

Verificación de la contaminación del maíz por aflatoxina b1, mediante un sistema automático basado en la fluorescencia de cada grano

Por: *VALLONE, Lisa. / **DRAGONI, Iván / ***RODRÍGUEZ, Paola.



*Ph.D. en Microbiología y Docente Dipartimento VSA, Università di Milano. Email lisa.vallone@unimi.it

**Ph.D tecnología alimentaria, Docente Dipartimento VSA, Università di Milano. (q.e.p.d).

***Esp. Epidemiología, M.V.Z. UPTC. Docente y Co-investigadora Grupo IRABI, JDC. E-mail: mvzpaola.rodiguez@yahoo.com

Recibido: 21 de junio de 2010
Aceptado para publicación: 20 de agosto de 2010
Tipo: Investigación

RESUMEN

"Aflaflesh" es un instrumento computarizado, diseñado para combinar un método de adquisición de datos visuales, con sofisticados sistemas operativos de software y análisis de imágenes. Esto, mediante la exposición de la fluorescencia de maíz sometido a la radiación UV, ya que si hay contaminación con aflatoxinas B1, es posible transformar directamente el número de píxeles de la fluorescencia, en la concentración de AFB1 correspondiente.

Palabras clave: maíz, aflatoxinas, fluorescencia, UV, HPLC.

ABSTRACT

"Aflaflesh" is a computerized instrument designed to combine a visual data acquisition with an acquisition of sophisticated operating systems and image analysis software. By exposing the fluorescence of maize subjected to UV radiation, because if there is contamination with aflatoxin B1, it is possible to transform directly the number of pixels measured by the fluorescence instrument for the concentration of AFB1.

Keywords: corn, aflatoxins, fluorescence, UV, HPLC

INTRODUCCIÓN

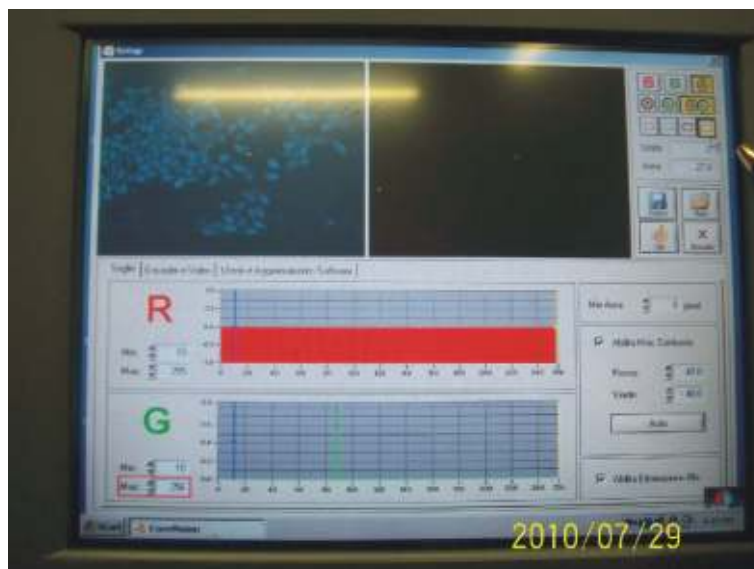
Las aflatoxinas son micotoxinas producidas principalmente por hongos ubicuos del género *Aspergillus flavus*, que se pueden diseminar y contaminar los alimentos para consumo humano y animal, principalmente los cereales (maíz, trigo, soya, sorgo), semillas oleaginosas, nueces y especias. (Eszter, P. et al. 2002)

Las condiciones óptimas para el crecimiento del micelio del hongo están dadas por una temperatura entre 36 y 38 ° C, una humedad del 30% en el sustrato y 85% en el ambiente, mientras que la producción de la toxina se presenta a una temperatura entre 24 y 30 °C. (Molfino, 2005).

Se encuentran también otros hongos potencialmente productores de aflatoxinas como: *Aspergillus niger*, *Aspergillus ruber*, *Aspergillus wentii*, *Penicillium frequentans*, *Penicillium westlingii*, *Penicillium Citrinum* (*citricum*) (Dragoni et al. 1997). Así mismo, existen cuatro moléculas diferentes de éstas: B₁, B₂, G₁, G₂. los compuestos se distinguen por su color de fluorescencia así : azul (blue) para B₁ y B₂ y verde (green) para G₁ y G₂, cuando son observados a la luz ultravioleta (365 nm). (Ventura, et al. 2004).

La Aflatoxina B₁ (AFB₁), es la más estudiada, la más tóxica y mutagénica; además, el carcinógeno más potente hasta ahora descrito, tiene un mayor tropismo por el hígado. (Kussak, et al. 1995). La Legislación Europea ha establecido un máximo de contaminación de 20ppb para la AFB₁, en las explotaciones de ganado lechero tienen un mínimo de 50 ppb 3ppb y para los productos utilizados en la alimentación del ganado de leche, perteneciente al Consorcio Parmigiano-Reggiano. (Gazzetta Ufficiale, 2010).

La presencia de aflatoxinas en los cereales se debe a la producción de cepas de hongos, tanto en la etapa de cultivo como durante el almacenamiento poscosecha de los granos. Es



un problema de salud pública difícil de resolver ya que puede ser atribuible a muchos factores, tales como: temperatura elevada, aumento de humedad, o por la contaminación cruzada con diferentes cepas toxigénicas ya sea de los posibles contaminantes en el modo de cultivo o en los productos relacionados con el almacenamiento. (Blesa, J. et al. 2003)

El objetivo de este estudio es determinar la posible relación entre la fluorescencia de los granos de maíz, sometidos a la radiación UV, con la contaminación por aflatoxinas, a través de la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Precisión (HPLC).

MATERIALES Y MÉTODOS

A través de un estudio preliminar se determinó la relación entre la fluorescencia de los granos de maíz, sometidos a la radiación UV y la presencia de AFB₁, utilizando HPLC.

El siguiente fue el curso de acción:
-Desarrollo del equipo experimental: se utilizó un prototipo Aflaflesh Manuale que se adelantó en el Consorcio Agrícola de Milán y Lodi (Norte de Italia), para la visualización de la fluorescencia de los granos de maíz. Este viene equipado de la siguiente forma:

1. Una cinta transportadora con dos cepillos para la limpieza continua de los granos.
2. Lámparas de luz ultravioleta. UV (B280 nm),

3. Cámara digital de alta resolución para la detección de las imágenes.
4. Un computador para la automatización y procesamiento de los datos.
5. Pantalla LCD táctil, para la visualización nítida de las imágenes.

-Toma de muestras: a continuación se describe el procedimiento utilizado para el muestreo de los granos de maíz:

1. Cada muestra se obtiene mediante la recolección de 10 Kg de maíz, utilizando el equipo "multi-max".

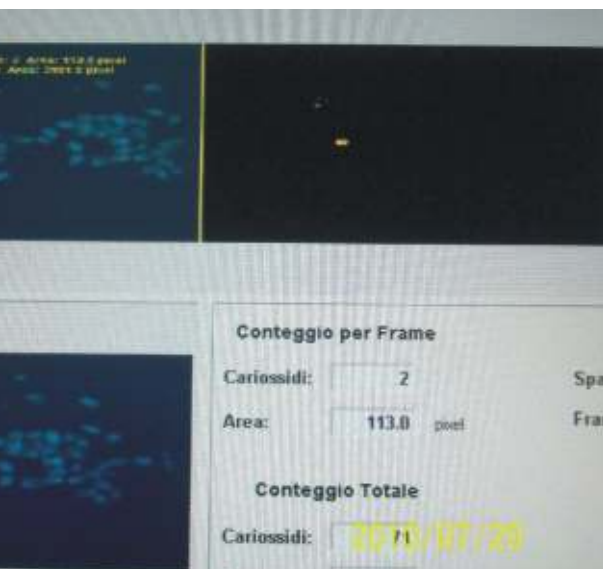
2. Las muestras son procesadas cinco veces en el equipo Aflaflesh, para obtener un valor promedio de la fluorescencia.

3. Los 10Kg se mezclan bien y de allí se extrae una muestra de 1Kg para determinar el valor medio de la fluorescencia (en pixeles), el cual no debe diferir de la lectura en un 5%.

4. 1Kg de la muestra se macera y homogeniza, de ésta se envían dos partes, cada una de 50g, para un análisis por duplicado, utilizando HPLC.

Se tomaron 45 muestras de maíz, de 10Kg/cada una, a partir de 69 lotes diferentes (equivalentes a 18.582,64 kilos).

-Análisis químico paralelo mediante HPLC, para la detección de aflatoxina B₁, en las muestras, donde se utilizaron 50 gramos por cada 10 Kg.



El proceso se realizó dos veces en los granos o fragmentos de granos fluorescentes.

-Se sugirió un "modelo experimental", como lo expresa la Tabla 1, con el material seleccionado, para identificar la contaminación media por unidad de fluorescencia AFB1.

Tabla 1: Esquema del modelo "experimental" para el cálculo de la contaminación media de UF.

Nº UF/50 gr	AFB ₁ µg/kg (HPLC)	AFB ₁ µg/UF
1023	1512	0,07
1034	797,3	0,03
1035	790	0,03
544	703	0,06
309	755	0,12
504	681	0,06

Para calcular el valor de la contaminación media en UF, se toman los datos obtenidos en el análisis por HPLC, expresados en µg/Kg, se multiplica por 50, cifra correspondiente al peso real, de cada muestra, y este resultado se divide en 1000 (K); el dato logrado se divide a su vez por el producto del conteo manual de los granos fluorescentes. De esta forma se han analizado 45 patrones, teniendo como referencia el número de UF en la contaminación y un valor determinado por HPLC.

-Análisis estadístico para determinar la relación entre todos los resultados: a partir de los datos se calcularon, por medio de pruebas de regresión múltiple, los coeficientes de

correlación entre las concentraciones de AFB₁, las que se detectan en las muestras por HPLC y las estimadas por el número de unidades fluorescentes presentes en las mismas.

-Posterior a esto, se realizó el ajuste del diseño del equipo automático para calcular la concentración de AFB₁, a través de la emisión de luz fluorescente de los granos de maíz sometidos a la radiación UV.

A continuación se llevó a cabo un cálculo de la correlación entre la lectura del equipo y los resultados de los análisis por HPLC. El valor de la contaminación se utiliza para crear una curva de calibración y la vinculación de la fluorescencia, en píxeles, producida por el equipo "Aflaflesh", en la muestra de 10 kg, y la concentración de AFB₁, medida por HPLC.

En este estudio se utilizaron 35 muestras, de las cuales 16 fueron empleadas para verificar el calibre de los parámetros ópticos del instrumento y 19 para el control de la concentración de AFB₁ en HPLC.

RESULTADOS

En las muestras de granos analizados, se encontró que 16 de las 45 no están contaminadas. Las demás variables tienen valores que oscilan entre 0.05g/ kg a 432g/ kg para la concentración de Aflatoxina B₁.

Los análisis efectuados sobre muestras (que constituían sólo UF) en el diseño experimental, permiten suponer que la contaminación media de la unidad fluorescente es igual a 0,06.

El estudio estadístico ha demostrado que existe una correlación directa entre la contaminación de los granos con aflatoxina B₁ y los resultados del HPLC, lo cual se calcula utilizando el número de unidades fluorescentes seleccionadas, como se muestra en la figura No. 1.

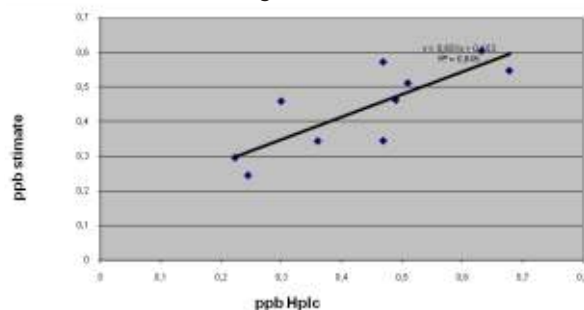


Figura No.1. Representación gráfica de la correlación entre la contaminación de granos con aflatoxina B₁ (ppb HPLC) y el contagio que se calcula utilizando el número de unidades seleccionadas de fluorescencia (ppb estimado).



CONCLUSIONES

La presencia de granos fluorescentes (UF) siempre son evidencia de aflatoxina B1, esto sugiere que, con base en la fluorescencia del grano, no hay falsos positivos o negativos con respecto a la contaminación, dado que ésta es directamente proporcional al número de unidades fluorescentes de la muestra.

A partir de estos datos experimentales, se diseñará el sistema de control automático "Aflaflesh", para transformar directamente el número de píxeles que corresponden a la fluorescencia emanada de la muestra en una concentración predecible de AFB1.

El instrumento utilizado es un dispositivo fácil de manejar, no requiere personal especializado; el tiempo para el análisis es de aproximadamente 15 minutos en los patrones de 10 kg; no requiere preparación de la muestra o el uso de reactivos; el análisis se puede repetir con la misma muestra empleando métodos complementarios como ELISA.

Como se trata de una detección automática, es una metodología objetiva y reproducible.

Este sistema puede ser desarrollado en otras matrices de alimentos contaminados con aflatoxinas y ser precursor de un proceso de las máquinas validadoras.

BIBLIOGRAFIA

- Dragoni, Ivan, et al. 1997. Muffe alimenti e Micotossicosi. Citta Studi Edizioni. Capitulo 6, p158.
- Eszter, P. et al. 2002. Liquid Chromatographic Determination of Aflatoxins. *Microchemical Journal* 73, 39-46.
- Blesa, J. et al. 2003. Determination of Aflatoxins in Peanuts by Matrix Solid-Phase Dispersion and Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1011, 49-54.
- Kussak, A. et al. 1995. Immunoaffinity Column Clean-up for the High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Aflatoxins B1, B2, G1, G2, M1 and Q1 in urine. *Journal of Chromatography B*, 672, 235-259.
- Molfini, M. 2005. Micotossine Sotto Contollo Con Raggi UV e Telecamere. *IZ Bovini*. N22, 30-33
- Ventura, M. et al. 2004. Determination of Aflatoxins B1, G1, B2 and G2 in Medicinal Herbs by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1048, 25-29.
- Gazzetta Ufficiale dell' Unione Europea. 2010. Regolamento (UE) N.165/2010. En: <http://www.normativasanitaia.it/jsp/dettaglio.jsp?id=32606>; consulta junio 2010