

Presencia de aflatoxinas en algunos alimentos.¹

Presence of aflatoxins in some feed.

Pedro Izquierdo C.²
Evelyn Rojas V.²
Lisbeth Rangel.²
Enrique Márquez S.²

Resumen

Se realizó la detección de aflatoxinas en 10 muestras (maní, ajonjolí, algodón, sorgo, maíz, arroz, soya, alimento concentrado, yuca y trigo) utilizadas como materias primas para la alimentación animal. La extracción de aflatoxinas se realizó con acetona al 70% y la purificación con acetato de plomo al 20%. La tipificación de las aflatoxinas se efectuó por Cromatografía de Capa fina (TLC), usando el sistema de solventes cloroformo:acetona 9:1 (v/v), comparando los valores de Rf y las características de fluorescencia con la de estándares purificados. Los resultados indican que el 80% de las muestras analizadas contienen aflatoxina. La aflatoxina B2 fue la de mayor incidencia, mientras que la G2 fue la de menor incidencia. Las muestras de maní y alimento concentrado presentaron todas las aflatoxinas analizadas. En la yuca y en el trigo no se detectó la presencia de aflatoxinas.

Palabras claves: Aflatoxinas, alimentos, hongos, extracción.

Abstract

Ten samples (peanut, sesame, cotton, sorghum, corn, rice, soy, concentrated feed, cassava and wheat) were analyzed for aflatoxin content. The chosen samples had, or was suspected to have had fungi growth. Extraction of aflatoxin was made using 70% acetone in water, and the remaining impurities were cleaned with 20% lead acetate solution. Aflatoxin B1, B2, G1 and G2 were identified by comparison of their fluorescence and Rf values with those of purified standards, by means of thin layer chromatography. Chloroform- acetone 9:1 (v/v) was the solvent system used. Results showed that 80% of the analyzed sample contain aflatoxin. The estimated amounts of aflatoxin in samples ranged from 2 to 75 ppb. Aflatoxin B2 was the one with the largest incidence. While G2 was

Recibido el 14-07-95 • Aceptado el 14-11-95

1. Investigación financiada por el CONDES-LUZ.

2. Unidad de Investigación Ciencia y Tecnología de Alimentos. Facultad de Ciencias Veterinarias. LUZ.

the one with the lowest incidence. Peanut and concentrated feed had all type of aflatoxin. While neither cassava nor wheat had aflatoxin.

Key words: Aflatoxin, food, fungi, extraction.

Introducción

Las aflatoxinas conforman un grupo de micotoxinas producidas principalmente por hongos del género *Aspergillus* (3, 7, 17). El conocimiento de los efectos que producen las aflatoxinas es de gran importancia en la producción ganadera, ya que éstas causan perjuicios económicos al disminuir el ritmo de crecimiento de los animales, además de tener relación con la presencia de algunas enfermedades (1, 6). Específicamente se ha comprobado el incremento en el índice de mortalidad en cerdos a los cuales se les suministró por un período de 16 semanas, durante el crecimiento, una dieta contaminada con 0.2 y 0.7 mg/kg de aflatoxina B1 y G1, respectivamente, y se observó en éstos disminución del apetito, retardo en el crecimiento y órganos internos aumentados de tamaño. Con otro grupo al cual se les suministró dietas mayores con 2.0 y 4.0 mg/kg de aflatoxina se observó una disminución brusca del apetito y necrosis hepática (1).

Las aflatoxinas tienen numerosos efectos similares a los efectos de los antibióticos, actuando sobre diversos procesos bioquímicos en los microorganismos, animales y plantas. Sin embargo, a diferencia de los antibióticos, las aflatoxinas poseen un elevado poder carcinogénico y efectos morbosos como abortos, producción de crías pequeñas y débiles (7).

La presencia de aflatoxinas en los alimentos los hace inadecuados para el consumo humano y animal. Muestras de carne, leche y huevos provenientes de animales alimentados con raciones adicionadas con aflatoxinas, han presentado las toxinas o derivados de ellas en sus productos (2, 6, 10).

Las aflatoxinas se producen en gran cantidad de productos agrícolas como el coco, maní, arroz, soya, sorgo, maíz, entre otros (13, 14, 15, 16). La cantidad de aflatoxinas presente en éstos se encuentra condicionada a factores de temperatura y humedad, condiciones estas estrechamente vinculadas al crecimiento de hongos (3, 10, 11).

La producción de aflatoxinas es dependiente de las diferentes condiciones ambientales. En trabajos realizados en los cuales se usó maní almacenado se encontró que las aflatoxinas se pueden producir entre 12 y 41°C, dependiendo también de la humedad relativa (mínima 83%) y el estado de maduración de los granos de maní (4). Por estas razones hay gran posibilidad de encontrarlas en los productos agrícolas de la región Zuliana, en donde los promedios de temperatura y humedad relativa son de 27.9°C y 75%, respectivamente, las cuales permiten el crecimiento del hongo y la producción de sus metabolitos. Esta posibilidad aumenta por el hecho de que muchos lugares

de almacenamiento de alimentos se encuentran en las zonas adyacentes al Lago, donde la humedad y la temperatura son óptimas para la producción de aflatoxinas, puesto que la primera se incrementa por la cercanía al Lago.

El objetivo de este trabajo es el de determinar aflatoxinas en productos agrícolas importantes de la región, que sean potencialmente susceptibles al crecimiento de hongos y a la producción de aflatoxinas.

Materiales y métodos

Detección de aflatoxinas (comparación de sistemas de solventes): Para la detección de aflatoxinas se empleó cromatografía de capa fina (TLC). Utilizando cromatoplasmas preparadas de sílica-gel de 20 por 20 cm con 0,25 mm de espesor, sin indicador de fluorescencia. En estas placas debidamente preparadas se colocaron cantidades que fueron de 5 a 25 microlitros de aflatoxinas, para lo cual se utilizó una jeringa Hamilton. Luego cada placa se llevó a la cámara cromatográfica, la cual previamente se saturó con el sistema de solventes. Concluido el tiempo de desarrollo de la cromatoplasma, se dejó secar y se observó con luz ultravioleta de onda larga de 366 milimicras, localizando manchas fluorescentes causadas por la presencia de aflatoxinas. Se utilizó para su cuantificación el método de comparación en base a patrones conocidos.

En virtud de ser la bibliografía muy amplia en relación a los sistemas de solventes, éste se seleccionó mediante una prueba en la cual se compararon cuatro sistemas de solventes distintos (cuadro 1). Tomando especial atención a los valores de R_f y a la buena separación de las cuatro aflatoxinas, se

escogió el sistema cloroformo-acetona (9:1), por ser el más indicado de acuerdo a los parámetros establecidos.

Recuperación de aflatoxinas: Esta recuperación se realizó con la finalidad de comprobar la eficacia del método de extracción de aflatoxinas, el cual consistió en agregar cantidades conocidas de las mismas y luego tratar su extracción por el método sugerido.

Para la recuperación se pesó 50 g de muestra, y se le agregó una alícuota de 1,5 ml de una solución de cloroformo que contenía 4,3 $\mu\text{g/ml}$ de cada una de las aflatoxinas (patrones). El volumen o alícuota se mezcló bien con el alimento asegurándose que quedara una distribución homogénea del inóculo.

Las muestras luego de inoculadas con las cantidades conocidas de aflatoxina se sometieron al proceso de extracción, detección y cuantificación.

Producción de Aflatoxinas: Para la producción de Aflatoxinas se empleó el hongo *Aspergillus flavus parasiticus* cepa N° ATCC 15517, Colorado State University, Fortcollins Colorado, USA y se siguió la técnica sugerida por Shotwell (14).

a. Inoculación: Las esporas del *A. parasiticus* se inocularon en tubos que contenían Agar Czapek, manteniéndose a una temperatura de 28°C a fin de lograr un buen crecimiento luego se mezclaron las conidias con una solución de Triton X-100.

b. Fermentación: Para la fermentación se colocaron 50 g de arroz en un erlenmeyer el cual se humedeció con agua, dejándolo reposar por espacio de 2 horas. Luego se procedió a la inoculación con aproximadamente 0.5 ml de la suspensión de esporas. Al finalizar la fermentación, el medio de arroz tendría características observables de crecimiento micótico.

c. Extracción: La extracción de Aflatoxinas del arroz se realizó según la técnica descrita por W.A.Pons (9), para lo cual se eliminó el hongo por calentamiento. Procediendo luego a la extracción con cloroformo: acetona (1:1). Se centrifugó a 3000 rpm por 20 min y se filtró a través de lana de vidrio, recolectándose el filtrado en un embudo de separación a fin de separar la parte clorofórmica, ésta se filtró a través de un papel Whatman N° 1, se concentró en un evaporador y luego se resuspendió en 10 ml de cloroformo para su detección.

Extracción de aflatoxinas en alimentos:

a. Preparación de las muestras: Diez muestras diferentes (maní, ajonjolí, algodón, sorgo, maíz, arroz, soya, alimento concentrado, yuca y trigo) fueron seleccionadas para el ensayo. Se realizaron

ocho análisis por muestra.

Las muestras de alimentos fueron preparadas de acuerdo a la metodología sugerida por Pons (9). Para lo cual en principio se molieron en un molino de Wiley a fin de lograr una mayor uniformidad en la textura de las mismas.

b. Extracción: Se tomaron 50 g de muestra a los cuales se les añadió 20 ml de acetona al 70%, se homogenizó y se transfirió a un erlenmeyer con tapa, se agitó y se filtró, colectándose el sobrenadante.

c. Purificación: Este proceso se realizó siguiendo las recomendaciones de Pons (9), para ello a una parte del sobrenadante de la extracción se le agregó acetato de plomo al 20% y se centrifugó a 200 rpm por 20 min. El sobrenadante se transvasó y resuspendió en acetona y de nuevo se centrifugó. Al sobrenadante se le agregó cloroformo, se agitó vigorosamente, se dejó en reposo y se filtró a través de lana de vidrio con sulfato de sodio anhidro. La solución de cloroformo se evaporó al vacío y se resuspendió de nuevo en cloroformo para su posterior análisis por cromatografía (TLC).

Análisis estadístico: Los datos obtenidos fueron analizados utilizando el paquete estadístico SAS, mediante el procedimiento PROC GLM (12). Debido a las características intrínsecas de cada muestra y a que el principal interés fue detectar la presencia de aflatoxina, no se realizaron comparaciones entre las cantidades detectadas por muestra.

Cuadro 1. Valores promedios de los Rf encontrados al separar muestras purificadas de aflatoxinas usando cuatro sistemas de solvente.

Sistema de solventes	Tipo de Aflatoxina			
	B ₁	B ₂	G ₁	G ₂
Cloroformo:Metanol 97:3	0.74	0.71	0.64	0.60
Cloroformo: Acetona 9:1	0.56	0.50	0.45	0.39
Cloroformo: Acetona:2-Propanol 825:150:25	0.72	0.69	0.65	0.61
Benceno:Etanol:Agua 46:35:19	0.32	0.30	0.28	0.32

Resultados y discusión

Comparación de los sistemas de solventes utilizados para la detección de aflatoxinas: El cuadro 1 muestra los valores de Rf encontrados al separar muestras purificadas de aflatoxinas provenientes de alimentos y patrones usando cuatro sistemas de solventes diferentes.

Los resultados registrados en este cuadro son el promedio de diez repeticiones demostrándose de esta manera que el sistema de solventes cloroformo-acetona (9:1) fue el más apropiado para la detección de aflatoxinas ya que produjo Rf constantes y muy aproximados a los valores indicados por el Ins-

Cuadro 2. Porcentajes de recuperación de aflatoxina agregada en las muestras de alimentos.

Tipo de Aflatoxina	Porcentaje de Recuperación (%)	Muestras de Alimentos
B1, B2, G1, G2	70	Soya
B1, B2, G1, G2	65	Maní
B1, B2, G1, G2	85	Algodón
B1, B2, G1, G2	35	Sorgo

tituto de Productos Tropicales (5), además la separación es buena dando como resultado manchas circulares bien definidas e independientes.

Recuperación de Aflatoxinas: En el cuadro 2 se observan los porcentajes de recuperación de aflatoxinas. De los resultados hallados se puede inferir que el método de extracción usado permite recuperar por lo menos un 75% de la aflatoxina agregada, valor este bastante aceptable si se considera que otros métodos reportados por la literatura (5) señalan que a partir de un 65% es bueno y puede utilizarse con bastante confiabilidad.

Producción de Aflatoxinas: Las cantidades de aflatoxinas producidas en los procesos de fermentación de acuerdo a la técnica de Shotwel (16) se presentan en el cuadro 3. Las estimaciones se realizan de acuerdo a las recomendaciones sugeridas por Pons (9). Los resultados demuestran que las aflatoxinas G1, B1 Y G2 se encuentran en cantidades similares y tienden a ser mayores a las cantidades encontradas de aflatoxinas B2.

Estos resultados concuerdan con los reportados por otros investigadores (3, 16, 8) y permiten concluir que la técnica utilizada es efec-

tiva para la producción de aflatoxinas, encontrándose que la concentración relativa de la aflatoxina B1 y G1 fue apreciablemente superior a los otros tipos.

Detección de aflatoxinas en algunos alimentos: La extracción y detección de aflatoxinas se realizó en muestras de materias primas en las cuales había indicios o se observó crecimiento de hongos. Es decir, que no fueron muestras al azar sino que deliberadamente se tomaron muestras sospechosas.

En el cuadro 4 se puede apreciar que sólo dos de las muestras analizadas no presentan aflatoxinas de ningún tipo. El 50% de las muestras poseen aflatoxina B1, 70% aflatoxina B2, 60% G1, mientras que la G2 sólo fue detectada en el 20% de muestras analizadas. Estos resultados demuestran que la aflatoxina de mayor incidencia en este caso es la B2, mientras que la de menor incidencia fue la G2.

En las muestras de maní y en el alimento concentrado se detectaron todos los tipos de aflatoxinas. En las muestras de ajonjolí y algodón se detectaron todos los tipos de aflatoxinas, con la excepción de la G2. En el maíz solo se detectó la aflatoxina B1 y B2. En la soya sólo se detectó aflatoxina B2

Cuadro 3. Estimación de las cantidades de aflatoxinas producidas en los procesos de fermentación.

Tipos de Aflatoxina	Cantidad ppb
B1	19
B2	12
G1	19
G2	17

Cuadro 4. Concentraciones de aflatoxinas en ppb encontradas en los alimentos estudiados.

Muestra	Tipo de Aflatoxina			
	B ₁	B ₂	G ₁	G ₂
Maní	50	7	12	3
Ajonjolí	6	3	6	nd
Algodón	58	12	11	nd
Sorgo	nd	nd	14	nd
Maíz	75	4	nd	nd
Arroz	nd	2	nd	nd
Soya	nd	2	6	nd
Concentrado	18	3	6	2
Yuca	nd	nd	nd	nd
Trigo	nd	nd	nd	nd

nd= no detectable

y G2, en el arroz sólo se detectó la aflatoxina B2, mientras que en la yuca y el trigo no se detectó presencia de ningún tipo de aflatoxina. En sorgo sólo se encontró la aflatoxina G1, otros trabajos en sorgo muestran que la presencia de esta aflatoxina normalmente está acompañada de alguna otra, como la B1, (16).

Tres de las muestras analizadas (maní, algodón y maíz) presentan concentraciones de aflatoxina B1 iguales o superiores

a los 20 ppb, lo que es indicativo de una proliferación masiva de hongos productores de estas toxinas. Estos resultados concuerdan con los reportados por otros investigadores (8) y sugieren que en nuestro medio existe el hongo productor de la aflatoxina. Conociendo los requerimientos ambientales de humedad y temperatura para el crecimiento del hongo se podría inferir que nuestra región es una zona potencialmente importante en la producción de aflatoxinas.

Conclusiones

De este estudio se concluye que es abundante la presencia de aflatoxinas en algunos alimentos que se utilizan para la formulación de alimentos para animales, como por ejemplo: sorgo, maíz, algodón y maní. Esto podría ser más grave aún si se considera que se ha comprobado la presencia de un tipo de aflatoxina en la leche de los animales alimentados

con este tipo de alimentos; esto representa un doble peligro tomando en cuenta que la ingesta de productos lácteos a edades tempranas es alta, y que la susceptibilidad de los riñones a las aflatoxinas es también alta

En Maracaibo existen todas las condiciones favorables para que se dé un buen crecimiento del hongo en los distintos alimentos por diversas

razones, entre las cuales está su transporte por vía marítima, la conservación y almacenamiento en si-

los en las riberas del Lago, todo lo cual los hace muy susceptibles a la presencia de aflatoxinas.

Literatura citada

1. Armbrecht, B. and H. Wiseman. 1971. Swine aflatoxicosis. I. Assessment of growth efficiency and other responses in growing pigs feed aflatoxin. *Environ. Physiol.* 1: 198-208.
2. Bullerman, L. B., P. Hartman and J.C. Ayres. 1969. Extraction and analysis of aflatoxins from cured and aged meats. *J.A.O.A.C.* 52: 638-641.
3. Davis, N.D., U.L. Diener y D. W. Eldrige. 1966. Production of aflatoxins B1 and G1 by *Aspergillus flavus* in semisynthetic medium. *Appl. Microbiol.* 14: 378-380.
4. Diener, U.L. and N.D. Davis. 1970. Limiting temperature and relative humidity for aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in stored peanuts. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 47: 347-351.
5. Holcomb, M., D.M. Wilson., M.W. Trucksess and H.C. Thompson. 1992. Determination of aflatoxins in food products by chromatography. *J. of Chromatography.* 624: 341-352.
6. Keyl, A.C. and A.N. Booth. 1971. Aflatoxin effects in livestock. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 48: 599-604.
7. Mislyvec, P.B., J.H. Hunter and J. Tuite. 1966. Assay for aflatoxin production by the genera *Aspergillus* and *Penicillium*. *Appl. Microbiol.* 16: 1053-1055.
8. Pons, W.A. Jr., A.F. Cucullu., L.S. Lee., J.A. Robertson., A.O. Franz and L.A. Goldblatt. 1966. Determination of aflatoxins in agricultural products; Use of aqueous acetone for extraction. *J.A.O.A.C.* 49: 564-562.
9. Pons, W. A. Jr., A. F. Cucullu., A.O. Franz., L.S. Lee and L.A. Goldblatt. 1973. Rapid detect on of aflatoxin contamination in agricultural products. *J.A.O.A.C.* 56: 803-1025.
10. Purchase, I.F. 1972. Aflatoxin residues in feed of animal origin. *Fd. Cosmetic. Toxicol.* 10: 531-544.
11. Ratt, E.R. and T. Shantha. 1994. Incidence of aflatoxin in groundnut-based snack products. *J. Food Sci. Technol.* Vol. 31: 4 327-329.
12. SAS. 1985. SAS User's Guide: Statistics (5th Ed.). SAS Institute Inc., Carry, N C.
13. Sharma, R.S., K.R. Trivedi., U.R. Wadodkar., T.N. Murthi and J.S. Punjrath. 1994. Aflatoxin B1 content in deoiled/oil cakes, cattle feeds and damaged grains during different seasons in India. *J. Food Sci. Technol.* 31(3): 244-246.
14. Shotwell, O.L., C.W. Hesseltins., F.D. Stubblefield and W.G. Sorenson. 1966. Production of aflatoxin in rice. *Appl. Microbiol.* 14: 425-428.
15. Stubblefield, R.D., O.L. Shotwell., C.W. Hesseltins., M.L. Smith and H.H. Hall. 1967. Production of aflatoxin on wheat and oats: Measurement with a recording densitometer. *Appl. Microbiol.* 1: 186-190.
16. Vedanayagan, H.S., A.S. Indulkar and S.R. Rao. 1971. Aflatoxins and *Aspergillus flavus* in India cottonseed. *Indian J. Exp. Biol.* 9: 410-411.
17. Wilson, B.J., T. Colin., A. Wallace and R.T. Hanlin. 1968. Investigation of reported aflatoxin production by fungi outside the *Aspergillus flavus* group. *Appl. Microbiol.* 16: 819-821.