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

Fierro Aguilar Karla Alejandra[1]

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 B_1, B_2, G_1 y G_2 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_1 que superó los límites permisibles por la Unión Europea de 5 y 8 ppb ($\mu g.kg^{-1}$), los valores de esta toxina oscilaron entre: [17,65 hasta 87,51] ($\mu g.kg^{-1}$) mientras que B_2, G_1 y G_2 mantuvieron niveles de contaminación inferiores a los límites permisibles. En las muestras de supermercados se obtuvo similares resultados, la concentración de aflatoxinas B_1 osciló entre: [2,23 hasta 12,95] ($\mu g.kg^{-1}$), superó los límites permisibles, los niveles de B_2, G_1 y G_2 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.

Palabras clave: Aflatoxinas, HPLC,maní a granel, hongos micotoxicos

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 B1, B2, G1 and G2 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 B1 that surpassed the permissible limits set by the European Union of 5 and 8 ppb (µ g.kg-1), his toxin values oscillated between: [17,65 until 87,51] (µ g.kg-1) whereas B2, G1 and G2 maintained a level of contamination below permissible limits set. In the supermarket samples were obtained similar results, the B1 aflatoxinas concentration oscillated between: [2,23 until 12,95] (µ g.kg-1), that surpassed the level permissible, of

[1] Laboratorio laboratorios de la Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro (AGROCALIDAD). Escuela Politécnica del Ejército, departamento ciencias de la vida. Ing. en Biotecnología

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.

Key words: Aflatoxin, HPLC, peanuts, micotoxic fungi.

INTRODUCCIÓN

Las aflatoxinas B_1 y B_2, G_1 y G_2 son compuestos químicos que están relacionados en su estructura respectivamente, su peso molecular oscila entre 312 y 350, 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). 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 maní 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. Con el presente trabajo de investigación se procuró verificar la existencia de aflatoxinas en maní y así mismo se identificar microscópicamente a los hongo que generan estas toxinas.

MATERIALES Y MÉTODOS

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.

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. 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.

Analisis químico

Posterior a la elaboración de las curvas de calibración de cada una de las aflatoxina en el equipo de HPLC, se realizó pruebas de recupercación de los protocolos de extracción, purificación y cuantificación de aflatoxinas, obtenidos buenos resultados se realizó la extracción en la muestras de maní para lo cual se licuó durante 3 minutos 25 gramos de muestra de maní con 2 gramos de cloruro de sodio agregando 100 ml de solución extractora (60:40) metanol:agua, se agitó durante una hora en shaker a velocidad media el licuado, seguido se filtró aproximadamente 50-80 ml a través de papel filtro Whatman No. 1, se tomó una alicuota del extracto filtrado y se diluyó con buffer PBS hasta disminuir en un 20% el contenido de metanol. Para la purificación se tomó 10 ml del extracto diluido y se colocó en las columnas de inmunoafinidad. Finalmente para la cuantificación se inyectó 100 ul de cada muestra en el equipo de HPLC, se cuantificó la concentración de cada aflatoxina comparando las aréas de los picos con la curva de calibración. Las condiciones del equipo se muestran en la siguiente tabla.

Tabla. 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 $ml.min^{-1}$
Volumen de Inyección	100 µl
Temperatura de reacción	40 °C
Tiempo de reacción	30 min
Kobra Cell	Seteo 100 Ma
Detector de fluorescencia	Emisión:455; Excitación: 362

Analisis microbiológico

Se identificaron taxonomicamente a los hongos presentes en las muestras de maní que presentaron contaminación con aflatoxinas, para lo cual se sembró almendras de maní en medio PDA, se incubó durante siete dias a 25 °C posterior se aisló los hongos en tubos con PDA para luego ser identificados microscopicamente con la ayuda de claves taxonómicas.

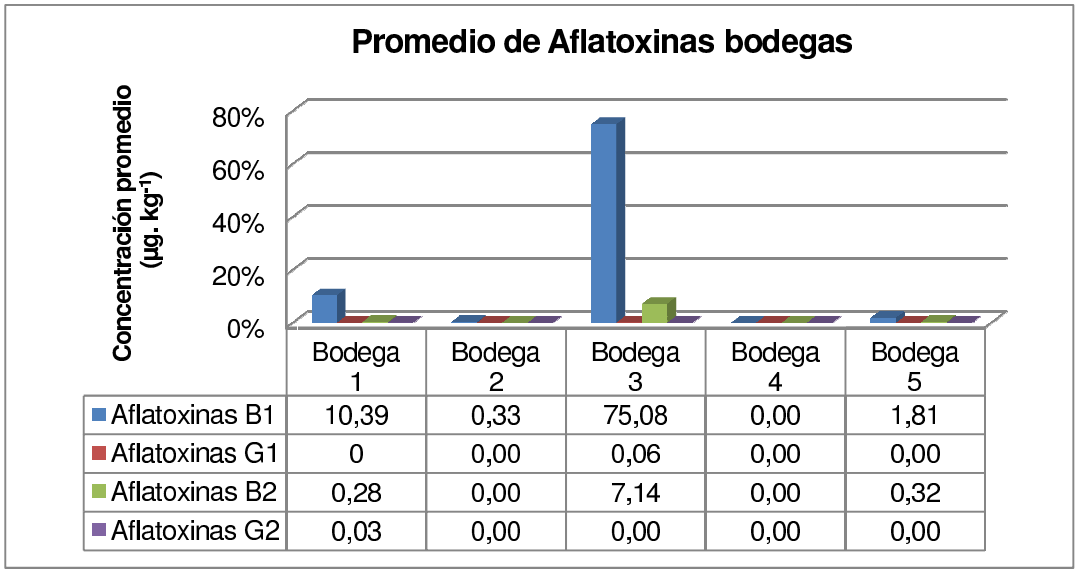
RESULTADOS

Grupo bodegas

Análisis estadístico

En la gráfica 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 µg. kg^{-1}, respectivamente.

Gráfica 1. Concentración promedio en µg. kg^{-1} de aflatoxinas en las 5 muestras de bodegas



	Bodega 1	Bodega 2	Bodega 3	Bodega 4	Bodega 5
Aflatoxinas B1	10,39	0,33	75,08	0,00	1,81
Aflatoxinas G1	0	0,00	0,06	0,00	0,00
Aflatoxinas B2	0,28	0,00	7,14	0,00	0,32
Aflatoxinas G2	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00

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 1.

Tabla 1 Géneros de hongos aislados en bodegas

Géneros aislados	BODEGAS								Total	
	B1		B2		B3		B5			
	Nro. A	%Nro. A	Nro. A	%Nro. A	Nro. A	%Nro. A	Nro. A	%Nro. A	Nro. TA	%Nro. T A
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 Aislamientos	50		50		50		50		200	
Total de géneros aislados	3		1		1		2		7	

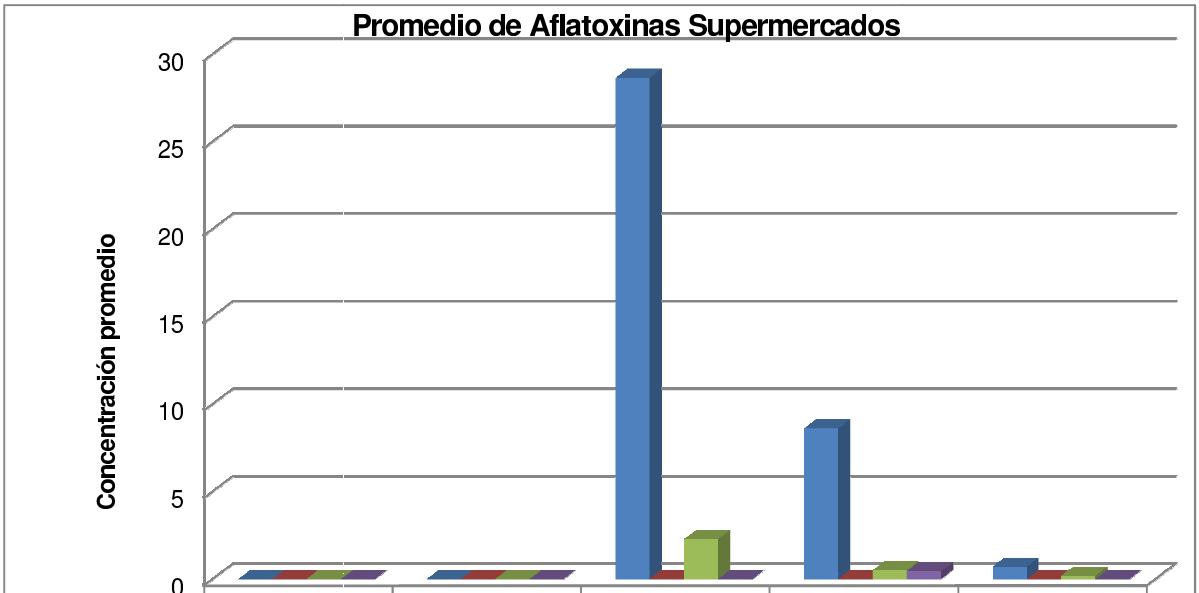
- **Nro. A:** Número de aislamientos (frecuencia de repeticiones del mismo género).
- **%Nro A:** Porcentaje del número de aislamientos de cada género.
- **Nro. TA:** Número total de aislamiento de cada género.
- **%Nro. TA:** Porcentaje del número total de aislamiento de cada género.

Grupo supermercados

Análisis estadístico

En la gráfica 2 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 $\mu g.kg^{-1}$ respectivamente.

Gráfica 2. Concentración promedio de aflatoxinas en µg. kg^{-1} de 5 muestras de maní de supermercados



	Supermercado 1	Supermercado 2	Supermercado 3	Supermercado 4	Supermercado 5
Aflatoxina B1	0,00	0,00	28,65	8,61	0,70
Aflatoxina G1	0	0,00	0,00	0,00	0,00
Aflatoxina B2	0,00	0,00	2,27	0,50	0,18
Aflatoxina G2	0,00	0,00	0,00	0,43	0,00

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 2.

Tabla 2 Géneros de hongos aislados en supermercados

Géneros aislados	SUPERMERCADOS						Total	
	S3		S4		S5			
	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	-	-	11	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	

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 $kg.ha^{-1}$. 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).

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 $\mu g.kg^{-1}$ representaron un 70% de las muestras totales. 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 obtenidos en 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 ($\mu g.kg^{-1}$), los valores de esta toxina oscilaron entre: [17,65 > µg 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 > µg 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 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_1 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.

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). 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.

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 técnicos-científicos 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.

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_1 y aflatoxinas totales y normalizado por la FAO (15 $\mu g.kg^{-1}$) y Unión Europea (5-8 $\mu g.kg^{-1}$).

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 B_1 a los límites permisibles por la Unión Europea para el consumo directo del maní. Las concentraciones de las aflatoxinas B_2, G_1 y G_2 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.

BIBLIOGRAFÍA

AOAC. (2005). ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMIST. En AOAC. United States of America: AOAC International, 32-37.

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.

Barón, F., Ríus, F., & Sánchez, E. (24 de 06 de 2012). *Bioestadística*. Obtenido de http://www.bioestadistica.uma.es/libro/

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.

Pereira, A. P. (2005). *Aflatoxinas: ocurrência,distribuição estimativa de ingestão através de produtos de amendoim na cidade de Piraciba.* São Paulo: USP,16-45 .

R Biopharm. (2005). *Kobra Cell.* Suiza: Scotland Science.

ROMER Labs. (2011). *AflaStar Immunoaffinity Columns.* Australia: Romer Labs Diagnostic GmbH.

Schneider, E., & Pinheiro, C. (2007). Aflatoxinas em amendoim e toxicidade no organismo humano. *Contexto saúde*, 47-54.

Soriano, J. M. (2007). *Micotoxinas en alimentos.* España: Editorial Díaz de Santos.

Zorzete, P. (2010). *Fungos, micotoxinas e fitoalexina em variedades de amendoim do plantio ao armazenamento.* São Paulo: Universidade de São Paulo, 309-315.