



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



INSTITUTO DE INGENIERÍA DE
ALIMENTOS PARA EL DESARROLLO

**UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE
VALÈNCIA**

***IMPORTANCIA DE LA DETECCIÓN
DE AFLATOXINAS EN FRUTOS
SECOS EN LA SEGURIDAD
ALIMENTARIA***

**TRABAJO FIN DE MÁSTER UNIVERSITARIO EN GESTIÓN DE LA
SEGURIDAD Y CALIDAD ALIMENTARIA**

ALUMNA: Jacqueline Alejandra Barragán Quishpe

TUTORA ACADÉMICO: Rosa María Montes Estellés

Curso Académico:2019/2020

VALENCIA, SEPTIEMBRE DEL 2020

IMPORTANCIA DE LA DETECCIÓN DE AFLATOXINAS EN FRUTOS SECOS, EN LA SEGURIDAD ALIMENTARIA.

J.A. Barragán-Quishpe ¹, R.M. Montes-Estellés¹

RESUMEN

En el presente trabajo se realiza una revisión bibliográfica sobre la importancia de la detección de aflatoxinas en frutos secos en la seguridad alimentaria, comprende una breve descripción de su procedencia y sus vías de desarrollo debido a que son sustancias tóxicas de origen fúngico, son de bajo peso molecular y contaminan los alimentos, por lo cual, representa un riesgo para la salud. En la actualidad el consumo de frutos secos va creciendo debido a las propiedades nutritivas que poseen, son fuente de energía, minerales y proteínas y por ello, son considerados un complemento perfecto en la dieta diaria. Las aflatoxinas se encuentran presentes en una gran variedad de alimentos como es en el caso de las nueces y almendras, son producidas por *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*, pueden presentarse en la cosecha o durante el almacenamiento, en condiciones de alta humedad o temperaturas templadas. En esta investigación bibliográfica se resumen varios estudios que proporcionaron información sobre los métodos más utilizados para el análisis de aflatoxinas como son las técnicas de confirmación, extracción y purificación, exploración o screening, las cuales nos permite determinar la presencia de aflatoxinas.

Palabras clave: micotoxinas, aflatoxinas, frutos secos, métodos de confirmación, purificación y extracción, screening.

RESUM

En el present treball es realitza una revisió bibliogràfica sobre la importància de la detecció d'aflatoxines en fruits secs en la seguretat alimentària, comprèn una breu descripció de la seva procedència i les seves vies de desenvolupament pel fet que són substàncies tòxiques d'origen fúngic, són de baix pes molecular i contaminen els aliments, per la qual cosa, representa un risc per a la salut. En l'actualitat el consum de fruits secs va creixent a causa de les propietats nutritives que posseeixen, són font d'energia, minerals i proteïnes i per això, són considerats un complement perfecte en la dieta diària. Les aflatoxines es troben presents en una gran varietat d'aliments com és en el cas de les nous i ametlles, són produïdes per *Aspergillus flavus* i *Aspergillus parasiticus*, poden presentar-se en la collita o durant l'emmagatzematge, en condicions d'alta humitat o temperatures temperades. En aquesta recerca bibliogràfica es resumeixen diversos estudis que van proporcionar informació sobre els mètodes més utilitzats per a l'anàlisi d'aflatoxines com són les tècniques de confirmació, extracció i purificació, exploració o screening, les quals ens permet determinar la presència d'aflatoxines.

Paraules clau: micotoxinas, aflatoxinas, fruits secs, mètodes de confirmació, purificació i extracció, screening



ABSTRACT

In the present work a bibliographic review is carried out on the importance of the detection of aflatoxins in nuts in food safety, it includes a brief description of their origin and their development pathways due to the fact that they are toxic substances of fungal origin, they are of low molecular weight and contaminate food, therefore, it represents a health risk. At present, the consumption of nuts is growing due to the nutritional properties they have, they are a source of energy, minerals and proteins and therefore, they are considered a perfect complement to the daily diet. Aflatoxins are present in a great variety of foods such as walnuts and almonds, they are produced by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*, they can occur at harvest or during storage, in conditions of high humidity or warm temperatures. This bibliographic research summarizes several studies that provided information on the most used methods for the analysis of aflatoxins such as confirmation, extraction and purification techniques, exploration or screening, which allow us to determine the presence of aflatoxins.

Keywords: mycotoxins, aflatoxins, nuts, confirmation methods, purification and extraction, screening.

1. INTRODUCCIÓN

Hoy en día las micotoxinas son consideradas un contaminante natural que es producido por medio de hongos filamentosos, estos pueden pertenecer a los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*, los cuales crecen en productos agrícolas durante la cosecha y almacenamiento, las micotoxinas resisten los procesos de secado, molienda y procesado (AESAN, 2020).

Las micotoxinas forman parte de un grupo de sustancias químicamente activas, tóxicas que pueden ocasionar enfermedades e incluso la muerte (Gimeno y Martins, 2011).

Cada especie fúngica produce una micotoxina diferente según el tipo de alimento, en el caso de *Aspergillus* spp produce aflatoxinas que se pueden encontrar en cereales y subproductos (frutos secos, especias, semillas, legumbres, pasas, etc) (Martínez, 2018).

El descubrimiento de las aflatoxinas sucedió en los años 60 a raíz de una crisis veterinaria que ocurrió cerca de Londres en la que murieron alrededor de 100.000 pavipollos por lo que los científicos concluyeron que la causa principal era el alimento (harina de maní importada del Brasil). Los científicos lograron aislar una sustancia producto del crecimiento de un hongo, que al ser suministrada a animales sanos producía una sintomatología muy compatible con la desconocida enfermedad, quedando demostrado que dicha sustancia había sido producida por una cepa de *Aspergillus flavus* de la cual derivó su nombre de Aflatoxinas (Borja y Calvo, 2017).

Las aflatoxinas son sustancias químicas producidas por cepas toxigénicas de hongos principalmente *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*. Estas sustancias pueden causar enfermedad y muerte, tanto en animales como en seres humanos (Bogantes, 2008).

A su vez, las aflatoxinas son productos metabólicos secundarios, debido a que no tienen una función directa en el metabolismo vital del moho sino parecen ser un factor de defensa para un medio hostil.

Las aflatoxinas principales son B1, B2, G1 y G2, debido a que se encuentran en alimentos, la mayor parte de la exposición humana procede de frutos secos y cereales contaminados (OMS, 2018).

Para que se puedan desarrollar depende de factores físicos como la humedad, agua, temperatura, característica física del grano y factores químicos como composición del sustrato, pH, nutrientes, minerales y disponibilidad de oxígeno (Hernández y García, 2012).

La ausencia de *Aspergillus* spp. en el alimento no necesariamente implica que el alimento no tenga aflatoxinas, debido a que la toxina puede persistir aún después de que el moho haya desaparecido.

Un estudio realizado en la ciudad de Guayaquil determinó que el 54% de frutos secos y cereales estaban contaminados por aflatoxinas, de los cuales algunos pacientes mostraron un cuadro de desnutrición grado III (Lazo y Sierra, 2008).

Presencia en alimentos

El problema toxicológico se debe a la contaminación de alimentos por aflatoxinas, éstas se pueden encontrar en nueces, pistachos, cacahuets, almendras, harinas de trigo y maíz, especias, frutas secas, granos contaminados, aunque se encuentren en muy bajas concentraciones representa una potente actividad biológica.

Las aflatoxinas se encuentran en semillas de baja calidad, esto se da cuando existe una falta de control de plagas y las condiciones de almacenamiento no son óptimas, ya que aumenta el riesgo de contaminación por hongos.

Por lo tanto, los investigadores se han interesado en los estudios epidemiológicos como los realizados en África y Asia que han mostrado una alta incidencia de hepatomas y han revelado asociación entre la incidencia de cáncer y el contenido de aflatoxinas en la dieta (Fente, et al., 2016).

FRUTOS SECOS

Según Vázquez y Alcaraz (2005), define como frutos secos a todo aquel alimento que por su condición de cáscara ha sido sometido a un proceso de desecación, y es conservado durante todo el año para después ser consumido, cabe mencionar que el consumo se debe realizar en pequeñas cantidades.

Tomando en cuenta el Código Alimentario Español, los frutos secos poseen una composición menor del 50% de agua. La característica principal de los frutos secos es su gran contenido calórico (de 5,3 a 6,6 kcal/g, excepto en las castañas) debido a su elevado contenido lipídico y su bajo estado de hidratación (Gimeno E. , 2002).

A los frutos secos se los puede considerar como suplementos alimenticios ya que su consumo representa grandes beneficios para la salud, este tipo de alimentos son fuente importante de fibra, proteínas, vitamina E, ácido fólico y minerales, son utilizados en una dieta equilibrada (Krauss y Eckel, 2000).

Nuez de Nogal

La nuez de Nogal presenta una gran demanda a nivel mundial, esto se debe a sus características nutricionales que aporta, debido a que es rica en ácidos grasos esenciales que son favorables para el organismo (Amaral y Casal, 2003).

Estos alimentos aportan algo más que energía, debido a que proveen un alto contenido graso (45 a 65%), no contienen colesterol. Las grasas son monoinsaturadas y poliinsaturadas, también dispone de un alto contenido proteico (15 a 30%), por ello es un gran sustituto de proteínas animales (carnes), en determinadas circunstancias (Vázquez y Alcaraz, 2005).

Las grasas de la nuez constituyen alrededor del 61,9%, 13,5% de carbohidratos y 14,3% de proteínas, es una buena fuente de vitaminas como la B1, B2, B3 y B6, es uno de los alimentos más ricos y completos, el contenido de carbohidratos es de un 12%, de igual manera, el contenido de fibra varía entre 5,9 mg/g a 159 mg/g dependiendo de la variedad.

Almendras

Las almendras es uno de los frutos secos más completo porque posee un alto contenido de proteínas, en cuanto a aminoácidos esenciales, su contenido proteico es de 13.3 %, son relativamente ricas en vitaminas B1, B6, y especialmente en vitamina E (Pamplona, 2007).

Las almendras aportan grasas monoinsaturadas las cuales ayudan a bajar los niveles de colesterol LDL debido a que reemplazan las grasas saturadas.

Seguridad alimentaria

La seguridad alimentaria juega un papel importante para las empresas, asegura la calidad de un producto para que se encuentre en condiciones óptimas para el consumidor. En el caso de los frutos secos son productos que, al encontrarse en condiciones adecuadas, presentan una larga conservación, por lo que es necesario que en todas las fases del proceso los ambientes sean los adecuados, cumpliendo con los valores bajos de humedad para conseguir su conservación y a su vez la eliminación de contaminantes fúngicos y bacteriológicos (Gimeno E., 2002).

LEGISLACIÓN

Hoy en día el comercio de alimentos ha contribuido aún más a las pérdidas provenientes por aflatoxinas debido a que existe una gran demanda de alimentos exportados, por tal motivo se han incrementado estrictos estándares de calidad (Wu, 2004).

El Codex Alimentarius establece los límites permitidos y las normativas sobre las aflatoxinas, de esta forma se evita la existencia de algún contaminante que pueda afectar a los consumidores (García S., 2016).

Al evidenciar los riesgos que ocasiona los alimentos contaminados por aflatoxinas en el ser humano, se crearon diferentes reglamentos, en el caso de Ecuador, el Instituto Nacional de Normalización INEN puso en vigencia una normativa acerca del Código de prácticas para prevenir y reducir la contaminación de alimentos por aflatoxinas, debido a que es esencial resguardar la salud del consumidor (Vásquez y Morán, 2016).

Por otro lado, la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) publicó un documento que engloba los reglamentos para las aflatoxinas en alimentos y las raciones estimadas, y establece los límites de aflatoxinas a nivel mundial ya que representa un tema de gran importancia que va relacionado a la inocuidad alimentaria (FAO, 2004).

En España existen disposiciones nacionales para establecer los niveles máximos de aflatoxinas, la normativa europea establece métodos de muestreo y de análisis para el control en productos alimenticios (García J. , 2008).

Se han propuesto cuatro directivas, una de ellas el Reglamento (UE) 165/2010 la cual fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios.

La contaminación producida por micotoxinas depende de su estructura y capacidad de reacción con otras moléculas, las producidas por *Aspergillus* son: Aflatoxina B1, B2, G1, G2 y stigmatocistina (Castillo, et al., 2016).

La producción de las micotoxinas se da por factores extrínsecos: temperatura y humedad relativa, factores intrínsecos: humedad, nutrientes, pH y acidez, y por el género del hongo toxigénico. Dentro de los principales grupos de micotoxinas se encuentran las aflatoxinas, las ocratoxinas, la zearalenona, las fumonisinas, el deoxinivalenol, los tricotecenos, etc (Ruiz, 2016).

Aflatoxinas

ESTRUCTURA QUÍMICA

Químicamente son metabolitos heterocíclicos y se encuentran relacionados entre sí, el anillo lactónico y el doble enlace del anillo difurano son los responsables de su toxicidad, debido a que son compuestos altamente ionizables y muy reactivos, su peso molecular varía entre 312 y 350, la mayor parte es poco soluble en agua, por lo cual puede ser extraído con disolventes orgánicos moderadamente polares, tales como el cloroformo o metanol. Las aflatoxinas purificadas en forma cristalina son bastante termorresistentes, estables en un rango de pH entre 3 y 10 y sus puntos de fusión son superiores a los 250 °C. Experimentalmente, tiene un elevado potencial mutagénico y cancerígeno, por lo que se le considera la aflatoxina de mayor riesgo para la salud humana (Soriano, 2007).

La carcinogenicidad y la mutagenicidad de las aflatoxinas B1, G1 y M1 es producida por la formación de un epóxido reactivo en la posición 8, 9 del anillo furano la misma que se une covalentemente al ácido nucleico.

En el caso de las aflatoxinas G1 y M1 presentan un efecto toxicológico similar a la aflatoxina B1, su efecto es carcinogénico en el hígado el cual es menor que la B1, sin embargo, su carcinogenicidad en riñones es ligeramente mayor (Norman y Kaplan, 2015).

MECANISMO DE ACCIÓN

La aflatoxina B1 (AFB1) es la más importante de toda la serie, debido a que aparece con mayor frecuencia por lo que se absorbe en el intestino delgado y se transporta por medio de los glóbulos rojos y las proteínas plasmáticas hasta el hígado, esta toxina entra en la célula y su metabolismo en el retículo endoplasmático lo que da lugar a la formación de la AFB1-8,9-epóxido (Riley y Pestka, 2005).

Las aflatoxinas son inmunosupresoras que inhiben la fagocitosis y la síntesis proteica interrumpiendo la formación del ADN, ARN y proteínas en el ribosoma (Castillo et al., 2016).

TOXICIDAD

La Unión Europea ha determinado que la aflatoxina (AFB1) es un agente cancerígeno debido a que existe el riesgo de padecer cáncer hepático, incluso en dosis bajas (Lerda, 2011).

Las aflatoxinas pueden producir toxicidad aguda debido a que se produce al ingerir grandes cantidades, una vez en el hígado, dan lugar a una infiltración de lípidos que originará necrosis hepática o nefritis, por otro lado los efectos crónicos son los más frecuente debido al consumo de alimentos contaminados con niveles

bajos de aflatoxinas, ya sea durante semanas o meses, las mismas que pueden producir daño celular, carcinogenicidad, teratogenicidad y mutagenicidad en animales (Bogantes, 2008).

Actualmente, se estima que la ingesta humana de aflatoxinas oscila entre 0 y 30000 ng Kg-1 por día con un valor medio de 10 a 200 ng Kg-1 por día (Norman y Kaplan, 2015)

ANÁLISIS DE AFLATOXINAS

Es importante realizar un análisis continuo de productos alimenticios para proteger la salud del consumidor, debido a la posibilidad de consumir alimentos contaminados con aflatoxinas, por lo cual los métodos de análisis han evolucionado constantemente en busca de una mayor efectividad, se pueden determinar por medio de Cromatografía Líquida de Alta Resolución o High Performance Liquid Chromatography (HPLC) con detección de fluorescencia (FL), este tipo de detección ofrece mayor sensibilidad y selectividad (Afshar, Shokrzadeh, y Kalhori, 2013).

Dentro de los métodos de screening se encuentran las técnicas inmunoquímicas como es el kit ELISA que se emplea para la monitorización rápida, es de fácil realización, presenta una gran sensibilidad y se puede procesar un número elevado de muestras (Vidal, Ezquerro, y Bertolín, 2013).

2. OBJETIVO

El objetivo principal de esta investigación es realizar una búsqueda de bibliografía para determinar la importancia de la detección de aflatoxinas en frutos secos en la seguridad alimentaria.

Para ellos, se llevará a cabo la adquisición de información relacionada con la determinación de aflatoxinas en frutos secos y los métodos establecidos para su identificación.

3. METODOLOGÍA

Para la consecución del objetivo propuesto, el plan de trabajo consta de búsquedas sistemáticas de bibliografía una vez identificado el campo de estudio y la selección del material a revisar.

1. Revisión bibliográfica con la búsqueda de los siguientes temas: micotoxinas, aflatoxinas, legislación de las aflatoxinas, toxicidad, mecanismos de acción, estructura química, frutos secos, presencia en alimentos, técnicas para la determinación de aflatoxinas.
2. Revistas: se usarán revistas científicas, las mismas que se encontraban en la base de datos de la UPV (Science Direct, Scielo, Scopus, Pubmed) por lo que se investigarán estudios basados en la identificación de aflatoxinas en alimentos contaminados
3. Tesis doctorales: la presente investigación recopilará información importante en tesis doctorales para determinar los métodos de análisis más usados para la detección de aflatoxinas en diferentes alimentos.
4. Libros: en los libros se investigará la estructura química y la toxicidad de las aflatoxinas.

4. RESULTADOS

En los primeros años que surgió el descubrimiento de las aflatoxinas se tuvo interés en los métodos rápidos para identificar las aflatoxinas en cereales y frutos secos. Fue así como se publicó el uso de la lámpara ultravioleta para detectar la fluorescencia.

A medida que pasa el tiempo surge la utilización de los anticuerpos monoclonales para la detección rápida de aflatoxinas, en lotes sospechosos que posteriormente fueron sometidos a un análisis cuantitativo. La cromatografía en capa fina (TLC) es considerada una herramienta esencial para el análisis semi-cuantitativo o cualitativo. La Association of Analytical Chemist consideró como métodos oficiales a la cromatografía de capa fina (TLC), Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), Espectrometría de masas (MS) y Electroforesis Capilar. Y a su vez, también se pueden utilizar métodos basados en ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Es importante conocer el sustrato en que se va a aplicar debido a que se distinguen por el grado de sensibilidad en la detección de altas o bajas concentraciones presentes en las muestras problema (Osorno, 2015).

Con el pasar de los años estas técnicas se han logrado acoplar al avance de la ciencia, tales como espectroscopía de infrarrojo (NIRS), imágenes hiperespectrales, narices electrónicas, polímeros de impresión molecular y biosensores debido a su estabilidad y facilidad de producción y uso. (Gómez, Martínez, y Vargas, 2013). A continuación, las técnicas analíticas más usadas para la detección de aflatoxinas:

Técnicas de análisis

En los últimos 30 años para el estudio de aflatoxinas en alimentos contaminados se han usado los siguientes métodos: Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) con un 70% de uso, cromatografía de capa fina con un 23% y electroforesis capilar con un 2% (Cornell University, 2013).

CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

La cromatografía se basa en la separación, identificación y cuantificación de los componentes de una mezcla, por lo que está constituido de dos fases no miscibles, una de ellas es la fase estacionaria, la misma que se encuentra inmovilizada en una columna, la segunda fase se denomina fase móvil, ésta se desplaza en el seno de la primera. La velocidad de los analitos presentes en la fase móvil dependerá de la solubilidad y de la fuerza de interacción de los componentes con la fase estacionaria (Braithwaite, 2007).

La técnica de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) es el método más utilizado para la cuantificación de aflatoxinas, que a su vez es considerado como procedimiento para la detección rápida. (Cheraghali, Yazdanpana, y Dorak, 2007).

En un estudio más reciente, Herrero (2012), analizó y validó un método para la identificación de aflatoxinas (B1, B2, G1 y G2) en distintos frutos secos, con el que analizó 18 muestras, la extracción se realizó con una disolución de metanol al 70% y cloruro sódico y se analizó mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) con detector de fluorescencia, todas las muestras manifestaron valores

bajos de contaminación, como en el caso de la almendra, la cual presentó las concentraciones más bajas de aflatoxinas (0,26 µg/Kg), los frutos secos que presentaron mayores niveles de contaminación fueron las muestras de avellana (1,75 µg/Kg), cacahuete (0,47 µg/Kg) y pistacho (0,34 µg/Kg), pero aun así eran inferiores a los límites máximos establecidos por la legislación, los parámetros que fueron validados son tanto para el análisis cromatográfico, como de la extracción y purificación de las muestras.

Un análisis realizado por García (2008), determinó que la técnica de cromatografía líquida es adecuada para el control de aflatoxinas, debido a que proporciona límites de cuantificación inferiores a los niveles máximos (LMs) establecidos en la legislación europea, su estudio se basó en el análisis de aflatoxina y ocratoxina A en alimentos por medio de cromatografía líquida (CL), por lo cual tomó tres muestras de frutos secos que a su vez fueron fortificadas en cuatro niveles de concentración (0.5, 2.5, 5 y 25 µg / kg de fruta seca) con AFB1, AFG1, AFB2 y AFG2, las muestras fortificadas obtuvieron como resultados cromatogramas limpios.

TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN

Estas técnicas son de gran importancia debido a que la preparación de la muestra es el principal factor en un análisis, el mismo que es usado para extraer aflatoxinas de la matriz biológica por medio de disolventes orgánicos, las más importantes son;

- Extracción en fase sólida
- Extracción con columnas de intercambio iónico.
- Extracción con columnas de inmovilización de anticuerpos
- Extracción asistida por microondas.
- Extracción acelerada por disolventes (Cornell University, 2013).

Técnicas de exploración

Las técnicas de exploración o screening tienen como finalidad seleccionar de una manera rápida las muestras que son negativas y a su vez minimizar el número de análisis.

Esta técnica se aplica cuando existe un elevado número de muestras, no obstante, se debe usar alguna técnica de confirmación para validar los resultados positivos, en general los métodos de screening son poco selectivos y relativamente sensibles, las más usadas para el análisis de micotoxinas son los biosensores e inmunoensayos (Soriano, 2007).

- BIOCENSORES.

Los biosensores de resonancia de plasmones superficiales (SRP) son considerados una tecnología con gran potencial para la detección rápida de aflatoxinas, su mecanismo se basa en la determinación del cambio de índice de refracción cuando un analito se une a un anticuerpo (Treviño, 2009).

- INMUNOENSAYOS

Los inmunoensayos como el ELISA, es una técnica utilizada para la determinación de aflatoxinas, se basa en un anticuerpo inmovilizado, si la muestra contiene aflatoxina (antígeno) se unirá al anticuerpo específico, esta unión se detecta por medio de un anticuerpo antianticuerpo enlazado a una enzima, este es capaz de generar un producto detectable, como es el cambio de color, por la adición de un sustrato. La aparición de colores se mide mediante espectrofotometría que indica el antígeno en la muestra.

Un estudio realizado por Martínez (2018), determinó que el método de screening ELISA competitivo es una técnica usada para la detección de aflatoxinas ya que cumple con la normativa vigente en la Unión Europea, su estudio se basó en evaluar la presencia de las micotoxinas zearalenona y aflatoxina en arroz sin cáscara en las zonas productoras de Ecuador, su ensayo consistió en tomar 41 muestras, el coeficiente de correlación para aflatoxinas fue de 0.99 con un límite de detección de 0.80 µg/kg y una recuperación de aproximada de 115 %.

De igual forma, un estudio realizado por Vásquez y Morán (2016), determina que el método de ELISA es importante para la detección de la aflatoxina (µg/kg), en maíz (*Zea mays*, L), el cual obtuvo valores superiores a 20 µg/kg de la micotoxina, este valor es el máximo permitido por la Agencia de Drogas y Alimentos (FDA) y el Instituto Ecuatoriano de Normalización (INEN 187:95).

En una investigación más reciente, realizada por Martínez (2017), evaluó cuatro métodos de técnicas rápidas para la determinación de aflatoxinas en cereales por lo que utilizó el método Fluorométrico (Lámpara Negra), Reveal, RidaQuick y Veratox/ELISA. 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; las mismas que fueron verificadas por HPLC, el cual tuvo como resultado un total de 3 muestras positivas (2,08%). La investigadora concluyó que el mejor análisis para determinar aflatoxinas es la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), debido a que cumple con criterios de especificidad, linealidad, sensibilidad, exactitud y precisión, por lo que ha descartado el uso de la técnica de ELISA ya que es un método de cribado y aunque es rápido y sensible puede dar bastantes falsos positivos (Huang, Ren, y Han, 2010).

Protocolos recomendados para realizar un análisis en frutos secos

Las aflatoxinas no se encuentran distribuidas uniformemente en todo el alimento, ya sea en productos a granel como en cereales almacenados por lo cual es necesario realizar un muestreo adecuado (OMS, 2018).

En la Unión Europea se estableció los parámetros específicos que debe cumplir un método analítico, por medio del Reglamento C.E. No 401/2006, el método de análisis depende del grado de contaminación que va de un rango de 70-110 %.

Todas las técnicas utilizadas para el análisis de aflatoxinas deben ser validadas por medio de AOAC International, CEN o ISO (Organización Internacional Estandarización) para que sus resultados sean confiables, por lo que es muy importante realizar de forma correcta la preparación de la muestra (García J., 2008).

Según el Reglamento C.E. No 401/2006 para obtener un muestreo adecuado es importante tomar en cuenta los siguientes factores:

- Las muestras deben ser tomadas por un personal cualificado
- La manipulación de estos compuestos debe ser ejecutada siempre con guantes para evitar entrar en contacto con las toxinas existentes en el alimento.
- Las soluciones de aflatoxinas deben estar protegidas de la luz directa, para evitar que se degraden.
- Los utensilios deben estar completamente limpios y en buen estado, para evitar que exista una contaminación cruzada.
- Las muestras deben ser recogidos de forma aleatoria
- El lugar de almacenamiento debe encontrarse completamente equipado, el periodo de almacenamiento debe ser corto.
- Las muestras se deben etiquetar correctamente para que no exista confusión, su información debe ser clara y concisa, por lo que se debe proporcionar el nombre de la persona que realizó el muestreo, lugar, número de lote, condiciones de muestreo, herramientas utilizadas, fecha, hora, y observaciones.
- Durante la preparación de las muestras se debe tomar las precauciones necesarias para prevenir resultados erróneos.
- Este protocolo también es aplicable para productos alimenticios que son comercializados de forma a granel, en contenedores o en envases individuales etc.

Límites de detección

Según el Reglamento 1881/2006 y sus posteriores modificaciones determinó el contenido máximo de los contaminantes en los productos alimenticios. (Tabla 1)

A nivel mundial es importante conocer las concentraciones y los niveles máximos permitidos de aflatoxinas en la materia, debido a que en el producto final varía la concentración de una micotoxina a otra, de igual forma esto sucede de un país a otro.

En el caso de Latinoamérica, el límite máximo permitido de aflatoxinas en humanos es de 20 -30 ppb (ug/kg), todo depende del tipo de alimento que vaya a ser analizado (Sanabria, Martínez, y López, 2017).

En el Reglamento (CE) No 165/2010 existe una actualización de los límites máximos establecidos de contaminantes en alimentos por lo que hubo un incremento con respecto a los límites establecidos en el Reglamento (CE) No 1881/2006, esto se debe a una propuesta realizada por el Códex Alimentarius y por el Panel Científico de Contaminantes de la EFSA (CONTAM), quien determinó que este cambio es mínimo y no tendría un gran impacto en el consumidor (EFSA, 2007).

Tabla 1. Límites establecidos para aflatoxinas según el Reglamentos (CE) 1881/2006 y continuas modificaciones, para productos de consumo directo.

Producto alimentario	Límite máximo B1 (ug/kg)	Límite máximo B1, B2,G1 Y G2 (ug/kg)
Almendra	8	10
Cacahuete	2	4
Pistacho	8	10
Avellana	5	10
Nueces del Brasil	5	10

Fuente: (CE, 2006).

Ventajas e inconvenientes de los métodos para determinar aflatoxinas

La mayoría de estas técnicas han sido adaptadas con técnicas de concentración del contaminante por lo que es importante conocer los parámetros establecidos por las normas vigentes para aplicar los diferentes métodos para la detección de aflatoxinas, para ello es esencial conocer las ventajas y desventajas que emplea estos análisis (Anklama y Stroka, 2014). A continuación, (Tabla2) se presentan los métodos más usados con sus respectivas ventajas y desventajas.

Tabla 2. Comparación de métodos para la determinación de micotoxinas.

Métodos	Ventajas	Desventajas
Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC)	<ul style="list-style-type: none"> ● Método de cuantificación ● Confiable ● Sensible ● Selectivo ● Puede ser automatizado ● Método oficial para la determinación de aflatoxinas 	<ul style="list-style-type: none"> ● Costos elevados ● Personal calificado ● Interpretador de datos ● Separación de muestras ● Derivatización
Cromatografía en Capa Fina (TLC)	<ul style="list-style-type: none"> ● Método de cuantificación ● Confiable ● Exactitud y precisión ● Comparable con HPLC. ● Método oficial de referencia para las aflatoxinas 	<ul style="list-style-type: none"> ● Separación de muestras ● Sustituido en gran medida ● por HPLC para análisis de aflatoxinas

<p>Ensayo por Inmunoadsorción Ligado a Enzimas (ELISA)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ● Específico, rápido y fácil de usar ● Equipo de bajo costo ● Límite de detección bajo ● Análisis simultáneo de muestras múltiples ● Análisis semicuantitativos (screening) o cuantitativos posibles. ● Poco limitado de disolventes orgánico. 	<ul style="list-style-type: none"> ● Posible reactividad cruzada con micotoxinas relacionadas. ● Interferencia de matriz ● Posibles falsos positivos/negativos. ● Rango de detección estrecho ● Realizar un análisis de cromatografía (LC) confirmatorio.
<p>Electroforesis Capilar (CEÚ)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ● Especial para separar micotoxinas relacionadas. ● Muy sensible. ● Realiza análisis multicomponentes cuando se combina con inmunoensayos. 	<ul style="list-style-type: none"> ● Dificultad para detectar bajas concentraciones de aflatoxinas
<p>Espectroscopia de Infrarrojo Cercano (NIRS)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ● Rápido. ● 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 ● Equipo costoso
<p>Biosensores de Resonancia de plasmadores superficiales</p>	<ul style="list-style-type: none"> ● Fácil de usar ● Detección directa ● Detección en tiempo real. ● Muy sensible. ● Se requiere muestras sin purificar. ● Rapidez. ● Selectividad ● Detección directa. 	<ul style="list-style-type: none"> ● Sensibles a temperatura. ● Elevado costo.
<p>Biosensores de onda evanescente</p>	<ul style="list-style-type: none"> ● Detección directa. ● Rapidez. ● Selectividad. 	<ul style="list-style-type: none"> ● Requiere marcaje
<p>Nariz Electrónica (EN)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ● Medios rápidos para controlar la calidad de los alimentos 	<ul style="list-style-type: none"> ● Necesidad de mejorar la selectividad y reducir las interferencias. ● Estudios de viabilidad limitados y mala validación

Imágenes Hiperespectrales	<ul style="list-style-type: none"> ● Rápido ● No destructivo ● Fácil de usar ● Especial para aplicaciones de detección en línea 	<ul style="list-style-type: none"> ● Separación de las muestras sólidas para preparación ● Extracto de limpieza necesario para mejorar la sensibilidad ● Reactividad cruzada con micotoxinas relacionadas.
---------------------------	---	---

Fuente: (Sanabria, Martínez, y López, 2017).

Concentraciones de aflatoxinas en frutos secos

Las concentraciones de aflatoxinas en frutos secos varían debido a que existe una gran diferencia entre los países desarrollados y los países que se encuentran en vías de desarrollo.

En los países desarrollados la exposición dietética es inferior a 1 ng/kg de peso corporal por día, mientras que para otros países como es el caso del África subsahariana las estimaciones superan los 100 ng/kg/día.

Las estimaciones de exposición dietética de AFM1 difícilmente ha superado 1 ng/kg por día en los países tanto desarrollados como en vías de desarrollo (OMS, 2018).

Un estudio realizado en la población de Marruecos determinó que la ingesta diaria estimada es de 15.22 ng/kg de peso corporal por día, por lo que este valor se excede al 1 ng/kg que se encuentra establecido por el Comité Científico para la Alimentación en la Unión Europea, esta dosis excedida puede causar un riesgo cáncer de hígado (García J. , 2008).

En la siguiente tabla se muestra un resumen de los alimentos que contienen una gran incidencia de aflatoxinas en Latinoamérica. (Tabla 3)

Tabla 3. Porcentaje de incidencia de aflatoxinas en alimentos.

Alimentos	Incidencia (%)	Aflatoxinas	Concentración (µg kg-1)	País
Harina de maíz	26%	B1	4,34-11,26	Ecuador
jengibre	10,5%	Totales	23-173,3	Ecuador
nueces	10,5%	Totales	23-173,3	Chile
sésamo				
maní salado y maní pelado.				

Fuente: (Vallejo, 2013).

Efecto de procesado en frutos secos

El procesado de alimentos comprende una serie de transformaciones entre distintos compuestos que a su vez puede influir en las propiedades de función de los alimentos, por lo que son sometidos a distintos métodos de transformación para garantizar la seguridad alimentaria, obteniendo un producto inocuo que no cambie sus características organolépticas y sea apto para el consumo humano (Rahaman y Vasiljevic, 2016).

En consecuencia, el procesado tecnológico ayuda a impedir que se origine un deterioro o a su vez mejorar las propiedades de los frutos secos, por ende, algunos de los tratamientos pueden afectar el valor nutricional y mejorar la biodisponibilidad de algunos nutrientes, así como la calidad del alimento procesado. Un alimento al ser sometido a un proceso tecnológico debe satisfacer las necesidades del consumidor en lo que se refiere a seguridad alimentaria, palatabilidad, vida útil, biodisponibilidad de los nutrientes y en algunas ocasiones, aportar un valor añadido mediante el enriquecimiento con otros ingredientes (Dapcich, 2004).

En el caso de los frutos secos al ser sometidos a un proceso tecnológico la proteína se vuelve sensible ante cada proceso por lo que va dependiendo de su estructura, de su tipo y de las condiciones del tratamiento tal como la matriz alimentaria que tiene ese alimento (Sathe y Sharma, 2009).

La mayor parte del consumo de frutos secos es en forma de procesados, pueden ser tostados o fritos. En el caso de que los frutos secos sean tostados no existe un cambio significativo en la composición nutricional, mientras que es lo contrario en los frutos secos fritos debido a que aumenta la cantidad de grasa que es producida por la absorción del aceite al instante de la fritura, la misma que se suma a la grasa natural que contienen los frutos secos (Roper, 2018).

Teniendo en cuenta lo antes mencionado, los frutos secos se deben consumir de preferencia crudos, debido a que al instante de ser sometidos a un proceso térmico se modifican las estructuras de los ácidos grasos y se destruyen las escasas vitaminas que contienen.

Recomendaciones para reducir el nivel de aflatoxinas

La mayor parte de frutos secos se pueden encontrar contaminados por aflatoxinas, por lo que su consumo puede resultar perjudicial para la salud.

Para reducir el riesgo se requiere un enfoque que ayude a controlar las aflatoxinas en todas las fases. Este enfoque incluye prácticas de mejoramiento de las plantas, potenciación de su resistencia y métodos de control biológicos, los mismos que deben ser combinados con medidas aplicadas posterior a la cosecha, como es en el secado y en el almacenamiento.

Los mohos no solo se encuentran presentes en la superficie, sino que también pueden penetrar profundamente en el alimento, por ello se recomienda los siguientes aspectos para minimizar su exposición de aflatoxinas:

- Las BPM (Buenas Prácticas de Manufactura) y BPAL (Buenas Prácticas de Almacenaje) son uno de los aspectos más importante para la reducción de los niveles de aflatoxinas debido a que se encuentran enfocadas en la higiene y manipulación durante los procesos de empaquetamiento,

almacenamiento, transporte e industrialización, donde influyen parámetros como la humedad, la actividad del agua, temperatura, ventilación, desinfección y desratización, evitando el daño mecánico y manteniendo el fruto seco, sano y limpio para una buena y apropiada conservación con el fin de evitar la proliferación de los hongos (Borja y Calvo, 2017).

- Es importante que los consumidores se cercioren al instante de la compra que los frutos secos se encuentren lo más frescos posible al instante de la compra.
- Es recomendable comprar frutos secos que se encuentren debidamente etiquetados.
- Es necesario conservar adecuadamente los alimentos y consumirlos lo antes posible para evitar cualquier riesgo en la salud del consumidor.
- Es preciso tomar en cuenta todos estos aspectos para minimizar el riesgo de exposición a las aflatoxinas, de igual forma es necesario que los frutos secos (nuez y almendra) sean tratados antes y después de la cosecha para reducir su nivel de contaminación de aflatoxinas (OMS, 2018).
- Para eliminar las aflatoxinas de los alimentos ya contaminados se pueden emplear otras medidas, como la descontaminación química o los enterosorbentes. (OMS, 2018).
- Los alimentos destinados al consumo humano deben ser analizados para comprobar que se encuentran por debajo de los límites máximos de contenido en aflatoxinas.

5. CONCLUSIONES

- El método más usado para la detección de aflatoxinas se basa en técnicas cromatográficas como es Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) combinados con un detector de fluorescencia debido a que cumple con criterios de especificidad, linealidad, sensibilidad, exactitud y precisión.
- La detección de aflatoxinas en frutos secos es un tema de suma importancia debido a que representa un peligro latente para el ser humano asociado a la salud del consumidor y que puede ocasionar daños letales.
- El método más eficiente para evitar la contaminación por aflatoxinas es la prevención, es primordial la prevención y el control, y por ello es necesario aplicar correctamente las técnicas de BPM (Buenas Prácticas de Manufactura) y BPA (Buenas Prácticas de Almacenamiento) de esta manera se reducirá los niveles de aflatoxinas.
- Es importante que se realice correctamente el muestreo debido a que eso nos permite obtener resultados fiables.
- Los alimentos destinados al consumo humano deben ser analizados para comprobar que se encuentran por debajo de los límites máximos establecidos de contenido en aflatoxinas.

REFERENCIAS

- AESAN. (2020). Seguridad Alimentaria Micotoxinas. *Agencia española de seguridad alimentaria y nutrición*.
- Afshar, P., Shokrzadeh, M., and Kalhori, S. (2013). Occurrence of Ochratoxin A and Aflatoxin M1 in human breast milk in Sari, Iran. *Food control*, 525-529.
- Amaral, J., y Casal, S. (2003). Determination of sterol and Fatty Acid Compositions, Oxidative Stability and Nutritional. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 7698-7702.
- Anklama, E., y Stroka, A. (2014). Acceptance of analytical methods for implementation of EU legislation with a focus on mycotoxin. *Food control*, 173-183 .
- Bogantes, P. (2008). Aflatoxinas. *Acta médica costarricense*, 4.
- Bolet, M., y Socarrás, M. (2005). Micotoxinas y cáncer. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 3.
- Borges, M. (2016). *La revolución de los 22 días*. Nueva York: House.
- Borja, B., y Calvo, M. (2017). Control de micotoxinas en alimentación y salud pública. *Tribunal Plural, la revista científica*.
- Braithwaite, A. (2007). *Técnicas Cromatográficas*. Londres: Chapman y Hall.
- Castillo, P., García, R., y Dúran, C. (2016). Aflatoxinas en maíz Amarillo usado para elaborar jarabes de fructosa. *Universidad nacional autónoma de México*.
- CE. (2006). *REGLAMENTO (CE) No 1881/2006 DE LA COMISIÓN de 19 de diciembre de 2006 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios*. Europa: Diario Oficial de la Unión Europea.
- Cheraghali, M., Yazdanpana, H., y Dorak, N. (2007). Incidencia de aflatoxinas en los pistachos de Irán. *Toxicología Alimentaria y Química*, 812-816.
- Cornell University, D. o. (2013). *Aflatoxins : Occurrence and Health Risks*. Obtenido de Cornell University, Department of Animal Science:
<http://poisonousplants.ansci.cornell.edu/toxicagents/aflatoxin/aflatoxin.html>
- Dapcich, V. (2004). Guía de la alimentación saludable . *Sociedad Española de nutrición comunitaria*.
- E.C.D. (2006). *The sampling methods and the method of análisis for the oficial control of the levels for mycotoxins in foodstuffs*. Europa: Off. J. Eur.
- EFSA. (2007). Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to the potential increase of consumer health risk by a possible Increase of the existing maximum levels for aflatoxins in almonds, hazelnuts and pis. *The EFSA Journal*, 1-127.
- Ellis, O., Smith, J., and Simpson, B. (2009). Aflatoxins in food: Occurrence, biosynthesis, effects on organisms, detection, and methods of control, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 403-439.
- FAO. (2004). *Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación*. Obtenido de Reglamentos a nivel mundial para las micotoxinas en los alimentos y en las raciones en el año 2003: <http://www.fao.org/3/a-y5499s.pdf>
- Fente, C., Franco, C., and Cepeda, A. (2016). Application of the Assay of Aflatoxins by Liquid Chromatography With Fluorescence Detection in Food Analysis. *National library of medicine*.
- García, J. (2008). *Análisis de aflatoxinas y ocratoxina en alimentos y evaluación de la ingesta poblacional*. Obtenido de Universidad de Valencia:
<http://roderic.uv.es/bitstream/handle/10550/15889/cristinaj.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- García, S. (2016). Química supramolecular del estado líquido: disolventes nanoestructurados para la extracción de micotoxinas en productos agroalimentarios. *Universidad de Córdoba*, 64-65.
- Gimeno, A., y Martins, M. (2011). *Micotoxinas y micotoxicosis en animales y humanos*. USA: Special nutrients.
- Gimeno, E. (2002). Frutos secos y salud. *Elsevier*, 1-5.
- González, S. (2010). Determinación de aflatoxinas en frutos de nuez mediante cromatografía líquida. *Universidad Austral de Chile*.
- Gómez, V., Martínez, M., y Vargas, L. (2013). Aflatoxinas, incidencia, impactos en la salud , control y prevención . *Biosalud*, 89-109.

- Hernández, I., y García, R. (2012). Vigilancia de las Aflatoxinas B1 en pipas, frutos secos y productos derivados en el instituto nacional de higiene epidemiología y microbiología. *La alimentación latinoamericana*.
- Herrero, L. (2012). *Puesta a punto y validación de un método de análisis de aflatoxinas en frutos secos y cereales*. Zaragoza: Universidad de Zaragoza.
- Huang, B., Ren, Y., and Han, Z. (2010). Simultaneous determination of aflatoxins B1, B2, G1, G2, M1 and M2 in peanuts and their derivative products by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 62-68.
- Krauss, R., and Eckel, R. (2000). Dietary guideline a statement for Healthcare. *Professionals from the nutrition committee of the American Heart Association*, 2296-2311.
- Lazo, R., y Sierra, G. (2008). Investigación del efecto de las micotoxinas en el ser humano. *Universidad Agraria*, 7-11.
- Lerda, D. (2011). Mycotoxins Factsheet. *JCR Technical notes*, 44.
- Martínez, A. (2018). Evaluación de la presencia de las micotoxinas zearalenona y aflatoxina total en arroz sin cáscara en una muestra representativa del ecuador. *Universidad Tecnológica Equinoccial*.
- Martínez, Y. (2017). Evaluación y selección de métodos para la determinación de aflatoxina en muestras de maíz y sus derivados. *Universidad Simón Bolívar*.
- Norman, M., y Kaplan, M. (2015). Clinical Implications of Mycotoxins and Stachybotrys. *The American Journal of the Medical Sciences*, 262-274.
- OMS. (2018). Inocuidad de alimentos, Aflatoxinas. *Organización mundial de la salud*, 5. WHO/NHM/FOS/RAM/18.1.
- Osorno, C. (2015). *Estandarización y evaluación de un método para la determinación de micotoxinas por medio de la técnica fotométrica (kit ELISA) a materias primas de avicultura en la industria de alimentos para animales cipa s.a*. Pereira: Universidad Tecnológica De Pereira.
- Pamplona, J. (2007). *Salud por los Alimentos, nuevo estilo de vida*. Madrid: Safeliz.
- Rahaman, T., and Vasiljevic, T. (2016). Effect of processing on conformational changes of food proteins related to allergenicity. *Trends in Food Science y Technology*, 24-34.
- REGLAMENTO (EU) No 165/2010 DE LA COMISIÓN. (2010). *REGLAMENTO (EU) No 165/2010 DE LA COMISIÓN*. Obtenido de Dario oficial de la Unión Europea: <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:050:0008:0012:ES:PDF>
- Riley, R., y Pestka, J. (2005). *Micotoxinas; metabolismo, mecanismos, marcadores bioquímicos*. Reino Unido: El libro azul de micotoxinas.
- Ropero, A. (2018). Frutos secos. *Universidad Miguel Hernandez*, 1-6.
- Ruiz, J. (2016). Micotoxinas y salud. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 387-388.
- Salas, J. (2005). *Frutos secos, salud y culturas mediterráneas*. Glosa.
- Sanabria, N., Martínez, Y., y López, A. (2017). Métodos para la determinación de aflatoxinas en alimentos. *Revista Agrollanía*, 51-58.
- Sanchiz, Á. (2018). *Efecto del procesado térmico, de presión y enzimático sobre alérgenos de frutos secos y su detección por PCR en tiempo real*. Madrid: Universidad Complutense de Madrid.
- Sathe, S., and Sharma, G. (2009). Effects of food processing on food allergens. *Molecular Nutrition y Food Research*, 970– 978.
- Soriano, M. (2007). *Micotoxinas en alimentos*. España: Diaz de santos.
- Treviño, J. (2009). *Desarrollo de un biosensor de resonancia de plasmón superficial para la determinación de muestras biológicas*. Madrid: Universidad Autónoma de Madrid.
- Vásquez, F., y Morán, J. (2016). La prevalencia de Aspergillus spp y aflatoxinas en Zea mays almacenado en silos, Ecuador. *Publicando*, 189-202.
- Vázquez, C., y Alcaraz, F. (2005). *Alimentación y Nutrición, manual teórico práctico*. España: Diaz de Santos.
- Vallejo, M. (2013). *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)*. Riobamba: Escuela superior politécnica de Chimborazo.
- Vidal, J., Ezquerra, A., y Bertolín, J. (2013). Biosensores de afinidad electroquímica para la detección de micotoxinas. *Biosensores y Bioelectrónica*, 146-158.
- Wu, F. (2004). Evaluación de riesgos de micotoxinas con el propósito de establecer estándares regulatorios internacionales. *Environ Sci Technol*., 4049-4055