.
- Nro. TA: Número total de aislamiento de cada género.
- %Nro. TA: Porcentaje del número total de aislamiento de cada género.

Los resultados obtenidos, que se anotan en la tabla 3.1, permitieron constatar que existe una mayor incidencia de *Aspergillus* con un 80%, además este hongo se encontró en los granos de maní de cuatro bodegas; a diferencia, de las otras tres especies de hongos que se encontraron únicamente en las repeticiones de ciertas bodegas; sin embargo, estos cuatro géneros de hongos: *Aspergillus, Penicillium, Rhizopus y Fusarium* son conocidos como hongos de almacenamiento y productores de micotoxinas como las aflatoxinas.

Con base a los datos de la tabla 3.1 se calcularon los porcentajes de prevalencia de cada uno de los géneros de hongos aislados en maní de cada una de las bodegas, para así poder establecer el género predominante dentro de las muestras de maní bodegas.

Como se indica en la gráfica 3.6 en las cuatro, muestras de maní de bodegas se presentó el género *Aspergillus*, de manera prevalente y en menor incidencia: *Rhizopus*, *Fusarium y Penicillum* respectivamente.

**Gráfica 3.6** Porcentaje de los géneros de hongos aislados de las muestras de maní en Bodegas

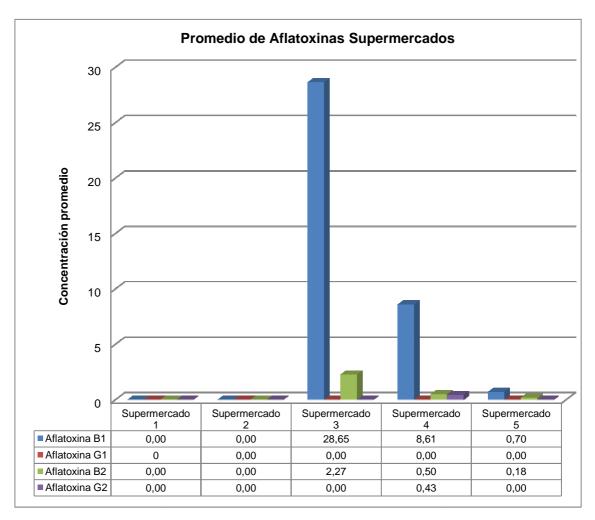


# 3.2. Grupo supermercados

#### 3.2.1. Análisis estadístico

En la gráfica 3.7 se muestra una tabla y gráfico de barras de los promedios de las 5 repeticiones que se realizaron en cada uno de los supermercados que fueron evaluadas al azar en la ciudad de Sangolquí, estos datos demostraron que el contenido medio de aflatoxinas  $B_1$ ,  $G_1$ ,  $B_2$  y  $G_2$  presente en el maní a granel fue: 7,59; 0,00; 0,59 y 0,09  $\mu$ g.kg<sup>-1</sup> respectivamente.

**Gráfica 3.7** Concentración promedio de aflatoxinas en µg. kg<sup>-1</sup> de 5 muestras de maní de supermercados

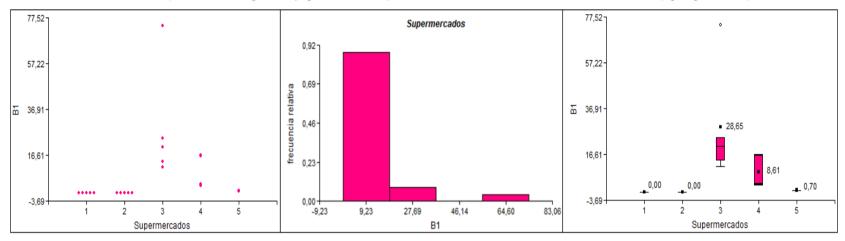


Al comparar los datos obtenidos de los promedios de aflatoxinas en maní con los valores permisibles de la Unión Europea y la FAO para el contenido total de aflatoxinas (*Ver anexo 2*) en maní destinado para algún procedimiento físico, se pudo valorar que existió una contaminación superior a los límites permisibles en dos de los supermercados debido a la alta concentración de aflatoxina B<sub>1</sub>. Este único valor superó a lo permisible tanto por la FAO y la Unión Europea, que es de 5 μg. kg<sup>-1</sup> si el maní es para consumo humano directo y 8 μg. kg<sup>-1</sup> si el mismo será sometido algún procedimiento físico. Sin embargo las aflatoxinas B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> no superaron los límites permisibles.

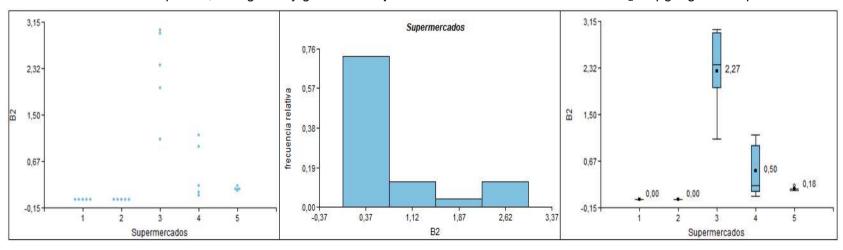
En las ilustraciones de los histogramas 3.8; 3.9 y 3.11 de cada una de las aflatoxinas evaluadas en bodegas se observó una inclinación positiva que se ajustó a una distribución exponencial en las aflatoxinas  $B_1$  y  $B_2$ , sin embargo  $G_2$  no se ajustó a ninguna distribución debido a que muchos de los valores de contaminación fueron nulos.

La aflatoxina G1 en los 5 supermercados presentó una contaminación nula, es decir no se obtuvo valores que permitieran realizar análisis estadístico por esta razón no se presentó histograma de esta toxina.

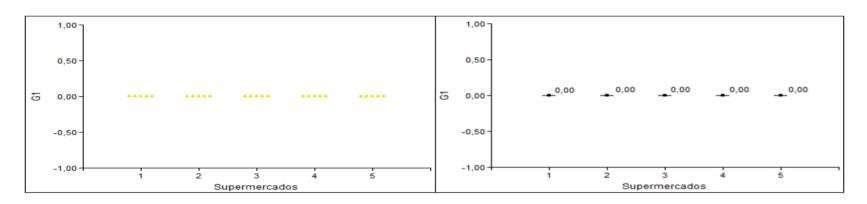
**Gráfica 3.8** Densidad de puntos, histograma y gráfico de cajas de la concentración de aflatoxina B<sub>1</sub> en μg. kg<sup>-1</sup> en supermercados



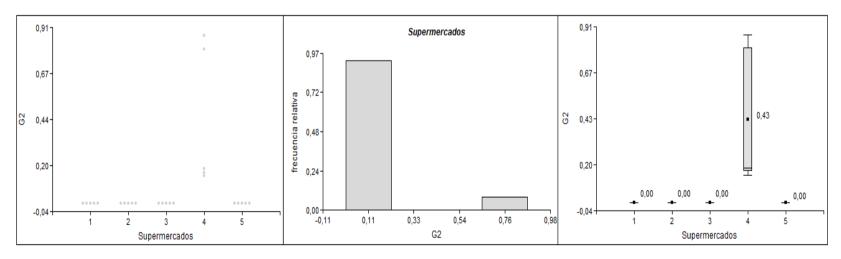
Gráfica 3.9 Densidad de puntos, histograma y gráfico de cajas de la concentración de aflatoxina B₂ en μg. kg⁻¹ en supermercados



**Gráfica 3.10** Histograma y gráfico de cajas de la concentración de aflatoxina G<sub>1</sub> en µg. kg<sup>-1</sup> en supermercados



Gráfica 3.11 Densidad de puntos, histograma y gráfico de cajas de la concentración de aflatoxina G2 en µg. kg¹ en supermercados



En los gráficos de densidad de puntos 3.8 y 3.9 de cada aflatoxina permitió evidenciar una gran dispersión de los datos obtenidos para la concentración de aflatoxinas B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> en supermercados, lo que representan una alta y heterogénea contaminación con esta toxinas, estos datos contrastan con los obtenidos de las aflatoxinas G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> que se mantuvieron constantes en los cinco supermercados evaluados. En los gráficos de cajas de cada una de las aflatoxinas se determinó un promedio de la concentración media de: 7,59 μg. kg<sup>-1</sup> de B<sub>1</sub>; 0,59 μg. kg<sup>-1</sup> de B<sub>2</sub>; 0,00 μg. kg<sup>-1</sup> de G<sub>1</sub> y 0,09 μg. kg<sup>-1</sup> de G<sub>2</sub>, lo que expuso que la concentración de aflatoxina B<sub>1</sub> superó los límites permisibles por la Unión Europea para consumo directo, pero no superó los límites permisibles para maní que va a ser sometido algún procedimiento físico, lo mismo aconteció con las aflatoxinas restantes que se encontraron bajo el límite permisible tanto por la FAO y la Unión Europea.

#### 3.2.2. Análisis microbiológico de muestras de maní supermercados

Después de caracterizar morfológicamente a los hongos presentes en los granos de maní se procedió al análisis estadísticos de la frecuencia de aparición de cada uno de los géneros de hongos aislados en cada repetición. Cabe señalar que esto se aplicó exclusivamente para las muestras de maní que dieron resultados positivos de aflatoxinas de los supermercados muestreados.

En las muestras de supermercado se obtuvo un total de seis géneros de hongos que se desarrollaron en las diferentes repeticiones de maní recolectados de un total de 150 aislamientos, estos datos se presentan en la tabla 3.2

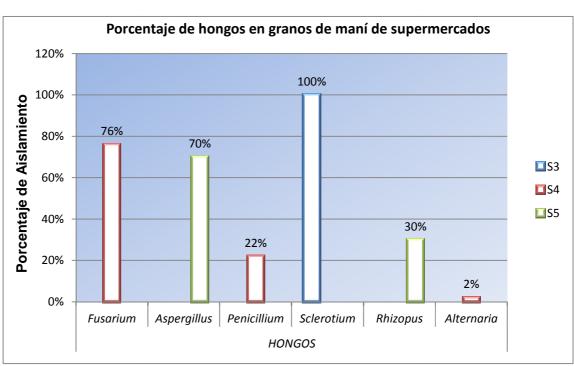
**Tabla 3.2** Géneros de hongos aislados en supermercados

		Total								
Géneros aislados		<b>S</b> 3	S4			S5	. otal			
uisiduos	Nro. A	%Nro. A	Nro. A	%Nro. A	Nro. A	%Nro. A	Nro. TA	%Nro. TA		
Rhizopus	-	-	-	-	15	30%	15	10%		
Aspergillus			-	-	35 70%		35	23%		
Penicillium	-			22%			11	7%		
Fusarium			38	76%			38	25%		
Alternaria			1	2%			1	1%		
Sclerotium	50	100%	-	-	-	-	50	33%		
Total de Aislamientos	50		50		50		150			
Total de géneros aisla.	1			3		2	6			

- Nro. A: Número de aislamientos (frecuencia de repeticiones del mismo género).
- %Nro A: Porcentaje del número de aislamientos de cada género.
- Nro. TA: Número total de aislamiento de cada género.
- %Nro. TA: Porcentaje del número total de aislamiento de cada género.

Los resultados presentados en la tabla 3.2, permitieron constatar que existe una gran variedad de hongos presentes en las muestras de supermercados, sin presentarse ningún hongo en mayor rango, sin embargo los géneros que se pudieron aislar de estas muestras son hongos en la mayoría de almacenamiento a diferencia de *Sclerotium* que es un hongo que se encuentra principalmente en campo pero que se presentó contaminando un 100% a las muestras del supermercado 3.

Con base a los datos de la tabla 3.2 se calculó el porcentaje de prevalencia de cada uno de los géneros de hongos aislados en muestras de granos de maní de cada uno de los supermercados, para así poder establecer el género de hongo predominante en las muestras de maní, pero se comprobó que en cada sitio de muestreo se presentaron diferentes tipos de géneros de hongos, como se indica en la gráfica 3.12 en las tres muestras de supermercados, se presentaron de mayor a menor frecuencia los siguientes géneros: Fusarium, *Aspergillus, Penicillum y Alternaria* respectivamente.



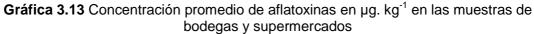
**Gráfica 3.12** Porcentaje de los géneros de hongos aislados de las muestras de maní de Supermercados

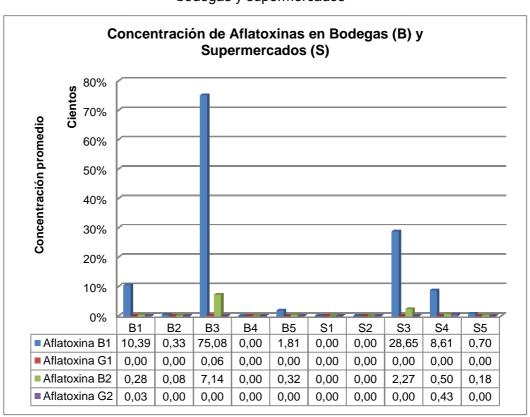
#### 3.3. Análisis comparativo

#### 3.3.1. Análisis estadístico

En la gráfica 3.13 se muestra una tabla donde se registran las cantidades promedio de aflatoxinas determinadas en muestras de maní adquiridas en

bodegas y supermercados que fueron evaluados en la ciudad de Sangolquí, detectadas por cromatografía; de esto se concluyó que a nivel de bodega la cantidad de granos de maní contaminados con aflatoxinas fueron mayores con relación a lo determinado en supermercados. Adicionalmente, se debe enfatizar que en muestras tomadas en una bodega y dos en supermercados no presentaron contaminación de aflatoxinas. Estos datos demostraron que el contenido medio de aflatoxinas B<sub>1</sub>, G<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> y G<sub>2</sub> presente en el maní a granel muestreado en bodegas y supermercados fue: 12,56; 0,01; 1,08 y 0,05 µg. kg<sup>-1</sup> respectivamente.





Al comparar los datos generales de aflatoxinas en maní con los valores permisibles por la Unión Europea y la FAO para el contenido total de aflatoxinas en maní destinado para algún procedimiento físico, se pudo valorar que existe una contaminación que está entre estos límites, sin embargo las concentraciones

de aflatoxinas  $B_1$  encontradas tanto en bodegas y supermercados sobrepasan los límites permitidos por la Unión Europea para consumo humano directo, que es de 5  $\mu$ g.  $kg^{-1}$  en el caso de supermercados y en bodegas esta aflatoxina sobrepasa los 8  $\mu$ g.  $kg^{-1}$  que es valor permitido si el maní va a ser sometido algún procedimiento físico.

La sumatoria total de aflatoxinas tanto de bodegas y supermercados dio como promedio general 13,69 µg. kg<sup>-1</sup>, este valor se encuentra bajo el nivel permitido por la FAO para maní a granel destinado para procedimientos industriales ulteriores.

Con una prueba de hipótesis establecida (*Ver Anexo 4*), se realizaron intervalos de confianza para la concentración de aflatoxinas B<sub>1</sub>; B<sub>2</sub>; G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> presentes en maní a granel, con un 90% de confianza se determinó la concentración media real de la aflatoxinas en maní.

Debido a que las concentraciones de aflatoxinas que se encontraron en las muestras de maní a granel, fueron heterogéneas, se elaboró intervalos de confianza entre valores que iban desde concentraciones nulas hasta 5 µg. kg<sup>-1</sup> e intervalos de confianza a partir de concentraciones superiores a 5 µg. kg<sup>-1</sup>, de cada aflatoxina presente en supermercados, bodegas y en forma global. Estos intervalos se presentan en la tabla 3.3.

**Tabla 3.3** Intervalos de confianza para aflatoxinas B<sub>1</sub>; B<sub>2</sub>; G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> clasificadas por sitio de procedencia y global con una probabilidad del 90%.

INTERVALOS DE CONFIANZA											
	SITIOS	Límites									
	011100	< 5 μg. kg <sup>-1</sup>	> 5 μg. kg <sup>-1</sup>	Total							
	Bodegas	[0,49 > µg B <sub>1</sub> < 1,56]	[17,65 > μg B <sub>1</sub> < 87,51]	[4,73> µg B <sub>1</sub> < 30,32]							
B <sub>1</sub>	Supermercados	[0,24> μg B <sub>1</sub> < 1,27]	[9,12> μg B <sub>1</sub> < 41,22]	[2,23> µg B <sub>1</sub> < 12,95]							
Global		[0,61> μg B <sub>1</sub> < 1,41]	[22,16> µg B <sub>1</sub> < 62,35]	[5,73> μg B <sub>1</sub> < 19,39]							
	Bodegas	[0,00> μg B <sub>2</sub> < 0,55]	[5,16 > μg B <sub>1</sub> < 11,22]	[0,49> μg B <sub>2</sub> < 2,64]							
B <sub>2</sub>	B <sub>2</sub> Supermercados	[0,26> µg B <sub>2</sub> < 0,92]	-	$[0.26> \mu g B_2 < 0.92]$							
Global		[0,25 > μg B <sub>2</sub> < 0,67]	[0,26> µg B <sub>2</sub> < 11,22]	[0,52> µg B <sub>2</sub> < 1,64]							
	Bodegas	[0,00> μg G <sub>1</sub> < 0,03]	-	[0,00> µg G <sub>1</sub> < 0.03]							
G₁	Supermercados	[0,00> μg G <sub>1</sub> < 0,02]	-	[0,00> µg G <sub>1</sub> < 0,00]							
	Global	[0,00> μg G <sub>1</sub> < 0,02]	-	[0,00> μg G <sub>1</sub> < 0,02]							
	Bodegas	[0,00> μg G <sub>2</sub> < 0,01]	-	[0,00> μg G <sub>2</sub> < 0,01]							
G <sub>2</sub>	Supermercados	[0,01> μg G <sub>2</sub> < 0,07]	-	[0,01> μg G <sub>2</sub> < 0,07]							
	Global	[0,01> µg G <sub>2</sub> < 0,09]	-	[0,01> µg G <sub>2</sub> < 0,09]							

En la tabla 3.3 se confirmó que la concentración media de aflatoxinas  $B_1$ ;  $B_2$ ;  $G_1$  y  $G_2$  en la categoría de valores menores a 5  $\mu$ g.  $kg^{-1}$ , no superaron los límites permisibles por la Unión Europea. A diferencia de los valores de aflatoxinas de  $B_1$  y  $B_2$  categorizados en niveles superiores de 5  $\mu$ g.  $kg^{-1}$  que superaron el límite permisible, las concentraciones de aflatoxinas  $G_1$  y  $G_2$  no superaron los 5  $\mu$ g.  $kg^{-1}$  por lo tanto no entraron en este rango.

De la misma forma en la tabla 3.3 se determinaron las concentraciones medias totales de aflatoxinas  $B_1$ ;  $B_2$ ;  $G_1$  y  $G_2$ . Los valores obtenidos de las aflatoxinas  $B_2$ ;  $G_1$  y  $G_2$  no superaron los límites permisibles por la Unión Europea (5 a 8 µg. kg<sup>-1</sup>). Sin embargo la concentración de aflatoxinas  $B_1$  superó esta normativa, tanto en bodegas y supermercados. Los resultados obtenidos a partir de estos intervalos de confianzas permitieron calcular que existe un 30% de la población global contaminada por  $B_1$  en niveles mayores a 5 µg. kg<sup>-1</sup>.

#### 3.3.2. Análisis microbiológico

Después de aislar e identificar los géneros de hongos presentes en granos de maní tanto en bodegas como supermercados, se calcularon los porcentajes de frecuencia de cada una de los géneros aislados en granos de maní de cada uno de los sitios muestreados.

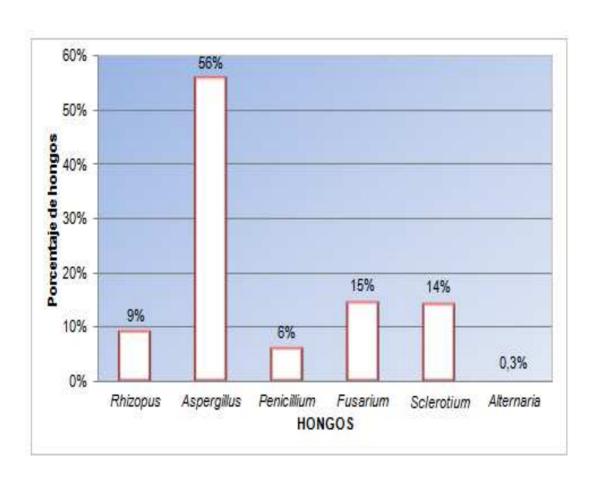
En la tabla 3.4 se presenta de incidencia para cada género fúngico con el fin de establecer los géneros más predominantes en los sitios muestreados.

**Tabla 3.4** Porcentajes globales de hongos aislados de granos de maní que se expenden en bodegas y supermercados, de la jurisdicción de la ciudad de Sangolquí.

	MUESTRAS													Total		
Géneros aislados	S3		S	S4		S5	B1		B2		В3		B5		1014	
	Nro. A	%Nro. A	Nro. A	%Nro. A	Nro. A	%Nro. A	Nro. A	%Nro. A	Nro. TA	%Nro. TA						
Rhizopus	-	-	-	-	15	30%	-	-	-	-	-	-	17	34%	32	9%
Aspergillus	-	-			35	70%	27	54%	50	100%	50	100%	33	66%	195	56%
Penicillium	-	-	11	22%	-	-	10	20%	-	-	-	-	-		21	6%
Fusarium	-	-	38	76%	-	-	13	26%	-	-	-	-	-		51	15%
Alternaria	-	-	1	2%	-	-									1	0,3%
Sclerotium	50	100%	-	-	-	-									50	14%
Total de Aislamientos	50		50 50		50	50		50		50		50		350		
Total de géneros aislados	1 3		2		3		1		1		2		13			

Como se indica en la tabla 3.4 los principales géneros que se presentaron con mayor incidencia en bodegas y supermercados fueron: *Aspergillus* con un 56% *Fusarium* con 15%, *Rhizopus* con 9% y *Penicillium* con 6%. En contraste las especies con menor incidencia y presentes únicamente en las muestras de supermercados fueron: *Sclerotium* con 14% y *Alternaria* con 0,3%. Todas estas variedades de hongos hacen parte de los hongos característicos de almacenamiento con excepción de *Sclerotium* que es hongo de suelo. En la gráfica 3.14 se presenta los porcentajes globales de cada género de hongo aislados de granos de maní, que fueron muestreados en bodegas y supermercados.

**Gráfica 3.14** Porcentaje global de hongos aislados en muestras de maní a granel comercializados en bodegas y supermercados



## 4 CAPÍTULO: DISCUSIÓN

La economía rural del Ecuador está constituida fundamentalmente por la agricultura, por tal razón es la primera actividad económica de los pequeños y medianos productores campesinos en el Ecuador. Se conoce que los cultivos de maní en el Ecuador representan actividades de tipo familiar. Según datos publicados por el INIAP hasta el año 2004 el rendimiento medio anual no superaba los 1000 kg.ha<sup>-1</sup>. En la actualidad se reporta una siembra anual establecida entre 12 000 y 15 000 hectáreas de Maní, principalmente en las provincias de Loja, Manabí y El Oro, las principales razones de los bajos rendimientos son: utilización de semillas sin certificación, falta de riego e incidencia de plagas y enfermedades (Ayala, 2009; Chamba 2006).

De igual forma los datos presentados por el Banco Central del Ecuador (2011), señalan que el maní es un producto oleaginoso cultivado en nuestro país, pero su producción no alcanza a cubrir las necesidades de consumo interno, existiendo un déficit en el mercado para las industrias lo que ha ocasionado la importación del maní para cubrir las necesidades del producto, sin embargo la falta de programas que supervisen la inocuidad de alimentos con respecto a la contaminación por micotoxinas tanto de productos producidos en el país como también de productos importados, impide estimar la exposición de micotoxinas en la población ecuatoriana.

La presente investigación permitió evaluar los niveles de aflatoxinas  $B_1$ ,  $B_2$ ,  $G_1$  y  $G_2$ , y caracterizar morfológicamente a los hongos contaminantes del maní a granel comercializado en bodegas y supermercados en la ciudad de Sangolquí. Los porcentajes de muestras no contaminadas dentro de bodegas y supermercados varían en un intervalo de 20% a 40% de los productos contaminados. Las muestras que presentaron niveles totales bajo el límite permitido de 15  $\mu$ g.kg<sup>-1</sup> representaron un 70% de las muestras totales, como se presentan en la gráfica 3.13. Sin embargo los porcentajes de las muestras que

presentan contaminación sobre los límites fue bastante variable tanto en bodegas como en supermercados. Al respecto Pereira (2005), sugiere que los productos que son susceptibles a contaminaciones fúngicas y de micotoxinas como lo es el maní, necesitan ser objeto de constante evaluación para prevenir inconvenientes futuros en la salud pública, que es el objeto que persiguió esta investigación.

Los resultados presentados en la gráfica 3.1 de las muestras de bodegas revelan que en un 60% del total de muestras existe una elevada contaminación con aflatoxina  $B_1$  que supera los límites permisibles según las normas de la Unión Europea; en efecto, se encontraron valores que superaban los límites de 5 y 8 ppb ( $\mu$ g.kg<sup>-1</sup>), los valores de esta toxina oscilaron entre: [17,65 >  $\mu$ g  $B_1$  < 87,51] de igual forma se encontró que en un 20% de las muestras totales de bodegas superó los límites de 5 ppb en aflatoxina  $B_2$  los valores oscilaron entre: [5,16 >  $\mu$ g  $B_1$  < 11,22]. Sin embargo, los resultados obtenidos de aflatoxinas  $G_1$  y  $G_2$  indican que los valores detectados de estas toxinas no superaron los parámetros permisibles, o límites de tolerancia, está variabilidad se debe principalmente a factores ambientales presentes durante la cosecha y almacenamiento que no son constantes y permite un crecimiento significativo de hongos, de la misma manera se ha visto que en maní sin cascara presenta mayores tazas de contaminación que en maní con cáscara, este hecho es justificado por la manipulación sin higiene adecuada que tiene el maní sin cáscara (Schneider & Pinheiro, 2007).

En las muestras analizadas de supermercados se obtuvo similares resultados (gráfica 3.7) a los conseguidos en las muestras de bodegas, las muestras contaminadas con aflatoxinas representaron un 40% del total de las muestras analizadas, la concentración de aflatoxina B<sub>1</sub> superó los límites permisibles por la Unión Europea sus valores oscilaron entre: [2,23> μg B1 < 12,95], a pesar que los niveles no son tan altos como los obtenidos en bodegas, superan los límites permisibles. Similar al estudio desarrollado por Pereira (2005), las muestras de maní de supermercados frente a las muestras obtenidas en bodegas presentaron diferencias significativas en los níveles de contaminación

debido a la manipulación que tiene el alimento en cada uno de los sitios mencionados.

La heterogeneidad valorada de aflatoxinas  $B_1$ ,  $B_2$ ,  $G_1$  y  $G_2$  en las muestras de maní de bodegas y supermercados se comprueban en las ilustraciones 3.3, 3.4, 3.5, 3.7, 3.8, 3.9, 3,10 y 3.11. Las aflatoxinas  $B_1$ ,  $B_2$  se ajustan a un modelo exponencial, mientras que  $G_1$  y  $G_2$  no se ajustan a ningún modelo ya que sus valores son en su mayoria nulos y no representan ningún intervalo a evaluar (Barón *et al* 2012). De igual forma la gráfica de cajas presenta una gran variabilidad en las medias obtenidas en cada sitio evaluado para cada aflatoxina, pero sin duda la concentración de aflatoxina  $B_1$  presenta nieveles medios que pasan los límites permisibles, resultados similares han sido reportados en América Latina, Rocha (2008) reafirma que estos resultados de contaminaciones heterogeneas y elevadas son frecuentemente monitoreados en maní debido a las prácticas inadecuadas en agricultura y almacenamiento.

De las diez muestras totales analizadas entre bodegas y supermercados, se determinó la presencia de aflatoxinas en siete muestras, con las cuales se realizó un total 350 aislamientos como se presenta en la tabla 3.4, distribuidas como sigue: 9% *Rhizopus*, 56% *Aspergillus*, 6% *Penicillium*, 15% *Fusarium*, 0,3% *Alternaria* y 14% *Sclerotium*. En total se aislaron seis géneros de hongos en muestras de maní procedentes de bodegas y supermercados; con toda seguridad diversos factores ambientales influenciaron en su presencia; en efecto, Schneider & Pinheiro (2007) manifiestan que la humedad, temperatura, presencia de oxígeno, constitución de sustrato, fuentes de nitrógeno y carbono, pH y presencia de iones metálicos son algunos de los factores que favorecen el crecimiento y multiplicación de los hongos. El maní y maíz por su composición en nutrientes son los productos más susceptibles para la contaminación de hongos productores de aflatoxinas (Sabino 1988).

García y Martínez (2006) mencionan a los hongos: *Rhizopus, Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, y *Alternaria* como principales productores de micotoxinas en condiciones naturales en diversos productos agrícolas como el maní; sin

embargo, ICA (1984) en su informe sobre micotoxinas afirma que la presencia de estos hongos tanto en campo como en almacenamiento dependen de las condiciones ambientales y físicas especialmente de la humedad relativa. Generalmente estos hongos de cosecha desaparecen en condiciones de almacenamiento y comienzan a manifestarse otro tipo de hongos de almacenamiento como: *Aspergillus y Penicillium*.

Similar al estudio realizado por Zorzete (2010) en Brasil las muestras de maní procedentes de bodegas presentaron una mayor frecuencia de aislamiento de: Aspergillus, Penicillium, Rhizopus y Fusarium (Tabla 3.1), factores como la humedad relativa del ambiente y composición del producto favorecen el crecimiento de hongos que muchas de las veces provienen del campo (Zorzete, 2010). Estos géneros de hongos además de ser conocidos como hongos de almacenamiento son conocidos como los principales hongos productores de aflatoxinas (Soriano, 2007). Similares resultados fueron obtenidos en las muestras de maní obtenidos en bodegas; sin embargo, las muestras de supermercados presentaron una menor frecuencia en aislamientos de: Aspergillus, Rhizopus y Fusarium (Tabla 3.2), pero también se observó el desarrollo de esclerocios que por la morfología que presentaron estas estructuras de supervivencia se determinó que se trataba de esclerocios de Sclerotium, (muy probable Sclerotium rolfsii) este hongo patógeno del maní está presente principalmente en el suelo, pero que en condiciones de alta temperatura, buena aireación, presencia de material vegetal en descomposición y hospederos susceptibles los puede predisponer de este género (Monge, 1994). De acuerdo a Agrios (1986) este hongo aparte de causar infecciones en el campo, también se manifiesta en almacenamiento donde ante condiciones adecuadas de humedad y temperatura pueden desarrollar la "pudrición blanca", característica de este género. Adicionalmente, el grano infectado por el hongo (micelio) constituye una fuente primaria de inóculo.

Las muestras de maní recolectadas en supermercados a diferencia de las muestras de recolectadas en bodegas presentaron menores niveles de contaminación tanto de aflatoxinas como también una disminución en la presencia

de hongos de almacenamiento, esto se debe a los procesos de poscosecha a que son sometidos las muestras de maní, muchas de ellas son selladas al vacio y este tipo de embalaje impide que el producto esté comprometido a condiciones que pueden favorecer al crecimiento de hongos como también a la producción de aflatoxinas (Pereira, 2005).

En resumen, se encontró que la principal aflatoxina que está contaminando el maní a granel comercializado en bodegas y supermercados en la ciudad de Sangolquí fue la aflatoxina  $B_1$ , las concentraciones de aflatoxinas  $B_2$ ,  $G_1$  y  $G_2$  no superan los límites permisibles normalizados por la Unión Europea para el consumo humano, de igual forma la presencia de hongos de almacenamiento como: *Aspergillus, Penicillium, Rhizopus* y *Fusarium* indican que poseen las condiciones óptimas para su crecimiento.

Tomando en cuenta el argumento de Schneider (2007) que describe al maní como un alimento que presenta las condiciones favorables para la contaminación de aflatoxinas debido a su composición nutritiva, considerando, que la aflatoxina B<sub>1</sub> de acuerdo a la Agencia Internacional de Investigaciones para el cáncer está clasificada dentro del primer grupo de sustancias cancerígenas (EFSA, 2004), la presente investigación determinó que el 70% de las muestras de maní presentaron moderados y altos niveles de contaminación de aflatoxinas en especial de aflatoxina B<sub>1</sub> además de la presencia de hongos productores de aflatoxinas como *Aspergillus, Rhizopus y Penicillium* en un 71% de las muestras contaminadas puede de alguna manera confirmar lo citado por Vallejo (2011) sobre los datos estadísticos de epidemiología del cáncer en Quito 2003-2005, obtenidos del hospital "Sociedad de lucha contra el cáncer" (SOLCA) que indican un incremento en la incidencia de cáncer del hígado en el Ecuador, definiendo entre unos de los factores de riesgo el consumo de alimentos contaminados por aflatoxinas.

En una recopilación de publicaciones sobre aflatoxinas, realizada en los países de América del Sur en la última década, señala a Colombia y Venezuela como los países que presentan mayor contaminación de aflatoxinas en alimentos

y granos destinados al consumo humano. Brasil, Argentina, Uruguay y en cierto modo también Venezuela y Colombia han desarrollado investigaciones y publicado la mayor cantidad de informes sobre aflatoxinas, mientras que en Bolivia, Chile, Ecuador y Perú existen pocos estudios sobre aflatoxinas (Pereira, 2005). El tema de inocuidad alimentaria a llevado a la mayoría de países a nivel mundial a tomar medidas fitosanitarias, que son establecidas por normativas, las mismas han sido creadas a partir de reglamentos internacionales como lo es el *CODEX* alimentario.

Hoy en día en el Ecuador se está elaborando textos sobre materia agroalimentaria con la ayuda de organizaciones internacionales como la FAO, pero sería de vital importancia que en estos textos se tome en cuenta generar en nuestro país reglamentos que permitan el control de los niveles permisibles para este tipo de toxinas.

En el Ecuador, la ley orgánica de soberanía alimentaria reformada y expedida en el 2010, detalla que tiene como objeto: "Establecer los mecanismos mediante los cuales el Estado cumpla con su obligación y objetivo estratégico de garantizar a las personas, comunidades y pueblos la autosuficiencia de alimentos sanos, nutritivos y culturalmente apropiados de forma permanente."

Asimismo en el capítulo IV de esta ley hace referencia a la sanidad e inocuidad alimentaria y describe lo siguiente:

Artículo 24. Finalidad de la sanidad.- La sanidad e inocuidad alimentaria tienen por objeto promover una adecuada nutrición y protección de la salud de las personas; y prevenir, eliminar o reducir la incidencia de enfermedades que se puedan causar o agravar por el consumo de alimentos contaminados.

La presente investigación aporta a la sanidad e inocuidad alimentaria del País ya que los resultados obtenidos demuestran que no se se ejecutan labores agronómicas idóneas y no se tiene prácticas de higiene aptas durante el proceso y conservación de los alimentos. En consecuencia, el control debe ser reforzado, mediante políticas permanentes que se fundamentan en los adelantos técnicoscientíficos actuales, que tiendan a la vigilancia de la salud en un intento de reducir

la exposición de la población a estas sustancias, y también evitar el consumo de estos alimentos, porque la alta exposición que hoy en día tienen los ecuatorianos puede conducir a serios problemas de salud.

# 5 CAPÍTULO: CONCLUSIONES.

- La presencia de aflatoxinas en maní a granel comercializado en la ciudad de Sangolqui en bodegas y supermercados fue demostrada analíticamente con la utilización de columnas de inmunoafinidad y Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC), señalando que se registró niveles por encima de los límites permisibles para aflatoxina B<sub>1</sub> y aflatoxinas totales y normalizado por la FAO (15 μg.kg<sup>-1</sup>) y Unión Europea (5-8 μg.kg<sup>-1</sup>).
- Se determinó alta heterogeneidad en la concentración de aflatoxinas en muestras de maní que se evidenció en las repeticiones realizadas de cada sitio muestreado.
- La ocurrencia de aflatoxinas en las muestras de maní fue del 70% sin clasificar su origen, de las cuales el 57% de las muestras presentaron niveles superiores de aflatoxina B₁ a los límites permisibles por la Unión Europea para el consumo directo del maní. Las concentraciones de las aflatoxinas B₂, G₁ y G₂ cumplieron con los límites de control; sin embargo, un 42% de las muestras que presentaron contaminación de aflatoxinas superaron el límite permisible por la FAO para aflatoxinas totales.
- Se constató la presencia de los géneros de hongos de almacenamiento: *Aspergillus, Penicillium y Fusarium* en las muestras de maní de supermercados y bodegas, su presencia confirma la falta de precaución en el manejo de post cosecha lo que favorece a la proliferación de los hongos micotoxicos.

### **6 CAPÍTULO: RECOMENDACIONES**

- Se recomienda realizar una evaluación de la contaminación de aflatoxinas en diferentes etapas del ciclo productivo del maní y en lugares de almacenamiento, desde su cosecha hasta su comercialización, para diagnosticar los puntos críticos en los que pueden ser afectada las condiciones sanitarias del grano de maní
- Realizar análisis de micotoxinas en productos elaborados a partir de maní como: confitería, mantequilla y pasta de maní que representan una preocupación adicional, en vista que en la materia prima puede estar contaminada con aflatoxinas.
- Ejecutar un análisis comparativo entre las diferentes variedades de maní que son cultivadas en nuestro país, para evaluar la posibilidad de ocurrencia de alguna variedad (s) que sean resistentes a contaminaciones tanto fúngicas como de aflatoxinas.
- Se recomienda para futuras investigaciones que la evaluación de aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> sea independiente ya que sus niveles pueden ser muy heterogéneos tal como se obtuvo en la presente investigación, siendo la concentración de aflatoxina B<sub>1</sub> la más elevada, superando el límite permisible recomendado por la Unión Europea.
- Se recomienda caracterizar mediante técnicas moleculares las especies de hongos que están involucrados con la infección de los granos de maní tanto en condiciones de campo como en almacenamiento.

- Implementar en el país controles de calidad e inocuidad alimentaria de los sistemas como: BPM, BPAL que permita a los productores como a los consumidores expender productos de calidad libres de contaminantes o con niveles bajos respecto a los límites permisibles para que no afecten a la salud pública.
- Se recomienda desarrollar en el Ecuador normativas que permitan controlar los niveles de contaminación de aflatoxinas en los alimentos, ya que en la presente investigación se encontró niveles preocupantes de contaminación de aflatoxina B₁.
- Mantener niveles de humedad relativa inferiores al 65%, temperaturas bajo los 20 °C y libre de material extraño, que permita que el maní a granel pueda mantenerse durante meses en almacenamiento sin presentar algún deterioro por presencia de microorganismos y así evitar la contaminación de aflatoxinas.

# 7 CAPÍTULO: REFERENCIAS

- Agriculture Research Service. (2005, 07 01). Retrieved 11, 19, 2011, from
   Protecting Peanuts from Aflatoxin:
   http://www.ars.usda.gov/is/AR/archive/jan02/peanut0102.htm
- Agrio, G.N. (1986). Fitopatología. Editorial LIMUSA, S.A. de C. V. México,
   756.
- Aguirre, F. E. (2006). Diseño de un secador rotativo de vainas de maní para pequeños productores. Quito: EPN, 1-27.
- Altech. (2005). Análisis de Micotoxinas. El reto mundial del sinergismo.
  Retrieved 11 19, 2011, from http://www.engormix.com/MA-balanceados/articulos/analisis-micotoxinas-reto-mundial-t136/p0.htm#4
- American Cancer Society. (2011). Cáncer de hígado. U.S.A: American Cancer Society.
- AOAC. (2005). ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMIST. En
   AOAC. United States of America: AOAC International, 32-37.
- Arauz, L. (1998). Fitopatologia. Costa Rica: UCR, 62-65.
- Ayala, C. (2009). Estudio de prefactibilidad para la producción y comercialización de maní (Arachis hypogaea L) en el cantón Jipijapa, provincia de Manabí. Ecuador: Universidad San Francisco de Quito, 34-35.

- Barnet, H. L., & Hunter, B. B. (1998). Ilustrated Genera of Imperfect Fungi.
   USA: Editorial APS Press, 34-197.
- Barón, F., Ríus, F., & Sánchez, E. (24 de 06 de 2012). Bioestadística.
   Obtenido de http://www.bioestadistica.uma.es/libro/
- Cañedo, V., & Ames, T. (2004). Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos. Perú: Centro Internacional de la papa CIP, 5-47.
- Carvajal, M. (2000). Investigación sobre Aflatoxinas. Mexico: UNAM.
- Castillo, L. (2000). Los hongos de los alimentos y forrajes.
- Chamba, D. (2006). Análisis de la cadena de maní en el cantón Paltas.
   Loja: FACES, 2-6.
- Combita, A., & Mildenberg, S. (2009). Detección de aflatoxinas M1 en leches frescas comercializadas en la zona del Cauca. Bogota: Universidad Javeriana, 49-54.
- Cornejo, J., & Villarroel, O. (2006). Antecedentes generales sobre las aflatoxinas y otras micotoxinas y elementos a tener en cuenta para el diseño de prácticas correctas de cultivo y elaboración de nueces. Chile: Departamento de alimentos y nutrición del gobierno de Chile.
- Delgado, G., & Hernández, N. (2009). Evaluación de la incertidumbre en la determinación de aflatoxinas B1 en maní de exportación por HPLC-FD.
   Nicaragua: Editorial universitaria, 5-8.

- Departament of animal Science. (26 de 03 de 2009). Plants Poisonous to Livestock. Nueva York, EEUU.
- Dietzgen, R. G. (1999). Elimination of Aflatoxin contamination in Peanuts.
   Aflatoxin-Importance and current control strategies. Canberra, Australia:
   Australia Center for international Agricultura Research.
- EFSA. (2004). Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to Aflatoxin B1 as undesirable substance in animal feed. *The EFSA Journal*, 1-27.
- Falconí, C. (1998). Fitopatología Práctica. Sangolquí, Ecuador: EDIESPE.
- FAO. (1993a). Sampling plans for aflatoxin analysis. Roma: FAO, 1-15.
- FAO. (2003b). Comisión del codex alimentarius. Rotterdam: Organización mundial de la salud, 17-24.
- French, E. R., & Herbert, T. T. (1982). Métodos de Investigación Fitopatológica. San José, Costa Rica: Instituto de Cooperación para la Agricultura ICA, 57-60.
- Fermentek biotechnology. (2010). Aflatoxin . Retrieved from http://www.fermentek.co.il/aflatoxin\_B2.htm
- Fernandez, E., & Giayetto, O. (2006). El cultivo de maní en Córdova.
   Argentina: Departamento de imprenta y publicaciones de la UNRC, 25-35.

- García, G., & Martínez, R. (2006). Revista Mexicana de Micología. Revista
   Mexicana de Micología, 49-52.
- Gimeno, A. (2003, 11 17). Método de Análisis de Micotoxinas en Piensos compuestos y materias prima. Retrieved 11 19, 2011, from http://www.engormix.com/MA-micotoxinas/articulos/tecnicas-cromatografia-liquida-alta-t150/p0.htm
- ICA. (1984). Reconocimiento y manejo de problemas fitosanitarios en productos almacenados. Bogotá: ICA Bogotá, 1-21.
- Lara, J. (23 de 11 de 2003). Ergomix. Recuperado el 05 de 11 de 2011, de Métodos de determinación, identificación y control de Micotoxinas en ingredientes para la Nutrición Animal: http://www.engormix.com/MAmicotoxinas/articulos/metodos-determinacion-identificacion-controlt300/p0.htm
- Monge, L. (1994). Cultivo del Maní. San José, Costa Rica: Universidad
   Estatal a Distancia, 51-61.
- Montoya, R. (1995). Desarrollo de un método analítico para la determinación de aflatoxinas M1 y B1 en fluidos biologícos empleando cromatografía de líquidos de alta resolución. Monterrey: Universidad autónoma de Nuevo León.
- Moreno, E. (1988). Manual para la identificación de hongos en granos y sus derivados. México: Universidad autónoma de México, 17-39.

- Pereira, A. P. (2005). Aflatoxinas: ocurrência, distribuição estimativa de ingestão através de produtos de amendoim na cidade de Piraciba. São Paulo: USP,16-45.
- Pozas, R., & Abad, J. (2010). Adsorción de micotoxinas presentes en los alimentos mediante biopolímeros. Catalunya: Universidad Politécnica de Catalunya.
- R Biopharm. (2005). Kobra Cell. Suiza: Scotland Science.
- ROMER Labs. (2011). AflaStar Immunoaffinity Columns. Australia: Romer Labs Diagnostic GmbH.
- Ruiz, Barón, Sánchez, & Parra. (2000). Bioestadística: Métodos y Aplicaciones. U.D. Bioestadística. Facultad de Medicina. Universidad de Málaga.
- Sacarrás, M., & Bolet, M. (2005). Micotoxinas y cáncer. Cuba: Universidad
   Calixto García.
- Sabino, M. (1988). Ocorrência de aflatoxina B1 em produtos alimentícios e rações animais, consumidos no Estado de São Paulo e em várias outras regiões do Brasil, no período de 1980 a 1987. *Instituo Adolfo Lutz*, 81-85.
- Schneider, E., & Pinheiro, C. (2007). Aflatoxinas em amendoim e toxicidade no organismo humano. Contexto saúde, 47-54.

- Shami, A., & Ahmed, A. M. (2010). Survey and Determination of Aflatoxin Levels in Stored Peanut in Sudan. *Jordan Journal of Biological Sciences*, 13-29.
- Sitio Argentino de Producción Animal. (2010). Micotoxinas, el enemigo imperceptible. Retrieved 10 31, 2011, from www.produccion-animal.com.ar
- Soriano, J. M. (2007). Micotoxinas en alimentos. España: Editorial Díaz de Santos.
- Sulaiman, M., Yee, C., Hamid, A., & Yatim, A. (2004). The ocurrence of aflatoxin in raw shelled peanut samples from three districts of Perak, Malaysia. Malaysia: University Malaysia, 1-2.
- United States Departament of Agriculture. (03 de 2002). Aflatoxin Handbook. Recuperado el 03 de 11 de 2011, de http://gipsa.usda.gov/Publications/fgis/handbooks/aflatoxin/aflatoxin-hb.pdf
- Urrego, J., & Gonzalo, D. (2006, Abril 28). Aflatoxinas: mecanismo de toxicidad en la etiología de cáncer hepático celular. Facultad de Médicina Universidad Nacional Colombia, 54(2), 108-116.
- Valdivia, A. G. (2000). Evaluación del efecto protector de N-acetilcisteína contra la toxicidad de aflatoxinas B1 en pollos de engorde. Colima: Centro de Investigación y de Estudios Avanzados Universisdad de Colima, 517-520.

- Valle, P., & Florentino, B. (2000). Toxicologia de alimentos. Mexico, D.F.:
   Instituo de salud pública centro nacional de salud ambiental.
- Vallejo, M. J. (2012). Determinación de aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> presentes en harina de maíz del sector tumbaco mediante el uso de columnas de inmunoafinidad (IAC) y cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). Quito, 63-68.
- Vera, & García. (2006). Introducción a la microbiología. EUNED.
- VICAM, L.P. (1999). AflaTest Instruction Manual. U.S.A: Watertown.
- Zorzete, P. (2010). Fungos, micotoxinas e fitoalexina em variedades de amendoim do plantio ao armazenamento. São Paulo: Universidade de São Paulo, 309-315.