

## **Propuesta de un método biológico para la detección de Aflatoxina en alimentos.**

Vargas, Cristian; Velásquez, Verónica; Morales, María, M.Sc.  
Facultad de Ingeniería Mecánica y Ciencias de la Producción  
Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL)  
Campus Gustavo Galindo, Km 30.5 vía Perimetral  
Apartado 09-01-5863. Guayaquil-Ecuador  
[cjvargas@espol.edu.ec](mailto:cjvargas@espol.edu.ec), [vpavela@espol.edu.ec](mailto:vpavela@espol.edu.ec), [mmorales@espol.edu.ec](mailto:mmorales@espol.edu.ec).

### **Resumen**

*En el siguiente trabajo de investigación se propone un método biológico para la detección de aflatoxina en alimentos no elaborados, el método biológico se basa en una hipótesis, que indica que la aflatoxina tiene un efecto inhibidor del crecimiento en un microorganismo determinado, para ello se probaron tres microorganismos, seleccionados previamente bajo criterios preestablecidos. En el método propuesto se usó la metodología de extracción de micotoxina sugerida por la USDA (Departamento de Agricultura de Estados Unidos) con metanol diluido al 70%, posteriormente se incorporó esta solución de aflatoxina extraída con una concentración de 90 ppb, en un agar no selectivo como PCA (Plate Count Agar) en diferentes proporciones, donde se inoculó por siembra en masa los tres microorganismos a probarse para el método, según si presentaba o no inhibición de su crecimiento, se escogió el microorganismo para el diseño final del método biológico; y se hicieron los cálculos respectivos.*

**Palabras Claves:** *microorganismo, agar no selectivo, aflatoxina, PCA, Siembra en masa.*

### **Abstract**

*This research Project proposes a biological method for the detection of aflatoxin in non processed foods, it is based on a hypothesis which indicates that aflatoxin has an inhibiting effect on the growth of certain microorganisms, in order to prove this hypothesis, three microorganisms were previously selected under pre-established criteria. In this proposed method, there was used the mycotoxin extraction method suggested by the USDA (United States Department of Agriculture) with methanol diluted at 70%, this extracted aflatoxin solution at 90ppb was added to a non selective agar such as PCA (Plate Count Agar) in different proportions, the inoculation of the three microorganisms to be proven for the method, was made in mass cultive technique and according to whether there was a growth inhibition or not, the microorganism was selected for design of the final biological method and the respective calculation.*

*Redactar aquí el resumen en inglés utilizando las mismas especificaciones del formato descrito arriba en resumen.*

**Keywords:** *microorganism, non selective agar, aflatoxin, PCA, Mass cultive.*

## 1. Introducción

Desde su descubrimiento hace unas cuantas décadas las aflatoxinas han cobrado cientos de víctimas humanas, especialmente en países en vías de desarrollo (1).

En esta investigación se propondrá un nuevo método de detección de esta micotoxina; se la escogió por ser la más difundida y común en el mundo, adicionalmente se la asocia generalmente a cultivos de maíz, que son muy comunes así como polémicos en nuestro país.

La humedad y altas temperaturas que presenta la costa ecuatoriana que acoge a muchos maiceros, es propicia para la proliferación de los hongos del género *Aspergillus* productores potenciales de aflatoxinas (2).

A pesar que ya existen métodos de detección rápidos, sencillos y confiables, creemos no son lo suficientemente accesible por disponibilidad de importación y por costos; además que respondemos a la necesidad investigación para crear tecnología propia que adolece el país principalmente.

## 2. Metodología a partir del planteamiento de la hipótesis

### 2.1 Exposición de la hipótesis a probar

Como se sabe las bacterias tienen sistemas enzimáticos muy diferentes y más ricos en diversidad al del ser humano, aunque algunas comparten ciertas similitudes; basándose en estas premisas se planteó la hipótesis de que algunas bacterias podrían compartir la misma toxinas con el hombre, entre ellas las aflatoxinas. Esto se podría usar en caso de probarlo, para la detección de aflatoxinas en alimentos utilizando una metodología determinada, poco parecida a un antibiograma en cuanto a lectura de resultados.

### 2.2 Metodología para probar la hipótesis científica planteada

En primera instancia se seleccionaron tres microorganismos para probar si uno o más de ellos presentaban inhibición en su crecimiento frente a una o más concentraciones de aflatoxina (escogidas en primera instancia por criterio); para ello se agregó una solución de metanol al 70% (metodología sugerida por la USDA para extracción de micotoxinas) (4), con aflatoxina de 90 ppb a un agar no selectivo como PCA (Plate Count Agar), previamente esterilizado, posterior se calentó el agar en la plancha hasta eliminar completamente el metanol, al final se inoculó

por siembra en masa (3) los microorganismos a probar y se observó los resultados.

En caso de encontrarse resultados favorables (que uno o más microorganismo presenten inhibición al crecimiento en presencia de aflatoxina en agar), se realizaría una segunda corrida de igual manera que en el caso anterior, se realizaría por quintuplicado y con 5 concentraciones diferentes incluyendo la concentración 0 ppb de control, con la única diferencia que en esta segunda ocasión las concentraciones no dependerán de criterio sino que serán equidistantes e igual y menores a la concentración mínima de inhibición encontrada en la primera corrida.

En la siguiente figura se explica de manera simple los pasos que se seguirán en el método en caso de ser viable técnicamente.

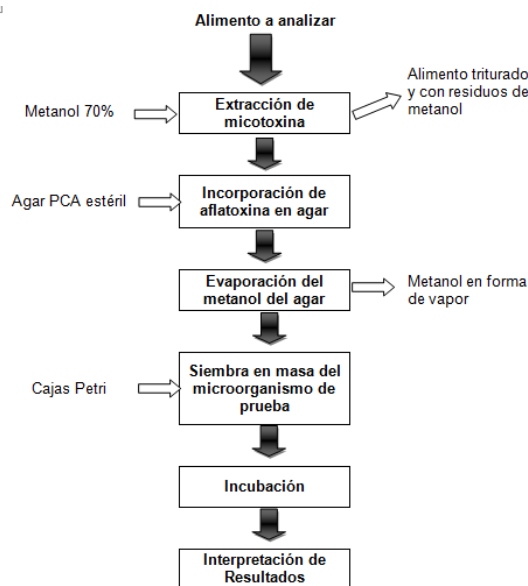


Figura 1. Pasos del método en caso de ser viable técnicamente.

Para probar la hipótesis se decidió escoger tres probióticos humanos los cuales fueron:

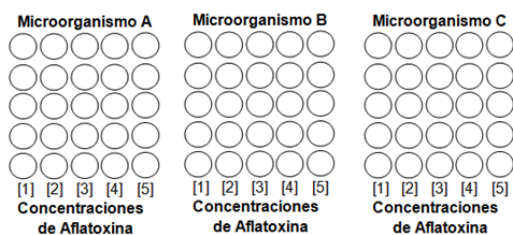
- *Lactobacillus acidophilus* (microorganismo a)
- *Bacillus clausii* (microorganismo b)
- *Saccharomyces boulardii* (microorganismo c)

Además de todo esto se realizó una prueba que la denominamos prueba de metanol residual, la cual tuvo como objetivo determinar si el metanol residual debido a la incorporación de la micotoxina, tenía o no un efecto inhibitorio sobre los probióticos probados, lo

cual descartaría o no una posible desviación en los resultados.

La siguiente figura ilustra el diseño de la experimentación, aunque hay que recalcar que se ilustra una dilución en quintuplicado, pero se trabajo con dos por lo que el tamaño de la muestra en para cada microorganismo es de 10, cada concentración de aflatoxina se prueba en dos diluciones.

#### CORRIDA EXPLORATORIA.



#### SEGUNDA CORRIDA

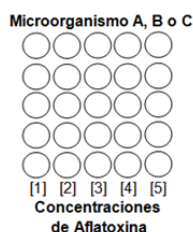


Figura 2. Diseño de la Experimentación.

### 2.3 Materiales y equipos

Los materiales usados en esta experimentación, fueron materiales comunes de un laboratorio de microbiología convencional, los cuales menciono a continuación:

Materiales e insumos: Cajas Petri, Fiolas de 250 ml, Pipetas de 10ml, Mechero de Alcohol, Embudo, Papel Filtro #1, Espátula, Metanol 70% y Muestra de Maíz contaminada con Aflatoxina 90 ppb.

Equipos: Incubadora, Estufa, Autoclave, Triturador y plancha de calentamiento.

### 2.4 Costos de prueba diseñada

El costo aproximado que se estimo para la prueba diseñada es \$11.96, este costo es netamente un bosquejo que nos dará una idea general únicamente para efectos comparativos.

## 3. Resultados

### 3.1 Pruebas de metanol residual

Para probar si el metanol residual tuvo o no efecto inhibitor se procesaron los datos de los crecimientos con metanol y sin metanol residual, dando un tamaño de muestra total de 10 para cada variable en cada microorganismo, debido a que se trabajo por quintuplicado en las dos últimas diluciones.

La prueba de hipótesis estadística que se usó par probar si las variables eran iguales o diferentes ( $H_0$  y  $H_1$  respectivamente), fue la no paramétrica Kruskal-Wallis, por la ausencia de normalidad y el tamaño de la muestra no significativo. Los valores P se muestran a continuación.

Tabla 1. Valores P de la prueba de Metanol Residual.

Valores P	Microorganismos		
	A	B	C
	0.571	0.910	0.970

### 3.2 Resultados de la Experimentación

A Continuación se muestran las concentraciones con las que se trabajaron en la primera corrida de la experimentación.

Tabla 2. Concentraciones en agar de la primera corrida de la experimentación

Concentración en Agar en ppb	Denominación de la concentración
0	1
2	2
19.9	3
79.7	4
159.4	5

Una vez que se realizo la experimentación con los parámetros ya mencionados, se obtuvo que el microorganismo a y b presentaban inhibición total a partir de la concentración 2 en su última dilución, con crecimientos por placa de  $10^1$  UFC/Placa y  $10^2$  UFC/Placa respectivamente, sin embargo el microorganismo c no presento inhibición total a ninguna concentración.

El microorganismo escogido para la segunda corrida fue el b, debido a que sus colonias eran bien definidas y no eran invasivas como el microorganismo a.

Las concentraciones escogidas para la segunda corrida fueron 5 al igual que en la primera pero esta vez equidistantes entre sí, incluyendo la concentración 1 y 2 de la primera corrida como referencia menor y mayor respectivamente.

En los resultados de la segunda corrida únicamente se observó una inhibición total en la misma concentración que se encontró en la primera (2 ppb en agar).

### 3.3 Planteamiento final del método.

El método se planteó con un límite de detección mínimo de 20 ppb de acuerdo con la norma NTE INEN 187:95 segunda revisión (5), la cual es para maíz, que es el alimento más comúnmente asociado a la aflatoxina. A continuación se describe el método completo.

1. Realizar el proceso de Extracción de la aflatoxina de forma convencional con metanol al 70% al alimento a analizar.
2. Agregar **23 ml** de dicho metanol en una fiola con 200 ml de agar PCA previamente esterilizado.
3. Someter a calentamiento hasta que se evapore la totalidad del metanol de 10 a 20 minutos aproximadamente, controlar este aspecto por peso inicial y final de la fiola.
4. Diluir 1 vial del probiótico de marca comercial Enterogermina (ampolla líquida) en una fiola de 90 ml de agua de peptona estéril, realizar diluciones hasta  $10^{-6}$  sin tomar en cuenta la primera dilución en la fiola de 90 ml.
5. Inocular por siembra en masa (3) únicamente la última dilución en 6 cajas petri estériles de vidrio o plástico, en 5 de ellas se agregara el agar en donde se evaporó el metanol y en la última se agregara PCA sin metanol evaporado y se llamara placa de control.
6. Incubar por 48 horas.

### Interpretación de resultados

#### Caso 1

Si solo existe crecimiento en la placa de control y esta es mayor a  $10^1$  UFC, el resultado es que el **alimento analizado tiene una concentración mayor a 20 ppb de aflatoxina.**

#### Caso 2

Todas las placas tienen crecimiento y la placa de control mantiene un crecimiento menor a  $10^3$  UFC, **el alimento analizado tiene una concentración menor a 20 ppb de aflatoxina.**

#### Caso 3

Todas las placas tienen crecimiento y la placa de control tiene un crecimiento mayor a  $10^2$  UFC, **se debe repetir el análisis** y asegurarse de seguir todas las buenas prácticas posibles al momento de la siembra o revisar que el probiótico no esté caducado.

### 3.4 Costos de una prueba de referencia.

La prueba de referencia que se escogió para contrastar el método diseñado fue la prueba "reveal for aflatoxin" de Neogen S.A, se consultó los precios con el representante de Neogen en Ecuador que es Apracom S.A. El tiempo para obtención de resultados en esta prueba es de 1.2 horas aproximadamente según el distribuidor.

El costo por análisis usando esta prueba es de \$14.36, para el cálculo de este costo se dio un tratamiento igual que en caso del cálculo del costo del método propuesto, es decir se desprecia el costo de los servicios básicos entre otros.

## 4. Conclusiones

Como se demostró con pruebas estadísticas y como se aprecia por simple observación sobre los resultados de la prueba de metanol residual, este no tiene ningún efecto inhibitorio sobre los microorganismos de prueba, lo cual descarta cualquier especulación de sesgo debido a este factor en toda la experimentación y diseño del método.

Según los resultados de la experimentación se demuestran la viabilidad técnica del método, sin embargo se recomienda hacer mayores repeticiones en cuanto a las corridas y con concentraciones más cercanas para disminuir el margen de error del método. Además se recomienda expandir el estudio a otras toxinas.

El método diseñado presenta un menor costo con referencia al costo por análisis de la prueba rápida contrastada, pero también se debe reconocer que no se tomaron en cuenta costos intangibles como el tiempo de obtención de resultados, por esto se recomienda realizar un estudio de costos más profundo para reafirmar esta conclusión.

## 5. Agradecimiento

Agradecemos a la M.Sc. María Fernanda Morales por aportar sus conocimientos en la dirección de la investigación de esta tesis.

Y a nuestros familiares y amigos por el apoyo moral brindado.

## 7. Referencias

- [1] Aflatoxicosis en humanos provocada por el consumo de alimentos contaminados, que no son de origen animal. Disponible en: <http://www.engormix.com/MA-micotoxinas/articulos/aflatoxicosis-humanos-provocada-consumo-t1662/p0.htm>. Fecha de consulta: 06 de diciembre del 2012
- [2] Género *Aspergillus*. Disponible en: <http://mariajoselinares.wordpress.com/>. Fecha de consulta: 06 de diciembre del 2012
- [3] Instituto Ecuatoriano de Normalización. "*Norma técnica Ecuatoriana INEN NTE 1529-17:98, Control Microbiológico de los Alimentos. Bacterias anaerobias mesófilas*". Quito, Ecuador, 1998. Pág. 3-4.
- [4] FAO. "*Problemas en la cuantificación de micotoxinas y niveles de contaminación en México*". Tehuacán, México 1993. Disponible en Internet: <http://www.fao.org>
- [5] Instituto Ecuatoriano de Normalización. "*Norma técnica Ecuatoriana INEN NTE 187:95, Maíz en grano*". Quito, Ecuador, 1995. Pág. 3.