

Aflatoxinas

Estudio comparativo de distintas muestras mediante método de detección rápido

Dra. Q. F. Lucy Teira* y Q. F. Silvia Alvarenga**

INTRODUCCION

Las aflatoxinas son metabolitos fúngicos secundarios que aparecen naturalmente como contaminantes de distintos productos, principalmente aquellos de origen vegetal. Se trata de un grupo de compuestos tóxicos entre los cuales citaremos las toxinas B₁, G₁, B₂ y G₂. En productos de origen animal encontramos también las toxinas M₁ y M₂, derivadas de las anteriores. (6)

Los principales productores de estas toxinas pertenecen al género *Aspergillus*, siendo la especie *Aspergillus flavus*, la que produce mayor cantidad. Su hábitat es el suelo, las materias orgánicas y los granos fundamentalmente oleaginosos. Se le ubica dentro del grupo de "hongos de almacenamiento", dado que es capaz de crecer sobre sustratos con bajo contenido de humedad; de ahí la necesidad de controlar no solamente las condiciones de recolección, sino también las de almacenamiento posterior, sobre todo en el caso de granos oleaginosos. (10)

Dada su naturaleza química, se trata de productos de gran estabilidad tanto química como térmica, de ahí la importancia de su presencia no solamente en alimentos de consumo directo, sino también en aquellos que requieran algún tratamiento previo al consumo. (12)

Los efectos de las micotoxinas son muy variados, pudiendo producir desde inflamaciones y lesiones de piel, hasta trastornos del sistema nervioso central, hemorragias, leucopenia, vómitos, cirrosis. (14, 15)

Nuestro país no ha establecido aún límites de aceptación para estas toxinas. Las tolerancias fijadas a nivel internacional, basadas principalmente en consideraciones toxicológicas y en los límites de sensibilidad de los métodos analíticos usados, varían entre 5 y 30 partes por billón (ppb).

En el presente trabajo se fijó como límite para distinguir entre "muestra contaminada" (positiva) y "muestra con aflatoxina no detectable" (ND) el valor 10 ppb que corresponde al límite de detección del método usado.

* Capitán QF, Lab. Farmacéutico S.S.FF.AA. Prof. Agdo. Microbiología General, Fac. de Química.

** Ayudante de Investigación, Microbiología General. Fac. de Química.

MATERIALES Y METODOS.

EQUIPOS.

- Molinillo de café o máquina picadora doméstica.
- Tubos de vidrio: diámetro exterior: 6mm; diámetro interior: 4mm; largo: 20cm.
- Lámpara UV.
- Erlenmeyer.
- Embudos de vidrio.
- Papel de filtro.
- Embudos de decantación.
- Vasos de bohemia.
- Tubos de ensayo.

REACTIVOS [calidad pura para análisis (ppa)].

- Acetona.
- Benceno.
- Cloroformo.
- Acetonitrilo.
- Isopropanol.
- Sulfato de amonio.
- Sulfato de sodio.
- Alúmina ácida, 80-200 mesh, estandarizada según Brockmann para cromatografía en columna. Para ser usada debe activarse agregando a 100g de alúmina, 3ml de agua destilada; dejar toda la noche.
- Sílica gel para cromatografía en columna; 100-200 mesh. Condiciones de activación: 2h a 110⁰ C; almacenar en desecador.

PROCEDIMIENTO.

A. Preparación de la columna (Fig. 1)

- Colocar en extremo inferior del tubo de vidrio, un trozo de algodón (previamente lavado con cloroformo caliente, luego escurrido y secado al aire) firmemente ajustado.
- Agregar la alúmina ácida hasta una distancia de 1.5cm por encima del algodón.
- Agregar la sílica gel hasta una distancia de 10cm por encima de la alúmina.
- Sobre la sílica gel agregar un trozo de algo-

- dón y ajustarlo firmemente en el lugar.
- Compactar la columna y reajustar el tapón de algodón superior.
- Almacenar las columnas preparadas en desecador.

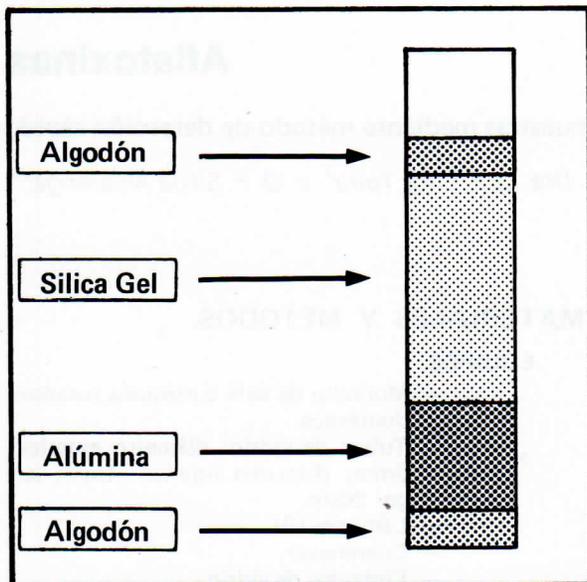


Fig. 1.

B. Extracción de la muestra.

- Pesar 50g de muestra (si se trata de granos se debe proceder previamente a su molienda).
- Agregar 150ml de solvente de extracción [acetona:agua(85:15)].
- Agitar 3 min.
- Filtrar a través de papel de filtro recogiendo los primeros 50ml de filtrado.
- Agregar al filtrado 25ml de solución saturada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (70g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y 100ml de agua) y 125ml de agua.
- Mezclar y dejar 2 min. Luego filtrar.
- Transferir 100ml de filtrado a embudo de decantación y extraer con 3ml de benceno agitando vigorosamente 30s.
- Descartar capa acuosa.
- Tratar capa orgánica con 50ml de NaCl 5% (P/V). Agitar suavemente.
- Descartar capa acuosa

- Transferir capa bencénica a tubo de ensayo y secar con Na_2SO_4 anhidro.

C. Análisis de la muestra.

- Sumergir la parte inferior de la columna en el extracto bencénico.
- Permitir que el solvente alcance hasta 1cm por encima de la alúmina.
- Quitar la columna y secarla externamente con papel de filtro.
- Rápidamente sumergirla en un tubo de ensayo que contenga aproximadamente 5ml de solvente de desarrollo [cloroformo: acetoneitrilo:isopropanol (93:5:2)].
- Desarrollar la cromatografía durante 5 ó 6 min. Nunca dejar que el solvente alcance la parte superior de la columna.
- Quitar la columna del solvente, secarla externamente e inmediatamente examinarla a la luz UV. La presencia de aflatoxinas queda indicada por la aparición de una banda nítida de fluorescencia azul ubicada aproximadamente 1 ó 2cm por encima de la zona de la alúmina (Fig. 2). (Con el tiempo la banda tiende a difundir, ensanchándose y disminuyendo el nivel de detección).

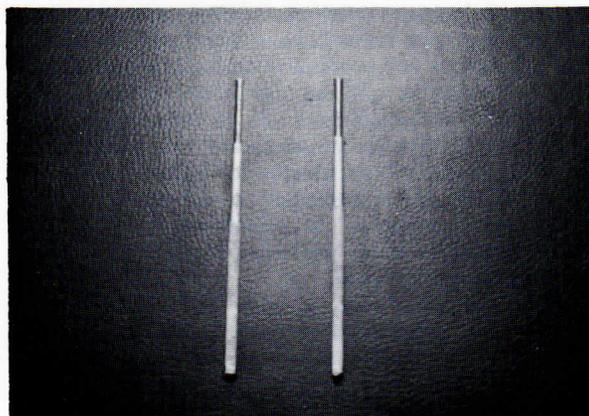


Fig. 2

RESULTADOS.

En las tablas siguientes se detallan los resultados obtenidos con los 4 tipos de alimentos, usando la técnica descrita.

TABLA I.
Análisis de muestras de manés salados.

Marcas	No. de muestras analizadas	Muestras positivas	Porcentaje de muestras positivas
A	21	15	71
B	21	12	57
C	5	5	100
D	35	7	20
E	18	5	28

TABLA II.

Comparación de los resultados obtenidos con los distintos productos analizados.

Producto	No. de muestras analizadas	Muestras positivas	Porcentaje de muestras positivas
Maníes salados	100	44	44
Maníes crudos	12	11	92
Harina de trigo	18	0	0
Harina de maíz	11	0	0

DISCUSION.

De acuerdo a los valores obtenidos, podemos concluir que en el caso de las muestras de maníes salados, donde el número analizado (100) es significativo, se debería alertar a los consumidores por el riesgo que ello implica.

En maníes crudos, los datos son alarmantes teniendo en cuenta que de un número total de muestras analizadas igual a 12, se obtuvieron 11 positivas.

Comparando ambos resultados se corrobora que el procesamiento de los maníes no destruye la toxina.

Las muestras de harinas (trigo y maíz) dieron resultados negativos. Este tipo de alimento fue seleccionado para el análisis debido a que en varias oportunidades llegaron al laboratorio muestras de granos contaminados con especies de hongos productores de toxinas.

La toxicidad de las micotoxinas ha sido bien estudiada experimentalmente, y en países como Asia y África las estadísticas indican que una incidencia alta de carcinomas, coincide con las dietas alimenticias muy contaminadas. (10)

La indiferencia frente a los problemas de micotoxinas ha quedado de lado, a tal punto que actualmente se buscan las mismas en derivados tales como leche, manteca, etc. (11, 12)

En nuestro país, las condiciones climáticas imperantes y la falta de buen asesoramiento técnico por parte de la mayoría de los productores, en lo que respecta a prácticas adecuadas de recolección, transporte y almacenamiento de productos agrícolas (principalmente granos), son las principales causas de la contaminación. Mientras el segundo factor no se corrija, la presencia de aflatoxinas en los alimentos seguirá representando un peligro potencial.

RESUMEN

Se analizan muestras de alimentos de consumo humano para determinar la presencia de aflatoxina B mediante un método rápido de detección.

Las muestras fueron adquiridas en distintos comercios de la ciudad de Montevideo.

Los alimentos analizados son: maníes salados (de copetín), maníes crudos, harina de trigo y harina de maíz.

El método analítico consiste en una extracción en medio orgánico (acetona:agua) seguida de purificación del extracto y tratamiento posterior con bence-

no. Para la detección de la toxina se hace cromatografía en columna ascendente, con revelado al UV.

Los resultados fueron satisfactorios en el caso de las muestras de harina de trigo y de maíz. Se encontró un porcentaje alto de muestras positivas en el caso de granos oleaginosos.

SUMMARY

Specimens of food for human use are analyzed in order to determine the presence of B aflatoxin through a quick method for detection.

The specimens were bought in different shops in the city of Montevideo. The food analyzed was: salt peanuts, raw peanuts, wheat flour and corn flour.

The analytical method consists of an extraction in an organic medium (acetone:water) followed by purification of the extract and then treatment with benzene. Chromatography in ascending column with UV development was performed for the detection of the toxin.

Results were satisfactory in the case of the wheat and corn flour specimens. A high percentage of positive specimen was found in oleaginous cereals.

RESUME

On fait l'analyse des échantillons d'aliments de consommation humaine pour déterminer la présence d'aflatoxine B par une méthode rapide de détection.

Les échantillons furent acquises dans différents commerces de la ville de Montevideo (Uruguay). Les aliments objets de l'analyse sont: cacahuètes salés, crus, farine de blé, et farine du maïs. La méthode analytique consiste donc dans l'extraction en milieu organique (acétone-eau) suivie de purification de l'extract et traitement postérieur avec du Benzene.

Pour détecter la toxine on fait chromatographie en colonne ascendente avec développement UV.

Les résultats furent satisfaisants dans le cas des échantillons de la farine du blé et du maïs. On a trouvé un haut pourcentage des échantillons positives dans le cas de grains oléagineux.

BIBLIOGRAFIA.

1. APHA. Compendium of Methods for the microbial examination of foods. 1976
2. **Barabolak R**, Colburn CR, Smith RJ. Journal of the AOAC. 1974;:V57, 3:764-6
3. **Bhatnagar RK, Mukerji KG, Maggon KK, Venkitasubramanian TA**. Biotechnol. 1979; 6:99-102
4. **Chang HH, De Vries JW, Hobbs WE**. J Assoc Off Anal Chem 1979; Vol 62, 6
5. **Davis ND, Dickens JW, Freie RL, Hamilton PB, Shotwell OL, Wyllie TD**. "Mycotoxins" J Assoc Off Anal Chem 1980; Vol 63, 1: 95-102
6. Goldblatt (editor); "Aflatoxin"; Food Science and technology 1969 Academic Press
7. **Holiday CE, Lansden J**. J Agric Food Chem, 1975, Vol 23, 6
8. **Lillehoj EB, et al** J Assoc Off Anal Chem 1979, Vol 62 5: 1083-6
9. **Lindner E**. "Toxicología de los alimentos", 1978
10. **Moreau C**. "Moisissures toxiques dans l'alimentation" 2o. Ed 1974
11. Official Methods of Analysis, 1975 12th Ed. AOAC
12. Official Methods of Analysis, 1980 13th Ed. AOAC
13. **Shannon GM, Shotwell OL**. J Assoc Off Anal Chem 1979, Vol 62, 5: 1070-5
14. **Stoloff L**. "Report on Mycotoxins" J Assoc Off Anal Chem 1979, Vol 62, 2: 356-62
15. **Davis ND, Dickens JW, Freie RL, Hamilton PB, Shotwell OL, Wyllie TD**. "Mycotoxins". J Assoc Off Anal Chem. 1980 Vol 63, 2: 247-57
16. **Stoloff L**. "Aflatoxin Control: Past and Present", J Assoc. 1980 Off Anal Chem. Vol 63, 5: 1067-73