

MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE AFLATOXINAS EN ALIMENTOS

(Methods for the determination of aflatoxins in foods)

Sanabria, Neida¹, Martínez, Yudrany¹, López, Alexandra¹

¹Universidad Simón Bolívar, Departamento de Tecnología de Procesos Biológicos y Bioquímicos. Edif. Aulas. Piso 3. Oficina 317A. Valle de Sartenejas, Baruta, Edo. Miranda-Venezuela. Email:nsanabria@usb.ve

Recibido: 15/01/2017 - Aceptado: 13/06/2017

RESUMEN

Las aflatoxinas son compuestos naturales de micotoxinas producidos por varias especies de hongos *Aspergillus*, como *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*, dichas micotoxinas son compuestos inmunosupresores, citotóxicos, mutagénicos, teratogénicos, carcinógenos, causan daños renales y hepáticos y hasta la muerte. Las aflatoxinas han sido responsables de varios episodios de intoxicación masiva tanto en humanos como en animales. Entre las materias primas y productos que frecuentemente están contaminados están el maíz, sorgo, trigo, cebada, arroz, avena, leche, queso y subproductos pecuarios. Debido a su alta peligrosidad, especialmente las del tipo B1, y la aparición frecuente en diversos alimentos, se ha hecho imprescindible el monitoreo de estas toxinas en los productos alimenticios postcosecha, durante el almacenamiento, durante la cadena de transformación e incluso durante las largas fases de conservación. Existen métodos de detección de aflatoxinas que utilizan tecnologías muy avanzadas para responder en el menor tiempo posible. Esta investigación tiene como propósito realizar una breve revisión bibliográfica sobre estudios que muestran nuevos métodos de detección de aflatoxinas en alimentos.

Palabras clave: Aflatoxinas, métodos de detección, alimentos.

SUMMARY

Aflatoxins are natural compounds of mycotoxins produced by various species of *Aspergillus* fungi, such as *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. These mycotoxins are immunosuppressive, cytotoxic, mutagenic, teratogenic, carcinogenic, cause renal and hepatic damage and even death. Aflatoxins have been responsible for several episodes of massive intoxication in both humans and animals. Among the raw materials and products that are frequently contaminated are maize, sorghum, and wheat, barley, rice, oats, and milk, cheese and livestock by-products. Due to their high hazard, especially type B1, and frequent occurrence in various foods, it has become essential to monitor these toxins in post-harvest food products, during storage, during the processing chain and even during the long phases of conservation. There are aflatoxin detection methods that use very advanced technologies to respond in the shortest possible time. This research aims to make a brief bibliographical review of studies showing new methods for the detection of aflatoxins in food.

Key words: Aflatoxins, detection methods, foods.

INTRODUCCIÓN

Las aflatoxinas constituyen el contaminante natural de alimentos más extendido a nivel mundial, con gran impacto negativo en la salud, seguridad alimentaria y

la economía de muchos países, particularmente de las regiones en desarrollo. Se pueden encontrar de modo natural en un gran número de productos agrícolas utilizados como materias primas en la preparación de alimentos para humanos y

animales, que incluye granos, cereales, frutas frescas, frutos secos, nueces, semillas oleaginosas y lácteos o como contaminantes y residuos tóxicos de los productos en las explotaciones zootécnicas (leche, huevos, carnes) (Requena *et al.*, 2005). Debido a su alta toxicidad y elevada frecuencia de aparición en alimentos, se hace necesario el monitoreo constante y su identificación. De acá surgió la presente revisión bibliográfica, fundamentada en identificar la diversidad de métodos actualmente empleados para evaluar este contaminante.

Aflatoxinas

Las micotoxinas son producidas por hongos filamentosos, principalmente de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*. Estos hongos pueden crecer en una amplia gama de productos agrícolas en el campo, pero también durante la postcosecha y el almacenamiento, pudiéndose encontrar micotoxinas en diversos alimentos y piensos. El grado de contaminación dependerá de factores como temperatura, la humedad y el sustrato (Imperato *et al.*, 2011). Se definen como compuestos policetónicos resultantes de las reacciones de condensación que tienen lugar cuando en determinadas condiciones físicas, químicas y biológicas se interrumpe la reducción de los grupos cetónicos en la biosíntesis de los ácidos grasos realizada por

los mohos. Estos ácidos grasos son metabolitos primarios utilizados por los mohos como fuente de energía. Las micotoxinas se suelen formar al final de la fase exponencial o al principio de la fase estacionaria del crecimiento del moho (Gimeno y Martínez, 2003). La presencia de *Aspergillus* no necesariamente implica presencia de aflatoxinas, dado que hay cepas no toxigénicas. Sin embargo, la ausencia de *Aspergillus* en el alimento no necesariamente implica que el alimento no tenga aflatoxinas, debido a que la toxina puede persistir aun después de que el moho haya desaparecido.

Acorde a la Organización Panamericana de la Salud (OPS, 1983) las aflatoxinas son denominadas B1, B2, G1 y G2; siendo la aflatoxina B1 considerada la más importante de todas, tanto por la mayor concentración y frecuencia de aparición como por su potencia tóxica (Malone *et al.*, 2000; Otta *et al.*, 2000). Es considerada el compuesto biológicamente más activo de la familia de las aflatoxinas y se presenta en un número importante en alimentos para animales y humanos (Rojas y Wilches, 2012), siendo el principal tipo de compuesto a identificar cuando se analiza el alimento.

Las aflatoxinas deberían encontrarse en los alimentos en la menor cantidad posible, y

puesto que los agentes productores de dichas sustancias se encuentran en los nutrientes primarios como contaminantes naturales, no se puede evitar completamente la exposición humana o de animales, por lo que se debe tolerar hasta ciertos niveles (Ferris *et al.*, 2001). A nivel mundial, las concentraciones y niveles máximos permisibles de aflatoxinas en materias primas y alimentos terminados varían de una micotoxina a otra y de un país a otro. En el caso de Latinoamérica, lo máximo permitido de aflatoxinas en humanos es de 20 -30 ppb, y es variable dependiendo del tipo de alimento que sea evaluado. En Venezuela se ha reportado la presencia de aflatoxinas y hongos afectando cultivos de maíz, maní, algodón, ajonjolí, girasol, cacao, sorgo y soya (Martínez, 1991; Mazzani *et al.*, 1995; Fernández *et al.*, 2000). Algunos casos de estudio de importancia en maíz han sido analizados y reportados por Espinoza *et al.* (2007) y Martínez (2014). Espinoza *et al.* (2007) evaluaron la presencia de aflatoxinas y hongos aflatoxigénicos en maíz amarillo tipo duro clase I de la zona nororiental, donde señala su presencia representa un grave problema para la industria alimenticia. La detección y cuantificación se realizó por medio del método inmunoenzimático Agri-Screen® (Veratox/ELISA). Las especies aisladas

fueron: *Penicillium citrinum* (28,57%), *P. piceum* (14,29%), *Acremonium strictum* (28,57%), *Fusarium oxysporum* (14,29%) y *Aspergillus flavus* (14,29%), valores de aflatoxinas superiores a los indicados en las normas de control de calidad en Venezuela, resultado que representa un riesgo potencial en la ingesta de éste producto alimenticio.

En una investigación más reciente, Martínez (2014) evaluó cuatro métodos como técnicas rápidas para la determinación de aflatoxinas en muestras de maíz y derivados en una empresa fabricante de productos a base de cereales y leguminosas para el consumo humano y animal, a fin de seleccionar el procedimiento más adecuado para el análisis en diferentes etapas del procesamiento: método Fluorométrico (Lámpara Negra), Reveal, RidaQuick y Veratox/ELISA. Los productos analizados se tomaron de áreas en materia prima (maíz amarillo y maíz blanco), área de proceso (subproducto de maíz y harina de proceso), área de almacenamiento (grits 4, grits 16, grits 80) y área de producto terminado (harina precocida). Obtuvo como resultado 39 muestras positivas (27,08%) por el método Fluorométrico; 42 muestras positivas (29,16%) por método Reveal; 26 muestras positivas (18,05%) por RidaQuick y 18 muestras positivas (12,5%) por método

Veratox/ELISA; siendo todas verificadas por HPLC, el cual tuvo como resultado un total de 3 muestras positivas (2,08%). La investigadora concluyó que ninguno de los métodos rápidos empleados es capaz de indicar fiablemente la existencia del hongo, siendo el HPLC el mejor análisis para identificar este contaminante.

Inmunoafinidad para simplificar la extracción y mejorar la recuperación y medición de micotoxinas en productos alimenticios, así como incorporar la rapidez de obtención en resultados. Existen otros métodos de reciente incorporación analítica, siendo su sensibilidad y el uso de soportes estadístico, entre otros factores, algunas limitantes de su empleo acorde a la

Tabla 1. Comparación de métodos, ventajas y desventajas de determinación de aflatoxinas.

Métodos	Ventajas	Desventajas	Referencias
Cromatografía en Capa Fina (TLC)	Método de cuantificación fiable (combinado con densitometría) Exactitud y precisión comparable con HPLC Método oficial de referencia para las aflatoxinas	Tipo anticuado Separación destructiva de muestras Sustituido en gran medida por HPLC para análisis de aflatoxinas	Rahmani et al., 2009; Shephard, 2009
Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC)	Metodología de cuantificación fiable, sensible, selectivo y repetible Puede ser automatizado Método oficial de referencia para las aflatoxinas	Tipo costoso, requiere un operador especializado y un especialista para interpretar los resultados Separación destructiva de muestras Puede requerir derivatización	Cho et al., 2008; Shephard, 2009;
Cromatografía Líquida/ Espectroscopía de Masa (LC/MS)	Análisis simultáneo de micotoxinas Limite de detección bajo (LC-MS / MS) Método confirmatorio No requiere derivatización	tipos muy caros, requieren un operador especializado y un especialista para interpretar los resultados • La sensibilidad depende de la ionización alibración asistida por matriz para análisis cuantitativo • Carece de normas internas	Krska et al., 2008; Hruska et al., 2013; Pascale, 2009; Shephard, 2009

Métodos para la determinación de aflatoxinas

Los métodos analíticos clásicos y de mejor aproximación en la cuantificación de las aflatoxinas incluyen cromatografía en capa fina (TLC), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), espectrometría de masas (MS) y electroforesis capilar. En los últimos años, la mayoría de estas técnicas han sido acopladas con técnicas de

concentración del contaminante a evaluar, tales como espectroscopía de infrarrojo cercanos (NIRS), imágenes hiperespectrales y biosensores. A fin de ilustrar las variantes más resaltantes de cada técnica se consolidó un resumen comparativo (Tabla 1) sobre ventajas y desventajas en los métodos tradicionales actualmente empleados, así como de éstos nuevos métodos publicados para la detección de aflatoxinas.

Cont. (Tabla. 1).

Ensayo por Inmunoadsorción Ligada a Enzimas (ELISA)	<ul style="list-style-type: none"> · Específico, rápido y fácil de usar Equipos de bajo costo Límite de detección bajo Análisis simultáneo de muestras múltiples Análisis semi-cuantitativos (screening) o cuantitativos posibles Poco limitado de disolventes orgánicos 	<ul style="list-style-type: none"> · Posible reactividad cruzada con micotoxinas relacionadas Interferencia de matriz Posibles falsos positivos/negativos Rango de detección estrecho Puede ser necesario realizar un análisis de cromatografía (LC) confirmatorio 	<ul style="list-style-type: none"> · Pascale, 2009; Pittet, 2005
Ensayo o Columna de Inmunofluorescencia (IAC)	<ul style="list-style-type: none"> · C en combinación con Fluorometría Líquida es comparable con LC para la determinación de aflatoxinas Método oficial 	<ul style="list-style-type: none"> · Destrucción de la muestra Limitado al análisis de aflatoxinas totales 	<ul style="list-style-type: none"> · Lattanzio <i>et al.</i>, 2011; Pittet, 2005
Inmunoensayo de polarización de fluorescencia	<ul style="list-style-type: none"> · Rápido, no necesita limpieza Analizador específico de micotoxinas para análisis Muy sensible Portátil 	<ul style="list-style-type: none"> · Validación limitada con ELISA o HPLC Posible reactividad cruzada con micotoxinas relacionadas Interferencia de matriz 	<ul style="list-style-type: none"> · Lattanzio <i>et al.</i>, 2011; Lippolis y Maragos, 2004; Pascale, 2009

Tabla 1. Ventajas y desventajas de los métodos usados para determinar aflatoxinas en alimentos.

Cont. (Tabla 1.)

Electroforesis Capilar (CE)	<ul style="list-style-type: none"> · Especial para separar micotoxinas muy relacionadas Muy sensible Realiza análisis multicomponentes cuando se combina con inmunoensayos 	<ul style="list-style-type: none"> · Supeditado al uso de laboratorio debido a la instrumentación Dificultad para detectar bajas concentraciones de aflatoxinas 	<ul style="list-style-type: none"> · Maragos, 2004
Espectroscopia de Infrarrojo Cercano (NIRS)	<ul style="list-style-type: none"> · Rápido, no destructivo No requiere extracción ni limpieza Fácil de usar 	<ul style="list-style-type: none"> · Modelo de calibración debe ser validado Conocimiento de métodos estadísticos Mala sensibilidad (límite alto de detección) Equipo costoso 	<ul style="list-style-type: none"> · Pardo <i>et al.</i>, 2005; Dowell <i>et al.</i>, 2002; Pearson y Wicklow, 2006; Pearson <i>et al.</i>, 2001; Tallada <i>et al.</i>, 2011

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La detección de aflatoxinas en alimentos sigue siendo un tema importante en términos de su efectiva identificación y cuantificación. Esta investigación es un aporte bibliográfico de los enfoques analíticos actuales su detección y las últimas investigaciones sobre métodos rápidos y no invasivos. Sin embargo, el inconveniente de estas técnicas

más avanzadas parece estar asociado a la variabilidad de la muestra durante el proceso de muestreo, poca precisión y exactitud, por lo que un método confirmatorio es requerido para evaluar la presencia/ausencia de aflatoxinas. Se plantea entonces tener un enfoque integrado que incorpore métodos de detección rápida con métodos analíticos y confirmatorios como la combinación de

análisis más adecuado en la detección fiable de éste contaminante en alimentos.

Cont. (Tabla 1.)

Bonifazi, G. y Fanelli, C. 2010. Early detection of toxigenic fungi on maize by hyperspectral imaging analysis. *International Journal of Food Microbiology*. 144: 64-71.

Nariz Electrónica (EN)	Medios rápidos para controlar y mejorar la calidad microbiológica de los alimentos	Necesidad de mejorar la selectividad y reducir las interferencias (ej. la humedad) Compensar los efectos de la deriva Estudios de viabilidad limitados y mala validación	: De Lucca et al., 2012; Gardner y Bartlett, 1994
Imágenes Hiperespectrales	Rápido, no destructivo Sin extracción ni limpieza Funcionamiento fácil de usar Alta resolución espectral y espacial Potencial para aplicaciones de detección en línea	Separación de las muestras sólidas para preparación Extracto de limpieza necesario para mejorar la sensibilidad Reactividad cruzada con micotoxinas relacionadas	Malhotra <i>et al.</i> , 2014; Meneely y Elliott, 2014; Pascale, 2009
Biosensores	Rápido, sin limpieza Necesita selectividad y bajo límite de detección Facilidad de uso y portabilidad Diseño sencillo y autónomo Bajo costo	Variación en la reproducibilidad y repetibilidad (mejorada con el uso de materiales novedosos)	Rubert <i>et al.</i> , 2012; Tothill, 2011

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Berardo, N., Pisacane, V., Battilani, P., Scandolaro, A., Pietri, A. y Marocco, A. 2005. Rapid detection of kernel rots and mycotoxins in maize by near-infrared reflectance spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53: 8128-8134.
- Cho, S., Lee, C., Jang, M., Son, Y., Lee, S., Choi, I., Kim, S.-H. y Kim, D. 2008. Aflatoxins contamination in spices and processed spice products commercialized in Korea. *Food Chemistry*. 107: 1283-1288.
- De Lucca, A., Boué, S., Carter, C. y Bhatnagar, D. 2012. Volatile profiles and aflatoxin production by toxigenic and non-toxigenic isolates of *Aspergillus flavus* grown on sterile and non-sterile cracked corn. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. 19: 91-98.
- Del Fiore, A., Reverberi, M., Ricelli, A., Pinzari, F., Serranti, S., Fabbri, A., Dowell, E., Pearson, T., Maghirang, E., Xie, F. y Wicklow, D. 2002. Reflectance and transmittance spectroscopy applied to detecting fumonisin in single corn kernels infected with *Fusarium verticillioides*. *Cereal Chemistry* 79: 222-226.
- Espinoza, D., Badaqui, M., Vera, M., De Freitas J. y Sangermano, A. 2007. Presencia de aflatoxinas y hongos aflatoxigénicos en maíz amarillo tipo duro clase I de la zona nororiental de Venezuela. *Revista Saber*. 19:1 14-16.
- Fernández, G., Negrón, G., Isea, G., Sánchez, E. 2000. Reporte de análisis cuantitativo de aflatoxinas por el método ELISA en muestras de materias primas de alimento balanceado para aves provenientes de una planta ubicada en el municipio Mara del estado Zulia, Venezuela. *Revista Científica Veterinaria. FCV-LUZ*. Vol. 10: 65-69.

- Ferris, J., García, J., Berbel O. y Clargimeno, S. 2001. Micotoxinas y cáncer pediátrico. *Revista Especialización Pediátrica*. 3: 279-280.
- Gardner, J. y Bartlett, P. 1994. A brief history of electronic noses. *Sensors Actuators B: Chemical*. 18: 210-211.
- Gimeno A. y Martínez M. 2003. Micotoxinas y micotoxicosis en animales y humanos: análisis de riesgo de las más relevantes micotoxicosis en humanos. *Special Nutrients Inc. USA*. 1-160.
- Hruska, Z., Yao, H., Kincaid, R., Darlington, D., Brown, R.L., Bhatnagar, D. y Cleveland, T. (2013). Fluorescence imaging spectroscopy (FIS) for comparing spectra from corn ears naturally and artificially infected with aflatoxin producing fungus. *Journal of Food Science*. 78: T1313-T1320.
- Imperato, R., Campone, L., Piccinelli, A.L., Veneziano, A. y Rast, L. 2011. Survey of aflatoxins and ochratoxin a contamination in food products imported in Italy. *Food Control*. 22: 1905-1910.
- Krska, R., Schubert, P., Molinelli, A., Sulyok, M., MacDonald, S. y Crews, C. 2008. Mycotoxin analysis: an update. *Food Additives and Contaminants Part A*. 25: 152-163.
- Lattanzio, V., Gatta, S., Godula, M. y Visconti, A. 2011. Quantitative analysis of mycotoxins in cereal foods by collision cell fragmentation-high-resolution mass spectrometry: performance and comparison with triple-stage quadrupole detection. *Food Additives and Contaminants: Part A*. 28: 1424-1437
- Li, P., Zhang, Z., Hu, X. y Zhang, Q. 2013. Advanced hyphenated chromatographic-mass spectrometry in mycotoxin determination: status and prospects. *Mass Spectrometry Reviews*. 32: 420-452.
- Lippolis, V. y Maragos, C. 2014. Fluorescence polarisation immunoassays for rapid, accurate and sensitive determination of mycotoxins. *World Mycotoxin Journal*. 7: 479-490.
- Malhotra, B., Srivastava, S., Ali, M. y Singh, C. (2014). Nanomaterial-based biosensors for food toxin detection. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 174 (3): 880-896.
- Malone B, Humphrey C, Romer T, Richard J. 2000. Determination of Aflatoxins in Grains and Raw Peanuts by a Rapid Procedure with Fluorometric Analysis. *Journal of AOAC International*. 83 (1):95-8.
- Maragos, C. (2004). Emerging Technologies for Mycotoxin Detection. *Toxin Reviews*. 23: 317-344.
- Martínez A. 1991. Contribución al estudio de la flora fúngica, su capacidad toxicogénica y niveles de aflatoxinas en cereales y oleaginosas cultivadas en Venezuela. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Ciencias. Caracas. Trabajo de Ascenso. 290.
- Martínez, Y. 2014. Evaluación y selección de métodos para la determinación de aflatoxina en muestras de maíz y sus derivados. Universidad Simón Bolívar. Decanato de postgrado. Trabajo de grado.
- Mazzani C., Luzón O., González N. y Quijada P. 1995. Efecto del Shield-Na Plus (propionato de sodio y sorbato de potasio) sobre el crecimiento y la esporulación in vitro de cinco especies de hongos toxigénicos en Venezuela. *Fitopatología Venezuela*. 8: 33-36.
- Meneely, J. y Elliott, C. 2014. Rapid surface plasmon resonance immunoassays for the determination of mycotoxins in cereals and cereal-based food products. *World Mycotoxin Journal*. 7: 491-505.

- Organización Panamericana de la Salud (OPS). 1983. Criterio de Salud 11. Micotoxinas. Publicación Científica N° 453.
- Otta K., Papp E. y Bagöcsi B. 2000. Determination of aflatoxins in food by overpressured layer chromatography. *Journal of Chromatography A*. 882:11-16.
- Pascale, M. (2009). Detection methods for mycotoxins in cereal grains and cereal products. *Proceedings for Natural Sciences* 117: 15-25.
- Pearson, T. y Wicklow, D. 2006. Detection of corn kernels infected by fungi. *Transactions of the ASAE*. 49: 1235-1245.
- Pearson, T., Wicklow, D., Maghirang, E., Xie, F. y Dowell, F. 2001. Detecting aflatoxin in single corn kernels by transmittance and reflectance spectroscopy. *Transactions of the ASAE*. 44: 1247-1254.
- Pittet, A. 2005. Modern methods and trends in mycotoxin analysis. *Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene*. 96: 424-444.
- Rahmani, A., Jinap, S. and Soleimany, F. 2009. Qualitative and quantitative analysis of mycotoxins. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 8: 202-251.
- Requena, F., Saume, E. y León, A. 2005. Micotoxinas: Riesgos y prevención. *Revista Zootecnia Tropical*. 23:4.
- Rojas L; Wilches A. 2012. Coexistencia de aflatoxinas, zearalenona y deoxinivalenol en alimentos de consumo infantil. *Revista Bistua*. 10:73-79.
- Rubert, J., Dzuman, Z., Vaclavikova, M., Zachariasova, M., Soler, C. y Hajslova, J., 2012. Analysis of mycotoxins in barley using ultra high liquid chromatography high-resolution mass spectrometry: comparison of efficiency and efficacy of different extraction procedures. *Talanta*. 99: 712-719.
- Shephard, G. (2009). Aflatoxin analysis at the beginning of the twenty-first century. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 395: 1215-1224.
- Tallada, J., Wicklow, D, Pearson, T. y Armstrong, P. 2011. Detection of fungus-infected corn kernels using near infrared reflectance spectroscopy and color imaging. *Transactions of the ASAE*. 54: 1151-1158.
- Tothill, I. 2011. Biosensors, nanomaterials, and their application for mycotoxin determination. *World Mycotoxin Journal* 4: 361-374.
- Yao, H., Hruska, Z., Kincaid, R., Brown, R.L. and Cleveland, T.E., 2008. Differentiation of toxigenic fungi using hyperspectral imagery. *Sensing and Instrumentation for Food Quality and Safety* 2: 215-224.
- Yao, H., Hruska, Z., Kincaid, R., Brown, R., Cleveland, T. y Bhatnagar, D. 2010. Correlation and classification of single kernel fluorescence hyperspectral data with aflatoxin concentration in corn kernels inoculated with *Aspergillus flavus* spores. *Food Additives and Contaminants Part A*. 27: 701-709.