Detección de la aflatoxina en productos agrícolas

Dr. Floyd E. Dowell, USDA, Agricultural Research Service, Center for Grain and Animal Health Research

El Dr. Dowell es Ingeniero Agrícola Investigador en el Servicio de Investigación Agrícola (ARS por sus siglas en inglés) del Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA). Cuenta con unos 30 años de experiencia en el desarrollo de tecnología para medir la calidad de los granos y mejorar la seguridad alimentaria en países en vías de desarrollo. Posee más de 20 años de experiencia en agricultura internacional y es Presidente de "Planting Hope International", una organización sin fines de lucro que proporciona apoyo agrícola, médico y educativo a personas en países en vías de desarrollo. Él ha tratado el tema de la aflatoxina en países como Kenia y Lados, donde la falta de programas de pruebas de aflatoxina ha afectado la salud humana y animal. Gran parte de su experiencia se centra en la medición y mantenimiento de la calidad de los granos. Su interés en aprender más sobre agricultura para producción en climas tropicales de países en vías de desarrollo lo llevó a tomar recientemente el curso TAD de ECHO.

Introducción

La aflatoxina, una micotoxina producida por el hongo Aspergillus flavus y A. parasiticus, puede afectar de manera negativa la salud animal y la humana. Su presencia en muchos cultivos agrícolas es una preocupación y los niveles a menudo son regulados en el comercio nacional e internacional. La aflatoxina no suele ser un problema en los cultivos saludables que se manejan y almacenan de manera adecuada. Sin embargo, cuando los cultivos se estresan (como cuando son dañados por insectos o sequía, o cuando se almacenan de manera inadecuado en alto contenido de humedad), los hongos que producen la aflatoxina pueden infectar las semillas en el campo o almacenadas (Figura 1). Las condiciones favorables para contaminación con aflatoxina y los resultantes problemas de salud se repasan en EDN 87 (https://c.ymcdn.com/sites/echocommunity.site-ym.com/resource/collection/9EE3A8EE-FF5C-45A6-9BA9-0AB3A3E7652E/edn87.pdf). Si bien la ocurrencia de la aflatoxina es relativamente rara y los niveles en los alimentos y el forraje son usualmente bajos, puede ser de preocupación en cereales, oleaginosas, frutos secos, frutas y especies.

Los programas de pruebas de aflatoxina son una parte rutinaria de muchas políticas de comercio de importación y exportación y son un componente establecido del proceso de mercadeo del productor para productos como el maní en muchos países. Sin embargo, las pruebas son menos comunes en países en donde existen pocos o ningún incentivo financiero para recompensar al vendedor

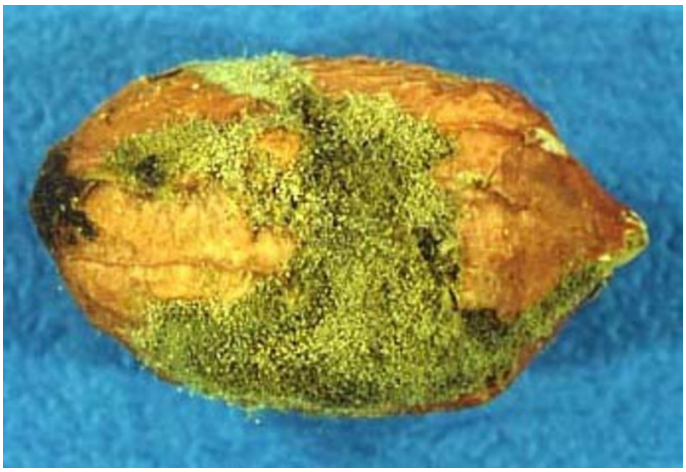

Figura 1. Grano de maní mohoso que probablemente cuenta con altos niveles de aflatoxina.
Foto: Floyd Dowell

por suplir un cultivo de alta calidad. En la medida que mejoran las economías y los rendimientos de los cultivos en los países en desarrollo surgen oportunidades para que los vendedores sean recompensados por generar productos básicos de alta calidad. Esto ha sucedido en países como Laos, Kirguistán y Kenia donde los compradores de grano privados y del gobierno y los productores de alimento para animales talvez están mejor posicionados para implementar un programa de muestreo y pruebas que puede recompensar a los vendedores por suministrar un producto entero y seguro; estos compradores de granos pueden a su vez vender el grano como un alimento para animales o alimentos de más alta calidad.

Los programas de muestreo y prueba de aflatoxina para inspección oficial y comercio internacional se publican en Codex (http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/agns/pdf/CXS_193e.pdf (http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/agns/pdf/CXS_193e.pdf)) y Grain Inspectors Packers and Stockyards Administration (GIPSA) (https://www.gipsa.usda.gov/fgis/public_handbooks.aspx (https://www.gipsa.usda.gov/fgis/public_handbooks.aspx)). Sin embargo, quienes deseen implementar programas locales de prueba o efectuar pruebas en países donde la aflatoxina no está regulada, pueden investigar procedimientos de prueba para sus situaciones únicas. De esta manera, este artículo le brindará a los nuevos usuarios información básica sobre muestreo y pruebas de aflatoxina incluyendo os beneficios y las limitaciones de las distintas estrategias.

Muestreo para la aflatoxina

A menudo, cuando se habla sobre el tema del muestreo para la aflatoxina, se debate sobre la exactitud de los distintos métodos de muestreo. Sin embargo, la mayoría de errores en la medición de aflatoxina se debe a la variabilidad del muestreo más que a la exactitud del método de prueba (Whitaker *et al.*, 1994). Esto se debe a que la aflatoxina generalmente se concentra en un pequeño porcentaje de los granos. Por ejemplo, si una parte de un campo padece de estrés provocado por la sequía o enfermedades, es más probable que las semillas de esas plantas se infecten con *A. flavus* y aflatoxina. De igual manera, las semillas que han sido dañadas por insectos en el campo es más probable que contengan el hongo invasor. Cuando están almacenados, pueden surgir áreas con alta humedad (atractivas para el *A. flavus*) en donde haya filtraciones en el techo, las semillas hayan sido almacenadas con alto contenido de humedad o las poblaciones de insectos crean condiciones favorables para el desarrollo de hongos. El resto de las semillas puede estar libre de aflatoxina, pero los altos niveles en los pocos granos que contienen hongos pueden causar altos promedios de aflatoxina en todo el

lote. Si la muestra no incluye granos infectados, los falsos negativos darán a los compradores la impresión de que el lote no contiene aflatoxina. En cambio, si la muestra contiene en su mayoría granos con hongo mientras que el resto del lote está relativamente libre de aflatoxina, los muy altos niveles de aflatoxina en la muestra llevará al rechazo del lote entero aun cuando el resto del lote pueda consistir de semillas muy buenas y de alta calidad.

Planes tradicionales de muestreo

Si el objetico de un plan de muestreo de aflatoxina es obtener un nivel de confianza de que los niveles de aflatoxina están por debajo de algún umbral definido, el plan de muestreo debe seguir uno de los procedimientos estándar publicados por organizaciones como la United States Food and Drug Administration o la Comisión Europea. Estos planes generalmente requieren que se obtengan múltiples muestras de un tamaño específico de una corriente en movimiento de granos o de probetas insertadas en el montón de granos. Estas muestras de gran tamaño luego se mezclan y se vuelven a obtener muestras hasta que se obtenga un tamaño de muestra apropiado para ser analizado. Estos planes tradicionales de muestreo proporcionan a los compradores y vendedores algún nivel de confianza de que los valores resultantes de aflatoxina representan la masa de granos. Por supuesto que la aflatoxina medida en la muestra puede ser mayor o menor que el nivel contenido en todo el lote, pero obtener muestras repetidamente durante la cosecha y el proceso de manejo puede resultar en más confianza en cuanto al nivel promedio de aflatoxina de los granos que estén siendo comprados o vendidos.

Muestreo de semillas de alto riesgo

Si el objetivo del plan de muestreo de aflatoxina es contar con un nivel de confianza de que el lote no posee o tiene niveles muy bajos de aflatoxina, entonces deben examinarse solamente las semillas con más probabilidades de contener aflatoxina (Whitaker *et al*. 1998). Si está presente, a menudo la aflatoxina se concentra en semillas que han sido dañadas por insectos o enfermedades. Estas semillas tenderán a ser más pequeñas de manera que la prueba en esas semillas más pequeñas (obtenidas al pasar la muestra o el lote a través de un tamiz de manera que pasen las semillas más pequeñas) puede indicar si existe un problema potencial de aflatoxina. Si no se encuentra aflatoxina en esta fracción es poco probable que el resto del lote contenga aflatoxina.

Limpieza y re-muestreo

Si se detecta en una muestra un nivel inaceptable de aflatoxina, se puede limpiar el lote para eliminar las semillas más pequeñas y descoloridas. Las semillas restantes pueden entonces examinarse en cuanto a aflatoxina para observar si los niveles se encuentran por debajo de umbrales aceptables. Tal como se mencionó previamente, es más probable que las semillas más pequeñas contengan aflatoxina, lo mismo aplica para las se millas descoloridas. Así, eliminar granos descoloridos escogiéndolos a mano o con un clasificador electrónico puede reducir la aflatoxina en la porción restante. La correlación entre granos pequeños y dañados y altos niveles de aflatoxina ha sido confirmada en nueces de árboles, cacahuates y granos de cereal. Los granos descoloridos o pequeños poseían niveles de aflatoxina de 10 a 1000 veces mayores que las semillas más grandes y saludables (Dowell *et al*. 1990; Johansson *et al*. 2006). Aunque no es un método

recomendable otra opción para reducir el promedio de aflatoxina es mezclar granos contaminados con semillas de alta calidad para diluir la aflatoxina a niveles seguros.

Detección de la aflatoxina

Puede usarse muchos métodos directos e indirectos, cuantitativos y cualitativos para evaluar muestras para aflatoxina. Todos los métodos requieren moler la muestra y extraer la aflatoxina con un solvente o una solución acuosa para su posterior análisis, con la excepción del método visual de luz negra. Todos los métodos aquí mencionados son métodos aprobados ya sea por la *American Association of Cereal Chemists International* (AACCI) (http://methods.aaccnet.org/toc.aspx (http://methods.aaccnet.org/toc.aspx)) o por pruebas de verificación de desempeño de USDA (GIPSA) (http://www.gipsa.usda.gov/fgis/rapidtestkit.aspx (https://www.gipsa.usda.gov/fgis/rapidtestkit.aspx)). Los métodos varían en su exactitud, en los costos de los instrumentos, el costo por muestra y el nivel requerido de experiencia técnica. Algunos métodos fueron abordados en EDN 87 (https://c.ymcdn.com/sites/echocommunity.site-ym.com/resource/collection/9EE3A8EE-FF5C-45A6-9BA9-0AB3A3E7652E/edn87.pdf). A continuación se presentan agrupados en tres categorías: 1) El Método Visual, 2) Métodos Cromatográficos y 3) Pruebas Rápidas.

Método visual

El método más simple y rápido para determinar si las muestras pueden contener aflatoxina es examinar visualmente los granos bajo una luz ultravioleta o "negra" (365 nm). El método se basa en el supuesto de que la fluorescencia brillante amarillo-verduzca (BGYF por sus siglas en inglés) está correlacionada con la presencia de aflatoxina Sin embargo, otros materiales pueden también ser fluorescentes lo que puede dar como resultado falsos positivos. Además, los granos contaminados no siempre son fluorescentes lo que puede resultar en un falso negativo. Debido a la posibilidad de falsos negativos y falsos positivos asociados con esta prueba GIPSA expresa que este método visual no debe ser usado para exámenes de micotoxinas. No obstante estas limitaciones, el conteo de la cantidad de granos BGYF se ha utilizado para aceptar o rechazar con algún éxito lotes de maíz. La prueba visual es la más sencilla que está disponible para situaciones donde existe limitación de recursos, no requiere de preparación de muestras ni tiene costo por muestra. El único costo en instrumentos es una lámpara ultravioleta (~$600). Si se utiliza este método, todo resultado positivo debe confirmarse con una prueba química.

Métodos cromatográficos

Los métodos que usan la cromatografía son los más exactos pero también requieren de mucha habilidad y tiempo. Se muele la muestra, luego se extrae la aflatoxina de la muestra molida usando un solvente. Luego la aflatoxina contenida en el solvente se pasa a través de una columna de cromatografía o se coloca sobre un plato de cromatografía que contiene una sustancia que atrae la aflatoxina en base a la polaridad de esta última. Todos los componentes poseen una polaridad única de manera que la fuerza de atracción de los componentes hacia el solvente o hacia la columna o el plato determina cuán rápidamente la aflatoxina fluye con el

solvente. Cada compuesto, incluida la aflatoxina será separado de otros compuestos en la medida que esta se mueve a través de la columna o a través del plato. Luego puede ser cuantificada de la forma en que se describe a continuación.

- **Líquido de cromatografía de alto desempeño (HPLC).** Este método proporciona resultados exactos y cuantitativos y a menudo se usa como un método contra el cual se comparan todos los otros métodos de prueba de aflatoxina. Sin embargo, este método requiere de una inversión significativa de capital (>$100,000), mucha capacitación en un laboratorio para realizar los procedimientos y técnicos capacitados para mantener los instrumentos. El costo por muestra en un laboratorio comercial es de ~$85/muestra, incluyendo mano de obra. La técnica requiere de muchas horas por muestra, aunque una parte del proceso puede ser automatizada. Con este método, la aflatoxina es atraída ya sea al solvente que se mueve a través del instrumento o a la columna HPLC que este mueve. La cantidad de aflatoxina en la muestra se mide mientras pasa por un sensor situado al final de la columna HPLC. El método HPLC posee un límite de detección muy sensible de menos de 1 ppb, y cuenta con la confianza de muchos compradores y vendedores, es una buena opción de necesitarse resultados muy exactos (como para el establecimiento de un laboratorio de referencia)
- **Cromatografía de capa delgada (TLC)**. Este método fue una vez una alternativa popular al HPLC ya que es hasta cierto punto portátil. Sin embargo, requiere de varios días de capacitación y práctica, atención en los detalles y equipo de laboratorio que incluye dosificadores, vasos y platos TLC. Este método trabaja sobre el mismo principio del HPLC, pero se deja al solvente moverse hasta un plato estacionario cubierto con un material específico en vez hacerlo fluir a través de una columna como en el método HPLC. Este método ya no es aprobado por GIPSA. Se necesitan muchas horas para completar una prueba y tampoco es tan exacto como el HPLC ni tan rápido y exacto como el método rápido listado a continuación.

Pruebas rápidas

Las pruebas rápidas son algunos de los métodos actuales más populares para probar granos para aflatoxina. Estos involucran la extracción de aflatoxina de la muestra del suelo, luego añadir una sustancia que causa un cambio de color correlacionado con el nivel de aflatoxina. En algunas pruebas el cambio de color indica si la aflatoxina está por encima de un nivel especificado (por ejemplo, 20 ppb), mientras que en otras pruebas la intensidad del color puede usarse para cuantificar el nivel de aflatoxina usando un lector. Estas pruebas pueden realizarse en 5 a 20 minutos, requiere de un mínimo de capacitación y equipos y usualmente cuesta menos de $10/prueba para los suministros consumibles. El equipo necesario puede variar de acuerdo a la prueba pero puede incluir un molino pequeño (como un molino de café), balanza, incubadora vasos de vidrio y piperas. El costo único para comenzar a probar generalmente va de $1,000 a $5,000. Los tres tipos básicos de pruebas se listan a continuación.

- **Pruebas de microcubetas**. Las pruebas de microcubetas de ensayo inmunoabsorbente vinculadas a enzimas (ELISA) miden la aflatoxina extraída de una muestra del suelo con un solvente como metanol o (más

recientemente) una solución acuosa más amigable al medio ambiente. El solvente luego se mezcla con una cantidad conocida de aflatoxina con etiqueta de enzima y la mezcla se añade a una microcubeta cubierta de anticuerpos. Los anticuerpos que recubren la microcubeta capturarán ya sea la aflatoxina en el solvente o la aflatoxina etiquetada de enzima. Si se extrae una gran cantidad de aflatoxina de la muestra los anticuerpos capturarán más de la aflatoxina de la muestra que de la aflatoxina etiquetada como enzima. Si no se extrajo aflatoxina de la muestra entonces solamente la aflatoxina etiquetada como enzima será capturada por los anticuerpos. Luego se añade un sustrato que causa un cambio de color solamente en la aflatoxina etiquetada como enzima que fue capturada por los anticuerpos, y el color es inversamente correlacionado con la cantidad de aflatoxina en la muestra extraída. Un color más claro significa que se extrajo más aflatoxina de la muestra y por tanto que fue capturada por los anticuerpos. El proceso requiere del seguimiento de varios pasos y lleva de 5 a 20 minutos. Puede usarse para examinar muestras para determinar si se encuentran por debajo de un nivel específico o se puede cuantificar el cambio de color con un lector para indicar el nivel real de aflatoxina. El límite de detección es de 2 a 5 ppb. El costo de las pruebas de microcubetas de alrededor de $10 cada uno para suministros consumibles. Sin embargo, se pueden realizar varias pruebas de microcubetas a la vez y algunos pasos se pueden automatizar; esto puede disminuir el tiempo y el costo por prueba y constituye la tecnología preferida en algunos laboratorios que generalmente realizan varias pruebas al día.

- **Cintas de flujo lateral**. Estas pruebas de tipo "varilla de nivel" también requieren que se extraiga aflatoxina de una muestra de suelo con un solvente o una solución acuosa y están ganando popularidad. Simplemente se coloca una cinta de flujo lateral dentro de la solución (Figura 2), o la solución se aplica a la cinta. La solución luego fluye por acción de capilaridad través de una zona en donde un anticuerpo, ligado a partículas de color, se unirá a la aflatoxina. Si no hay aflatoxina presente, el anticuerpo con la partícula de color se moverá a una zona donde puede ser capturado y se formará una línea de color brillante. Si hay presencia de suficiente aflatoxina para unirse a todos los anticuerpos entonces no quedan anticuerpos libres que formen la línea de color. De esta manera, la brillantez de la línea está relacionada de forma inversa a la cantidad de aflatoxina en la muestra. La brillantez de la línea puede medirse con un lector en varias versiones de las pruebas de manera que la aflatoxina pueda cuantificarse. Las pruebas de cintas de flujo lateral pueden ser más rápidas (3.5 a 10 minutos) y son más sencillas que la prueba de microcubeta ya que requieren de menos pasos. Los procedimientos son lo suficientemente sencillos como para que la

Figura 2. Colocando una cinta de flujo lateral en un extracto obtenido de una muestra de suelo.
Foto: Floyd Dowell

mayoría de los usuarios puedan aprenderlos rápidamente. El límite de detección es similar al de las pruebas de microcubetas y el costo es similar o menor. Estos hechos, combinados con la simplicidad de uso de las cintas de flujo lateral hacen que las cintas sean preferibles a las pruebas de microcubetas ELISA para pruebas ocasionales.

- **Pruebas fluorométricas**. Estas pruebas requieren que se extraiga la aflatoxina de muestras del suelo de la misma forma que en las otras pruebas rápidas pero el extracto luego es pasado a través de una columna que o captura impurezas y pasa solamente aflatoxina, o captura aflatoxina y pasa las impurezas. En el último caso la aflotoxina es luego expulsada de la columna usando un solvente. En ambos casos se añade un revelador a la aflotoxina extraída, lo que causa que ésta se vuelva fluorescente. La cantidad de fluorescencia está correlacionada con los niveles de aflatoxina y se puede leer usando un fluorómetro. Se necesita seguir varios pasos para filtrar y diluir el extracto, pero la prueba proporciona resultados exactos y cuantitativos. Puede realizarse entre 5 a 15 minutos y tiene un nivel de detección de <1 ppb. Las pruebas fluorométricas son más exactas a lo largo de un rango más amplio de niveles de aflatoxina que otras pruebas rápidas, pero los costos (que incluyen solventes) tienden a ser más altos—más de $10/prueba para suministros consumibles.

La selección de una prueba rápida de aflatoxina probablemente será influenciada por la exactitud, el costo, la simplicidad y la velocidad del método de prueba. Sin embargo, debido a que el muestreo es por mucho la mayor fuente de error y ya que todas las pruebas rápidas que son verificadas por GIPSA cumplen con criterios específicos de exactitud, esta talvez no debería ser un factor importante a la hora de seleccionar una prueba. Eso deja el costo, la simplicidad y la velocidad. Si muchas pruebas son efectuadas rutinariamente por día y si una persona experimentada puede dedicarse a correr las pruebas, las microcubetas de ELISA pueden ofrecer ventajas en cuanto a velocidad y costo. Si se efectúan unas pocas pruebas, ya sea regular o esporádicamente, las pruebas de flujo lateral son las más fáciles de aprender y son de bajo costo. Estas pruebas de flujo lateral se están haciendo constantemente más baratas y más simples y pueden ofrecer la mejor decisión para el usuario ocasional en el futuro previsible. Las pruebas fluorométricas son exactas pero pueden ser tediosas y requieren de más solventes que las otras pruebas.

Resumen

Cuando se hacen pruebas para aflatoxina, la variabilidad del muestreo es la mayor fuente de error. Para determinar si el lote llega a un umbral promedio de aflatoxina tenga cuidado de analizar una muestra representativa obtenida usando un plan aprobado de muestreo. Para determinar si el lote contiene algún riesgo de aflatoxina, muestree y mida solamente la porción que es más probable que contenga aflatoxina —los granos dañados o descoloridos; si esta muestra no contiene o tiene muy poca aflatoxina, el usuario puede tener bastante seguridad de que el lote entero posee poca o ninguna aflatoxina. Si una muestra contiene aflatoxina por encima de un nivel especificado, el lote puede limpiarse para eliminar los granos sospechosos o mezclarse con producto en buen estado. El método de prueba para aflatoxina que se escoja dependerá del costo, la exactitud, la velocidad

y los requisitos de simplicidad del usuario. Para el usuario ocasional las pruebas de flujo lateral generalmente ofrecen ventajas sobre otras pruebas en cuanto a simplicidad, velocidad, costo y exactitud.

La mención de nombres de marcas o de productos comerciales en esta publicación es solamente con el propósito de brindar información específica y no implica recomendación o aprobación por parte del Departamento de Agricultura de EE.UU. (USDA). USDA es un proveedor y empleador que practica igualdad de oportunidades.

Referencias

Dowell, F.E., J.W. Dorner, R.J. Cole, and J.I. Davidson, Jr. 1990. Aflatoxin reduction by screening farmers stock peanuts. *Peanut Science* 17:6-8.

Johansson, A.S., T.B. Whitaker, W.M. Hagler, Jr., D.T. Bowman, A.B. Stale, G. Payne. 2006. Predicting aflatoxin and fumonisin in shelled corn lots using poor-quality grade components. *J. AOAC International* 89(2):433-440.

Whitaker, T.B., F.E. Dowell, W.H. Hagler, Jr., F.G. Giesbrecht, and J. Wu. 1994. Variability associated with sampling, sample preparation, and chemical testing for aflatoxin in farmers' stock peanuts. *J. AOAC International* 77(1):107-116.

Whitaker, T.B., W.M. Hagler, Jr., F.G. Giesbrecht, J.W. Dorner, F.E. Dowell, and R.J. Cole. 1998. Estimating aflatoxin in farmers' stock peanut lots by measuring aflatoxin in various peanut-grade components. *J. AOAC International* 81(1):61-67.

© 2016 ECHO Inc. http://edn.link/detect-aflatoxin