

DETERMINACIÓN DE AFLATOXINAS B₁, B₂, G₁ Y G₂ PRESENTES EN HARINA DE MAÍZ DEL SECTOR TUMBACO MEDIANTE EL USO DE COLUMNAS DE INMUNOAFINIDAD (IAC) Y CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (HPLC)

Vallejo López, María José

RESUMEN

La ocurrencia de aflatoxinas en gramíneas es relativamente alta en las zonas templadas y climas subtropicales. En Ecuador no existe una normativa de regulación para aflatoxinas ni un programa sistemático de vigilancia y monitoreo sobre la contaminación por hongos micotoxigénicos en alimentos de consumo humano o animal. Este trabajo se realizó para establecer los niveles reales de contaminación de aflatoxinas en harina de maíz, datos con los que sea posible definir directrices de regulación a nivel gubernamental para la comercialización de harina de maíz. Para esto, se tomaron 50 muestras de locales minoristas (32), supermercados (11) y mercados (7) en el sector valle de Tumbaco, las que se analizaron por duplicado mediante la técnica de cromatografía líquida de alta eficiencia HPLC y columnas de inmunoespecificidad IAC. Coincidiendo con lo reportado a nivel mundial para muestras de maíz, se encontró que los niveles de contaminación por aflatoxinas B₂, G₁ y G₂ posiblemente cancerígenas, están por debajo del nivel máximo permisible por la Unión Europea (8 µg. Kg⁻¹) siendo la de mayor incidencia la aflatoxina B₁, sustancia cancerígena de nivel 1, detectada en el 78% del total de las muestras, superando las normativas internacionales en 13 de ellas, el subgrupo minoristas fue el que presentó los mayores niveles de contaminación para AFB₁. Estos resultados indicaron que la harina de maíz analizada constituye una amenaza para la salud pública y debe ser regulada por las leyes ecuatorianas de inocuidad alimentaria.

Palabras Clave: Micotoxinas, Harina de maíz, Aflatoxina B₁, Aflatoxinas

ABSTRACT

Presence of aflatoxins in grains is relatively high in temperate and tropical regions. Government regulations for aflatoxins or a systematic program of surveillance and monitoring of micotoxins for human or animal consumption are not available in Ecuador. This study was conducted to determine the real levels of contamination in corn flour in order to provide the basis for government regulations for its commercialization. 50 samples divided in retail trades (32), supermarkets (11) and local markets (7) of corn flour in the Tumbaco valley were analyzed for aflatoxin using High Performance Liquid Chromatography HPLC and immunoaffinity columns IAC. As reported worldwide in corn samples, this investigation found that levels of contamination were below the maximum international (8 µg. Kg⁻¹) allowed for likely carcinogenic aflatoxins B₂, G₁ and G₂. In the other hand, the level 1 carcinogenic substance, aflatoxin B₁ had the highest incidence and was detected in 78% of the total samples, above the European regulation in 13 of them. The subgroup of retail trades presented the maximum levels of contamination for AFB₁. These results indicate that corn flour represent hazard for human's health and must be regulated with food safety laws.

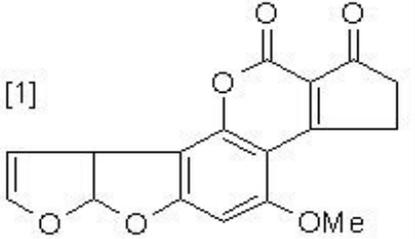
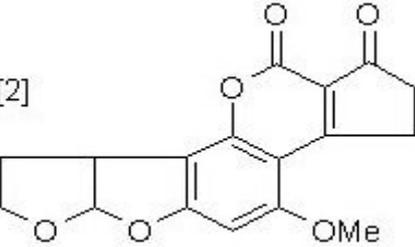
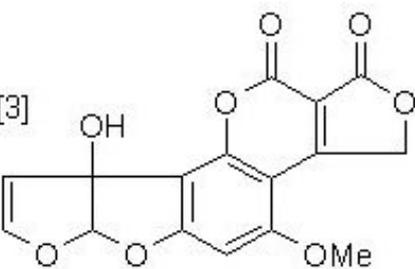
Key words: micotoxins, corn flour, B₁ aflatoxin, Aflatoxins

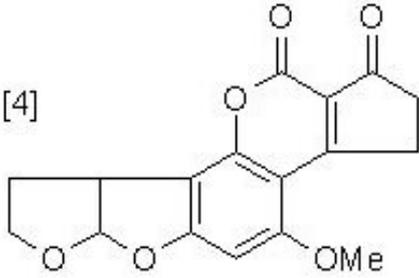
INTRODUCCIÓN

Las aflatoxinas son metabolitos secundarios producidos por hongos de varias especies del género *Aspergillus*, cuyos efectos fisiopatológicos incluyen: daño hepático agudo, cirrosis, inducción de tumores, disminución de la eficacia del sistema inmunológico, teratogénesis, excreción por la leche y acumulación en tejidos (Bodega, 2010). Son producidas por dos géneros de hongos filamentosos *Aspergillus* y *Penicillium*, estos representan el crecimiento típico de los hongos microscópicos. Las especies productoras son: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Penicillium puberalis* y *Aspergillus oryzae*. En 1967, Nulik y Holiday reportaron también a las especies *Aspergillus niger*, *Aspergillus gruber*, *Aspergillus wentii*, *Penicillium frequentans*, *Penicillium variable* y *Penicillium citrinum* (Bolet & Socarrás, 2004).

Varios estudios han revelado que las cuatro aflatoxinas más importantes: B₁ (AFB₁), B₂ (AFB₂), G₁ (AFG₁), G₂ (AFG₂), están directamente relacionadas con la contaminación de alimentos y cultivos, poseen una estructura similar entre ellas y forma un único grupo de compuestos heterocíclicos altamente oxigenados (Cornell University, 2008). Sus estructuras moleculares fueron deducidas alrededor de 1962 por el grupo ASOA, se describen en la tabla 1.1.

Tabla 1.1: Estructura molecular de las Aflatoxinas. Adaptado de: (*European Mycotoxins Awareness Network, 2010*).

AFLATOXINA	FÓRMULA		P.MOLECULAR (g/mol)
B ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	[1] 	312,3
B ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	[2] 	314,3
G ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	[3] 	328,3

G ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	[4] 	330,3
----------------	--	---	-------

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación (FAO, 2011) es primordial la protección de los consumidores contra los peligros que para la salud pública tienen los alimentos contaminados por aflatoxinas, sin embargo en el Ecuador no existen parámetros de control dentro de la norma INEN para ningún tipo de producto susceptible a contaminación, ni investigaciones referentes a la incidencia de aflatoxinas en los productos de consumo humano. Esta investigación se realizó en maíz (Harina) ya que es más susceptible a la presencia de aflatoxinas junto a los cacahuates, pistachos, nueces del Brasil y semillas de algodón (Soriano del Castillo, 2007).

MATERIALES Y MÉTODOS

El proyecto se desarrolló en dos etapas:

Trabajo de campo (Muestreo: 50 muestras): Se realizó en el valle de Tumbaco cuya extensión es de 64.000 hectáreas, en la parroquia con el mayor número de habitantes: Tumbaco, ubicada al nororiente del cantón Quito, provincia de Pichincha

Trabajo de laboratorio (Ensayos): Se efectuaron en los laboratorios de AGROCALIDAD, en el área de Inocuidad alimentaria, ubicado en el Valle de Tumbaco, parroquia Tumbaco (Vía Interoceánica Km 14 ½ - La Granja) al nororiente del cantón Quito, provincia de Pichincha.

El muestreo se realizó en diversos locales minoristas del sector de Tumbaco dividido en tres grupos: Grupo Supermercados (GS), Grupo Minoristas (GM) y Grupo Mercados (GE) de los que se tomaron 11, 32 y 7 muestras respectivamente. El muestreo fue aleatorio para garantizar que cada uno de los elementos de la población tenga la misma oportunidad de ser incluidos. Se recolectaron 50 muestras de 1 kg de harina de maíz para que el estudio sea estadísticamente significativo y se analizaron por duplicado, con un total de 100 ensayos experimentales. Posteriormente con la curva de calibración de las aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ en el HPLC se realizó el protocolo de extracción, purificación y cuantificación, se colocó en el recipiente (1L de capacidad y resistente a solventes) para licuar: 50 g de muestra homogenizada junto a 4 g de cloruro de sodio (NaCl). Se agregó 250 mL de solvente de extracción metanol: agua (60:40) en el recipiente, y se licuó por 5 min a alta velocidad. Posteriormente se filtró aproximadamente 25-50 mL de extracto de muestra por papel filtro Whatman No.4 ó equivalente y se tomó 10 mL del filtrado con una jeringa, para su purificación en las columnas de inmunoafinidad. Finalmente para su cuantificación, se inyectó 100 uL de cada muestra en el equipo HPLC con las condiciones de la tabla 1.2, se cuantificó la concentración de las aflatoxinas comparando las áreas de los picos con la curva de calibración de estándares en el software del equipo EMPOWER.

Tabla 1.2: Condiciones utilizadas para la cuantificación en el HPLC.

CONDICIONES UTILIZADAS DEL HPLC	
Kobra Cell	Seteo a 200 Ma
Columna Analítica	Waters 4,6 × 25 cm, 5 µm ODS-2
Pre Columna	Pre Columna Waters ODS-2
Fase móvil	60:20:20 v/v/v agua: metanol: acetonitrilo +119 mg de bromuro de potasio + 350 µl de ácido nítrico 4M
Velocidad. de flujo	1.0 mL/min
Detector de Fluorescencia:	Excitación: 360 nm Emisión: 420 nm
Horno:	30°C
Volumen de Inyección	100 µL

RESULTADOS

Grupo supermercados.

Los estadísticos generales de las 11 muestras tomadas en 2 supermercados pertenecientes al valle de Tumbaco, revelaron que el contenido medio de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ presentes en harina de maíz fue: 0,68; 0,04; 0,04; 0,01 µg. Kg⁻¹ respectivamente. Al contrastarlas con las regulaciones de la Unión Europea que permite de 2-8 µg. Kg⁻¹ o los parámetros máximos para los Estados Unidos de 20 µg. Kg⁻¹ se estableció que no existe contaminación superior a los límites permisibles.

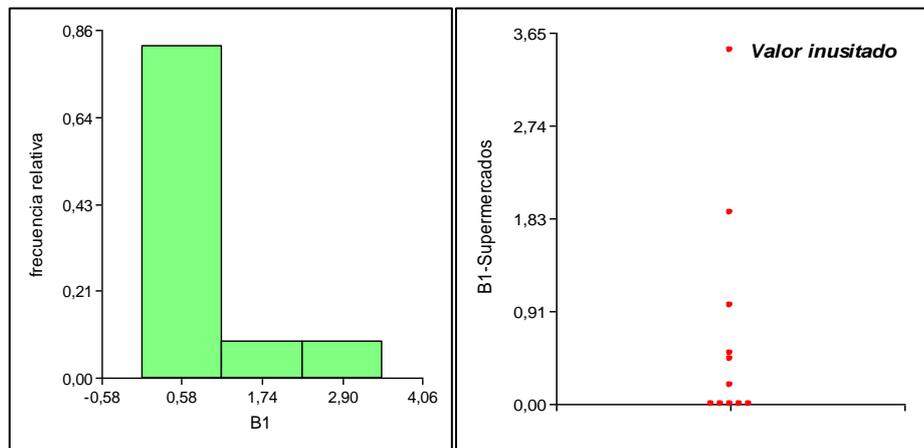


Gráfico 3.1: Histograma de frecuencias relativas y diagrama de densidad de puntos para las concentraciones de aflatoxina B₁ en µg.Kg⁻¹ presentes en el grupo supermercados.

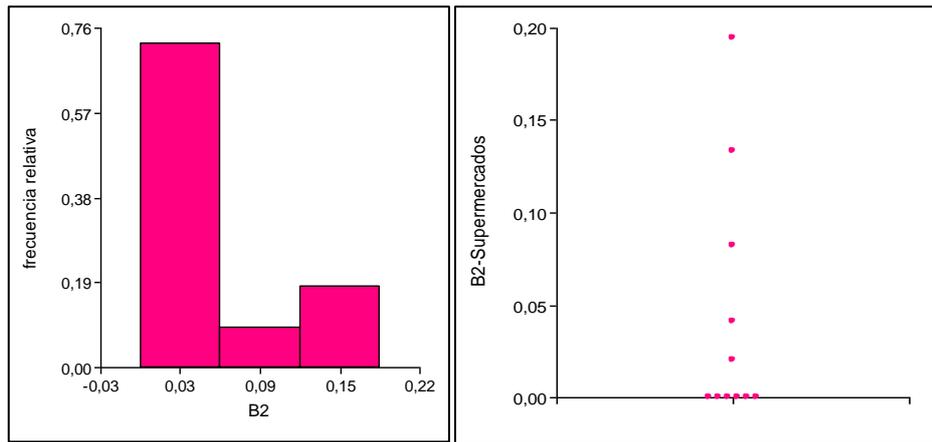


Gráfico 3.2: Histograma de frecuencias relativas y diagrama de densidad de puntos para las concentraciones de aflatoxina B₂ en $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ presentes en el grupo supermercados.

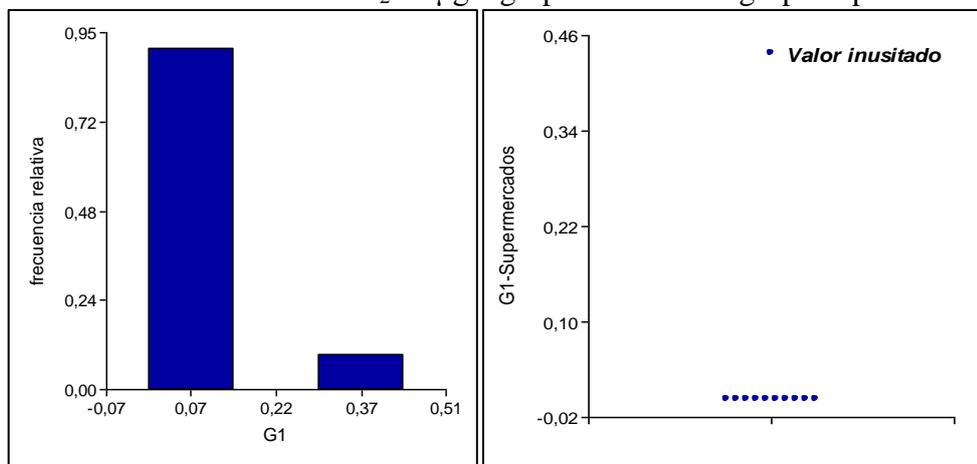


Gráfico 3.3: Histograma de frecuencias relativas y diagrama de densidad de puntos para las concentraciones de aflatoxina G₁ en $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ presentes en el grupo supermercados.

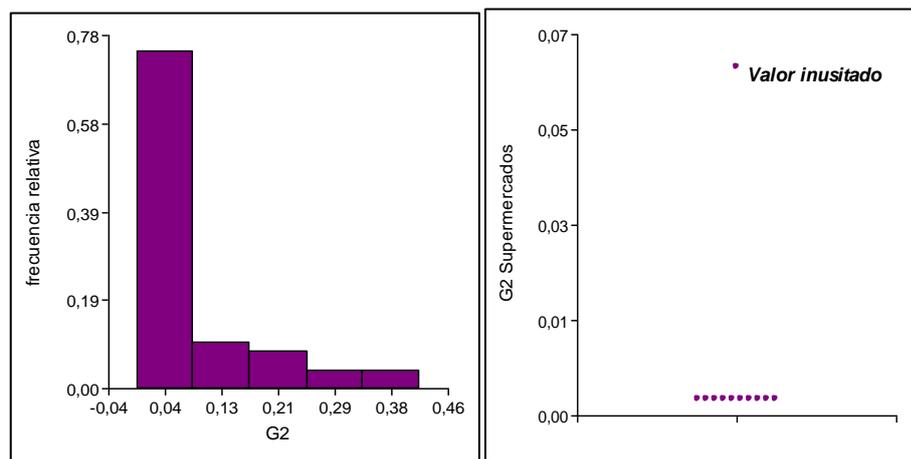


Gráfico 3.4: Histograma de frecuencias relativas y diagrama de densidad de puntos para las concentraciones de aflatoxina G₂ en $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ presentes en el grupo supermercados.

Grupo minoristas.

Los estadísticos generales de las 32 muestras del grupo minoristas definieron que el contenido medio de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ presentes en harina de maíz

fue de 10,81; 0,39; 0,44 y 0,09 $\mu\text{g. Kg}^{-1}$ respectivamente. Al verificarlos con las regulaciones de la Unión Europea que permite de 2-8 $\mu\text{g. Kg}^{-1}$ o los parámetros máximos para los Estados Unidos de 20 $\mu\text{g. Kg}^{-1}$ se encontró que únicamente la concentración media de B₁ 10,81 $\mu\text{g. Kg}^{-1}$ superó la normativa europea mientras que las demás B₂, G₁ y G₂ no presentaron contaminación superior a los límites permisibles.

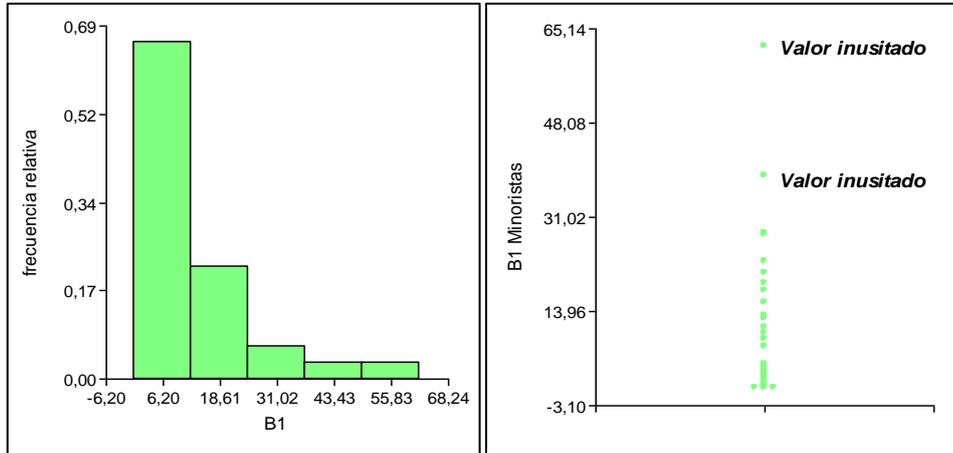


Gráfico 3.5: Histograma de frecuencias relativas y diagrama de densidad de puntos para las concentraciones de aflatoxina B₁ en $\mu\text{g. Kg}^{-1}$ presentes en el grupo minoristas.

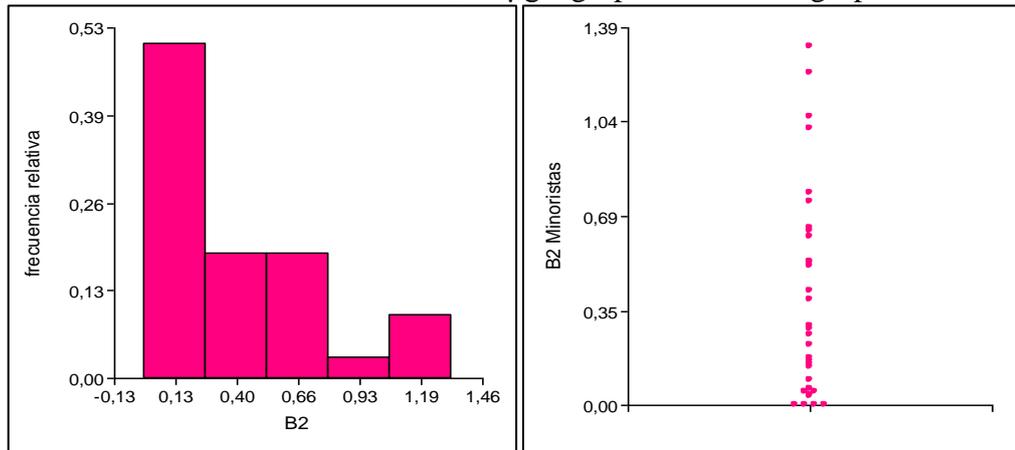


Gráfico 3.6: Histograma de frecuencias relativas y diagrama de densidad de puntos para las concentraciones de aflatoxina B₂ en $\mu\text{g. Kg}^{-1}$ presentes en el grupo minoristas.

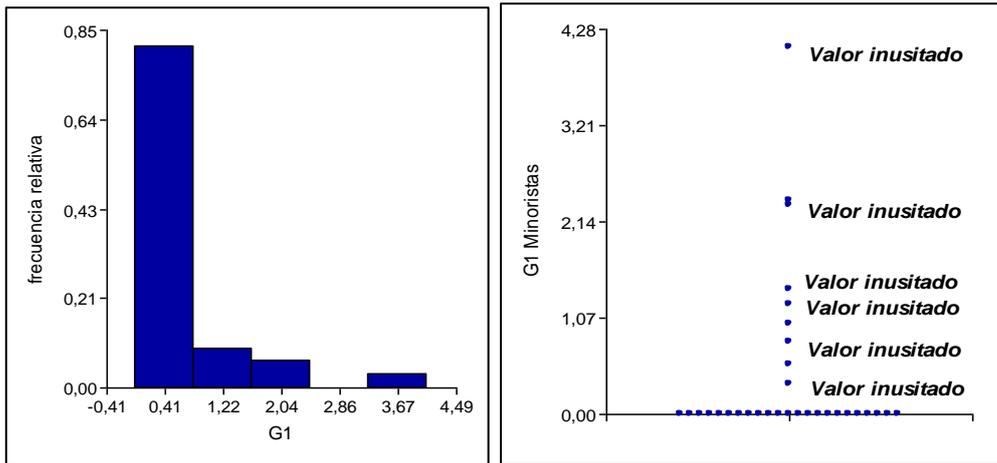


Gráfico 3.7: Histograma de frecuencias relativas y diagrama de densidad de puntos para las concentraciones de aflatoxina G_1 en $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ presentes en el grupo minoristas.

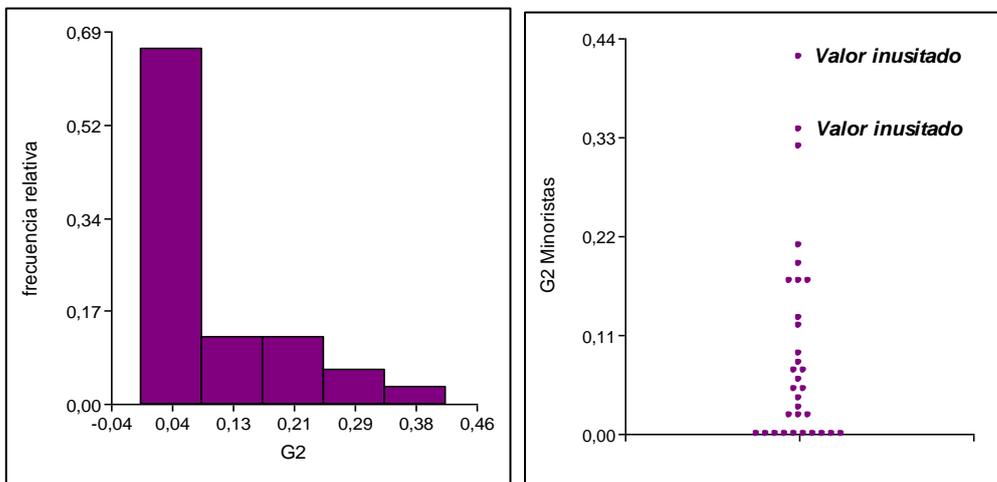


Gráfico 3.8: Histograma de frecuencias relativas y diagrama de densidad de puntos para las concentraciones de aflatoxina G_2 en $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ presentes en el grupo minoristas.

Grupo mercados.

Los estadísticos generales de las 7 muestras del grupo mercados revelaron que el contenido medio de aflatoxinas B_1 , B_2 y G_2 presentes en harina de maíz fue de $5,22$; $0,21$ y $0,07\mu\text{g. Kg}^{-1}$ respectivamente. Al comprobarlas con las regulaciones de la Unión Europea que permite de $2-8 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ o los parámetros máximos para los Estados Unidos de $20 \mu\text{g. Kg}^{-1}$ se estableció que no existe contaminación superior a los límites permisibles. En el caso de G_1 no se encontró contaminación en ninguna muestra por lo tanto estos parámetros no fueron calculados.

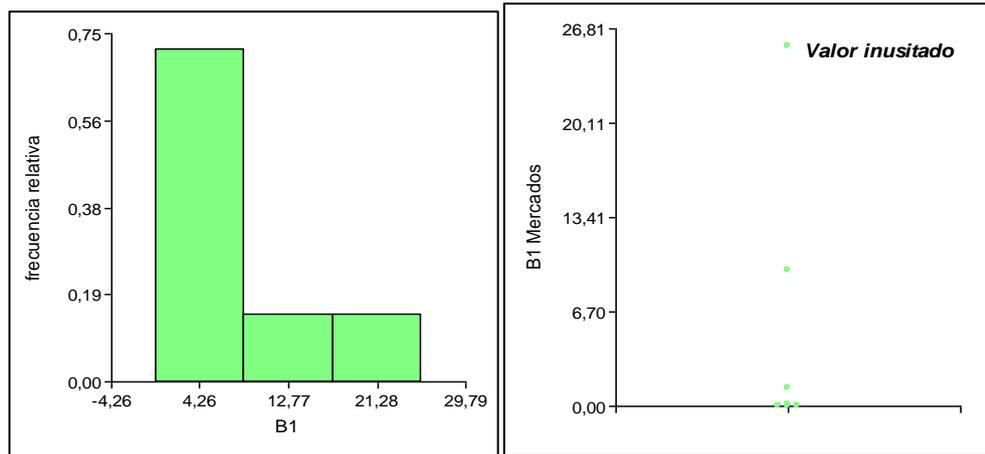


Gráfico 3.9: Histograma de frecuencias relativas y diagrama de densidad de puntos para las concentraciones de aflatoxina B₁ en $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ presentes en el grupo mercados.

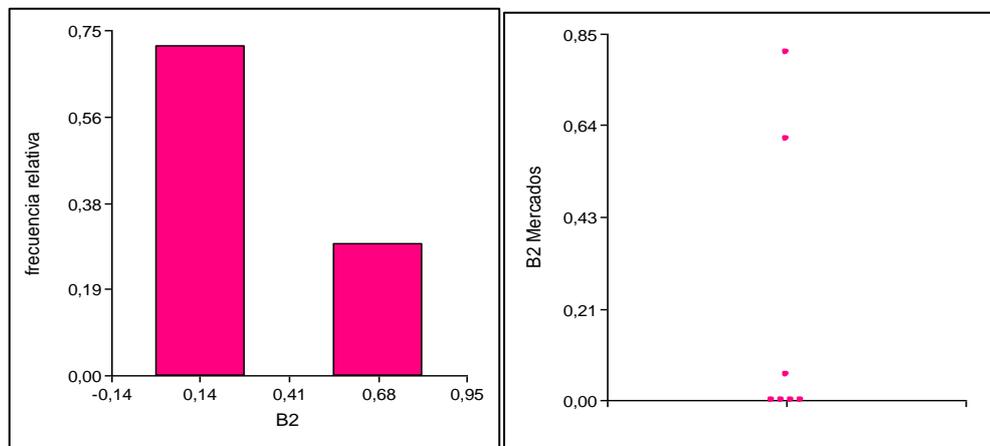


Gráfico 3.10: Histograma de frecuencias relativas y diagrama de densidad de puntos para las concentraciones de aflatoxina B₂ en $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ presentes en el grupo mercados.

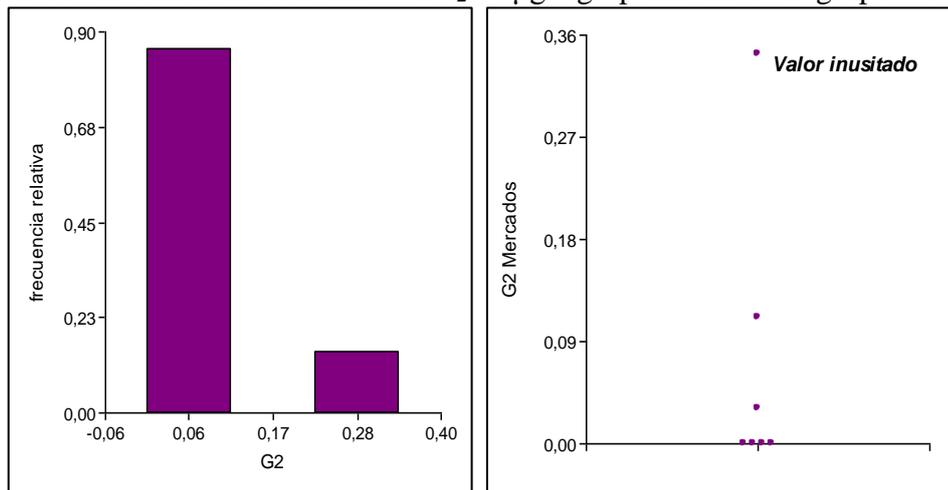


Gráfico 3.11: Histograma de frecuencias relativas y diagrama de densidad de puntos para las concentraciones de aflatoxina G₂ en $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ presentes en el grupo mercados.

Muestra Global (Grupo supermercados-minoristas-mercados).

Los estadísticos generales para todo el universo muestral sin clasificar por lugar de procedencia, indicaron que el contenido medio de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ presentes en harina de maíz fue de 7,80; 0,29; 0,29 y 0,07 $\mu\text{g}.\text{Kg}^{-1}$ respectivamente. Al compararlas con las regulaciones de la Unión Europea que permite de 2-8 $\mu\text{g}.\text{Kg}^{-1}$ o los parámetros máximos para los Estados Unidos de 20 $\mu\text{g}.\text{Kg}^{-1}$ se observó que no existe contaminación superior a los límites permisibles.

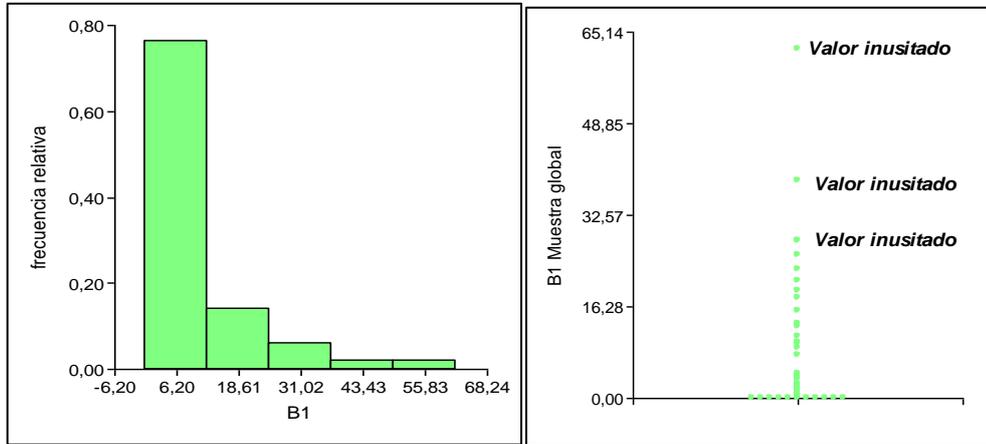


Gráfico 3.12: Histograma de frecuencias relativas y diagrama de densidad de puntos para las concentraciones de aflatoxina B₁ en $\mu\text{g}.\text{Kg}^{-1}$ presentes en la muestra global.

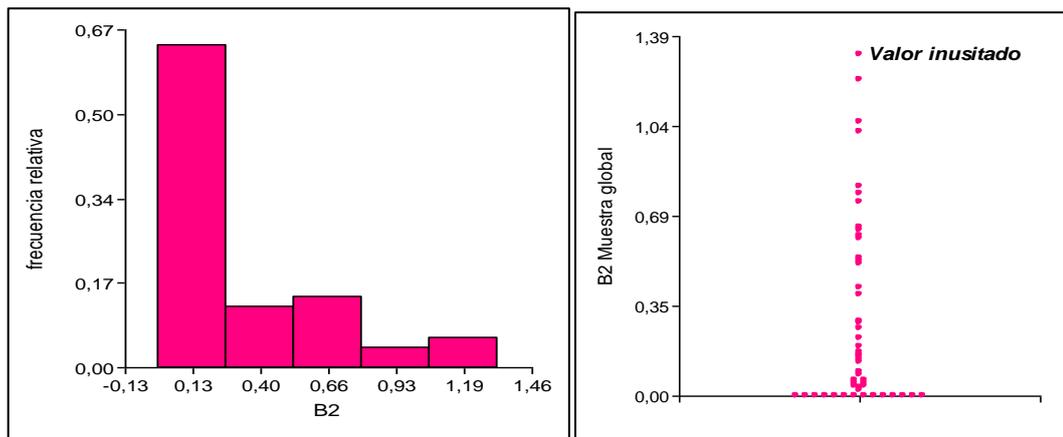


Gráfico 3.13: Histograma de frecuencias relativas y diagrama de densidad de puntos para las concentraciones de aflatoxina B₂ en $\mu\text{g}.\text{Kg}^{-1}$ presentes en la muestra global.

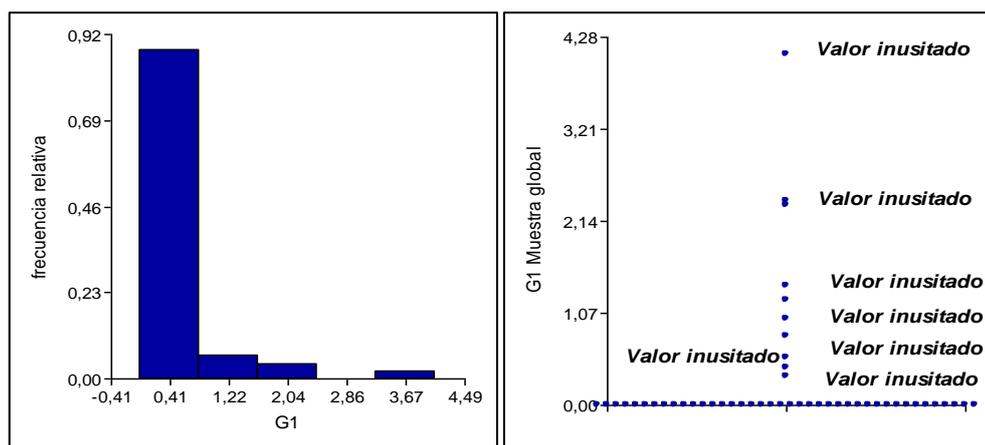


Gráfico 3.14: Histograma de frecuencias relativas y diagrama de densidad de puntos para las concentraciones de aflatoxina G_1 en $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ presentes en la muestra global.

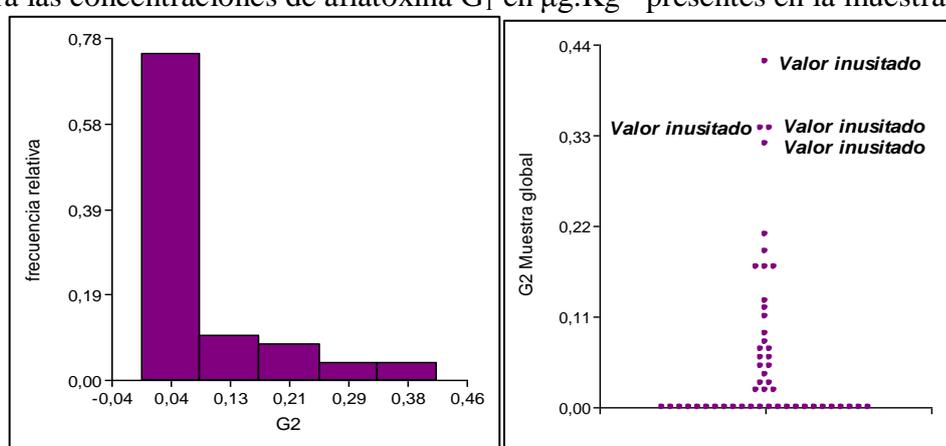


Gráfico 3.15: Histograma de frecuencias relativas y diagrama de densidad de puntos para las concentraciones de aflatoxina G_2 en $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ presentes en la muestra global.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Según el Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuicultura y Pesca, hasta el año 2010 el Ecuador poseía 413.809 hectáreas de maíz duro, maíz suave, choclo y maíz seco lo que corresponde al 18,5% del total de la superficie productiva del país cuyo consumo anual proyectado para el 2011 es de 801.000 toneladas (MAGAP/ III CNA/SIGAGRO/ INEC, 2011), sin embargo la inexistencia de un programa sistemático de vigilancia de la contaminación de los alimentos por micotoxinas destinados al consumo humano o animal, producidos localmente o de importación; ha imposibilitado estimar la exposición de estas sustancias a la población ecuatoriana (Solá, 2010).

Esta investigación permitió definir los niveles de Aflatoxinas B_1 , B_2 , G_1 y G_2 presentes en harina de maíz en el sector de Tumbaco formando una línea base para su posterior regulación en la producción y comercialización del maíz. En los resultados, se encontró que existe contaminación por aflatoxina B_1 superior a los límites permisibles por la Unión Europea en un 26% del total de muestras de harina de maíz provenientes del sector de Tumbaco, cuyos valores oscilaron entre: $[4,34 \mu\text{g.Kg}^{-1}; 11,26 \mu\text{g.Kg}^{-1}]$.

Para el subgrupo de muestras del sector minoristas, los valores se encontraron entre: [5,87 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$; 15,75 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$] y el subgrupo de mercados estuvieron entre: [0,0 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$; 14,2 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$]. La excepción se localizó en el subgrupo de muestras del sector supermercados, que no presentó contaminación por AFB₁ superior a las normativas internacionales. Esta versatilidad se debe a que tanto en campo como almacenamiento, los factores ambientales no son constantes, por lo que puede ocurrir un desarrollo fúngico significativo sin encontrarse la cantidad de aflatoxinas esperadas (Carrillo, 2003).

En los resultados obtenidos en la muestra global y los subgrupos: supermercados minoristas y mercados, las aflatoxinas B₂, G₁ y G₂ no fueron detectadas en niveles superiores a los parámetros regulatorios europeos. Para el subgrupo mercados, no existió la presencia de AFG₁, validando así la premisa anterior de Carrillo que afirma una gran variabilidad en la incidencia de aflatoxinas, influenciada por factores climáticos como: temperatura, acidez, humedad presencia de microflora competidora, actividad de agua, pH, concentraciones de CO₂ (Soriano del Castillo, 2007).

Esta investigación encontró mediante el uso de columnas de inmunoafinidad (IAC) y Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) que 26% de 50 muestras de harina de maíz sin categorizar por localización presentó contaminación por AFB₁ en niveles superiores a los permitidos por la Unión Europea (2-8 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$). El subgrupo minoristas mostró los niveles de contaminación más altos con una media de 10,81 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$. Los subgrupos: supermercados, mercados y la muestra global cumplieron con los parámetros de control europeos para B₁, B₂, G₁ y G₂. En el subgrupo mercados AFG₁ no fue detectada. Se precisó la línea base de muestreo en el sector de Tumbaco en los diferentes grupos: supermercados, minoristas y mercados localizados en los barrios: El Arenal, Tola Grande, Tola Chica, La Morita, Buena Esperanza, Tumbaco Central, de los cuales se recopilaban 50 muestras de harina de maíz de 1kg divididas en 11 grupo supermercados (AFS), 32 grupo minoristas (AFM) y 7 para mercados (AFE). Se definieron los niveles medios de concentración de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ presentes en harina de maíz en el Sector de Tumbaco para la muestra global sin clasificar según su procedencia fueron: 7,79; 0,28; 0,29 y 0,06 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ respectivamente. Para el grupo supermercados: 0,67; 0,04; 0,04 y 0,005 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$; grupo de comercios minoristas: 10,81; 0,38; 0,44; 0,08 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ y grupo mercados, los niveles de B₁, B₂, y G₂ fueron: 5,22; 0,21 y 0,06 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$. Por lo tanto, la harina de maíz analizada en el presente trabajo representa una amenaza tanto para la salud pública como el sector pecuario ya que es un riesgo latente y constante debido a la presencia en algún grado de AFB₁ sustancia cancerígena, en el 78% de las muestras analizadas.

BIBLIOGRAFÍA

- WATERS. (2011). *Waters HPLC*. Recuperado el Julio de 15 de 2011, de http://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=514248&locale=en_US. Estados Unidos.
- Agilent Technologies. (2010). *Agilent SampliQ12 and 20-Position SPE Manifold Instructions*. Recuperado el 11 de Julio de 2011, de <http://www.home.agilent.com/agilent/home.jsp?cc=EC&lc=eng>. Estados Unidos.

- AOAC INTERNATIONAL. (2011). *Official Methods of Analysis*. Recuperado el 12 de Julio de 2011, de <http://www.aoac.org/>. Estados Unidos.
- Arango Acosta, G. J. (2010). *Introducción al metabolismo secundario*. Colombia: Universidad De Antioquia.
- Asamblea Nacional. (2010). *Ley Reformatoria a la Ley Orgánica de Soberanía Alimentaria*. Ecuador: Asamblea Nacional.
- Bodega, J. L. (2010). *Diplodiosis, enfermedad causada por micotoxinas en maíz. Hongos en los rastrojos de maíz, problemas en las vacas*. Recuperado el 23 de Enero de 2011, de <http://www.produccion-animal.com.ar>. Argentina.
- Bogantes, P. (2004). *Aflatoxinas*. Recuperado el 18 de Marzo de 2010, de http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S000160022004000400004&script=sci_arttext. Costa Rica.
- Bolet, M., & Socarrás, M. M. (2004). Micotoxinas y cáncer. *Revista Cubana de Investigación Biomédica*. Cuba.
- Broggi, L., Pacin, A., Gasparovic, A., Sacchi, C., Rothermel, A., Gallay, A., y otros. (3 de Febrero de 2007). *Natural occurrence of aflatoxins, deoxynivalenol, fumonisins and zearalenone in maize from Entre Ríos Province, Argentina*. Luján, Argentina.
- MAGAP/ III CNA/SIGAGRO/ INEC. (2011). *Principales cultivos del Ecuador*. Recuperado el 2011 de Septiembre de 2011, de <http://www.-magap.-gob.-ec>. Ecuador.