

---

# *Estudio de la producción de aflatoxinas B<sub>1</sub>, G<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> y G<sub>2</sub> en semillas de anacardo por parte de *Aspergillus parasiticus* CECT 2681 mediante cromatografía líquida de ultra-alta resolución*

**Claudia Verónica Alfaro<sup>1,2,3</sup>, Francesc Broto-Puig<sup>1</sup>, Montserrat Agut<sup>2\*</sup>, Lluís Comellas<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Dpto. de Química analítica, IQS School of Engineering, Universitat Ramon Llull. <sup>2</sup>Dpto. de Bioingeniería, IQS School of Engineering, Universitat Ramon Llull. <sup>3</sup>Dpto. de Ingeniería de Procesos y Ciencias Ambientales, Facultad de Ingeniería y Arquitectura, Universidad Centroamericana José Simeón Cañas.

---

*Study of the production of aflatoxins B<sub>1</sub>, G<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> and G<sub>2</sub> on cashew nuts by *Aspergillus parasiticus* CECT 2681 by means of ultra-performance liquid chromatography*

*Estudi de la producció de les aflatoxines B<sub>1</sub>, G<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> i G<sub>2</sub> en anacards per *Aspergillus parasiticus* CECT 2681 mitjançant cromatografia líquida d'ultra-alta resolució*

*Recibido: 20 de febrero de 2013; revisado: 30 de abril de 2013; aceptado: 2 de mayo de 2013*

## **RESUMEN**

En este trabajo se pone a punto un método de cromatografía líquida de ultra-alta resolución para el análisis de aflatoxinas en semillas de anacardo. El tiempo de análisis cromatográfico para la detección de las 4 micotoxinas es de sólo 3,2 minutos. Para la extracción de las aflatoxinas se utiliza una mezcla de metanol/agua 70:30. Para la separación de los analitos se utiliza una columna cromatográfica Acquity UPLC™ BEH C18 (2.1 x 50 mm, 1.7 µm) y la detección se realiza con detector UV (350 nm).

El método se aplicó a dos muestras de semilla de anacardo de distinto origen (India y El Salvador), previamente inoculadas con *Aspergillus parasiticus* CECT 2681, cepa capaz de producir aflatoxinas en arroz.

Los resultados del estudio mostraron que las semillas de anacardo permiten la producción de estas toxinas por parte de una cepa productora si las condiciones ambientales son adecuadas.

**Palabras clave:** Aflatoxinas. Anacardos. *Aspergillus*. Cromatografía líquida de ultra-alta resolución.

## **SUMMARY**

In this work we develop a method for the analysis of aflatoxins in cashew nuts by means of ultra-performance liquid chromatography. The method allows the detection of the four toxins in only 3.2 minutes. Aflatoxins are extracted with a mixture of methanol and water 70:30. A chromatographic column Acquity UPLC™ BEH C18 (2.1 x 50 mm, 1.7 microns) is used for the separation and a UV detector (350 nm) is employed to measure them.

The method was applied to two cashew nuts samples obtained from two different countries (India and El Salvador),

previously inoculated with *Aspergillus parasiticus* CECT 2681, a strain able to produce aflatoxins when it grows on rice.

Results showed that aflatoxins can be produced in cashew nuts by a toxigenic strain if environmental conditions are suitable.

**Keywords:** Aflatoxin. Cashew nuts. *Aspergillus*. Ultra-performance liquid chromatography.

## **RESUM**

En aquest treball es posa al punt un mètode de cromatografia líquida d'ultra-alta resolució per a l'anàlisi d'aflatoxines en anacards. El temps d'anàlisi cromatogràfica per a la detecció de les 4 micotoxines és de només 3,2 minuts. Per a l'extracció de les aflatoxines s'utilitza una barreja de metanol/aigua 70:30. Per a la separació dels analits s'utilitza una columna cromatogràfica Acquity UPLC™ BEH C18 (2.1 x 50 mm, 1.7 µm) i la detecció es realitza amb un detector UV (350 nm).

El mètode es va aplicar a dues mostres d'anacards de diferent origen (Índia i El Salvador), prèviament inoculades amb *Aspergillus parasiticus* CECT 2681, soca capaç de produir aflatoxines en créixer sobre arròs.

Els resultats de l'estudi van demostrar que l'anacard és un substrat que permet la producció d'aquestes toxines per part d'una soca productora si les condicions ambientals són adequades.

**Paraules clau:** Aflatoxines. Anacards. *Aspergillus*. Cromatografia líquida d'ultra-alta resolució.

## INTRODUCCIÓN

La seguridad alimentaria es un objetivo clave para cualquier país, ya que es imprescindible que las personas tengamos garantizado el acceso a alimentos seguros, libres de peligros físicos, biológicos o químicos. Entre estos últimos se encuentran las micotoxinas<sup>(1,2)</sup>.

Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por algunas cepas de hongos capaces de provocar procesos de intoxicación. Existen muchos tipos de micotoxinas que pueden clasificarse en función de su agente productor o de su naturaleza química. De entre todas ellas, destacan las aflatoxinas.

Las aflatoxinas son derivados de difuranocumarinas producidas principalmente por cepas del género *Aspergillus*. Se han identificado 20 diferentes aflatoxinas, pero solamente 4 de ellas ocurren en forma natural y son contaminantes importantes de una amplia gama de alimentos: B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub><sup>(3)</sup>. Su estructura química se muestra en la figura 1.

Las aflatoxinas provocan toxicidad aguda y crónica en animales y personas. De entre ellas, la aflatoxina B<sub>1</sub> es la sustancia carcinogénica de origen natural más potente que se conoce y está clasificada por la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer en el Grupo 1, es decir, como carcinógena para el hombre<sup>(4)</sup>.

Existen numerosos estudios sobre el grado de contaminación por aflatoxinas en distintos frutos secos como cacahuetes, pistachos o almendras<sup>(5-7)</sup>. En el año 2008, el *Codex Alimentarius* estableció que para frutos secos listos para comer, el nivel máximo de aflatoxinas totales sería de 10 µg/kg. Esta propuesta fue aceptada por la Unión Europea en el 2009<sup>(8)</sup>.

A pesar de ser un fruto seco, la semilla de anacardo ha sido un alimento del que tenemos poco conocimiento sobre la presencia de estas toxinas como contaminantes. Estas semillas son la parte comestible del anacardo, *Anacardium occidentale* L., un cultivo perenne de importancia agroindustrial, del que su semilla se obtiene al quitarle la cáscara de la nuez después de tostarla. El anacardo se conoce también, en algunos países, como marañón.

Con estos antecedentes, el objetivo principal de este estudio fue determinar si la semilla de anacardo es un sustrato adecuado para la producción de aflatoxinas por parte de hongos micotoxigénicos. Para ello, se inocularon dos muestras de marañón con una cepa descrita como productora de aflatoxinas en arroz, *Aspergillus parasiticus* CECT 2681.

La determinación de estas toxinas no es fácil porque normalmente se encuentran en muy bajas concentraciones.

Entre las técnicas propuestas destaca la cromatografía utilizando diferentes sistemas de detección<sup>(6,9-12)</sup>, a las que en los últimos años se les ha ido sumando métodos inmunológicos tales como el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)<sup>(10,13)</sup> y la inmunocromatografía (IC)<sup>(5,14)</sup>.

En este caso, recogiendo la experiencia previa de otro trabajo realizado en nuestro grupo<sup>(15)</sup>, escogimos utilizar la cromatografía líquida de ultra-alta resolución (UHPLC).

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Muestras

Para evaluar si la semilla de anacardo es un buen sustrato para la producción de aflatoxinas, se adquirieron dos tipos de muestras, que se vendían a granel, de diferentes procedencias:

1. Semillas de anacardo enteras, originarias de la India y adquiridas en Barcelona, España.
2. Semillas de anacardo partidas, originarias de El Salvador y adquiridas en Zacatecoluca, El Salvador.

### Patrones y disolventes

Se dispuso de patrones puros de aflatoxinas G<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> y B<sub>1</sub> (AFG2, AFG1, AFB2 y AFB1) Sigma (St. Louis, MO, USA). Se prepararon soluciones madre de 100 mg/L de cada una de las aflatoxinas, excepto de AFB2 de 120 mg/L, disueltas en metanol. Cada una de estas soluciones se mantuvo a 4°C y cubiertas con papel de aluminio, para evitar la degradación gradual de las toxinas por influencia de la luz UV. Las soluciones de trabajo se prepararon el día de análisis en dilución de 0.4 mg/L.

Se utilizó Metanol purísimo-CODEX, calidad HPLC (Panreac Química S.A., España) y agua purificada en un sistema Milli-Q System (Waters, USA).

### Moho productor de aflatoxinas y medios de cultivo

Para los estudios de producción de aflatoxinas en semillas de anacardo, se utilizó como cepa productora *Aspergillus parasiticus* CECT 2681, cepa contrastada como productora de aflatoxinas en arroz y en la planta medicinal cáscara sagrada (*Ramnus purshiana*)<sup>(16)</sup>. La cepa fue suministrada liofilizada por la Colección Española de Cultivos Tipo.

El medio de cultivo utilizado para el crecimiento del hongo fue Agar Patata Glucosa (PDA) suministrado por Merck (Alemania).

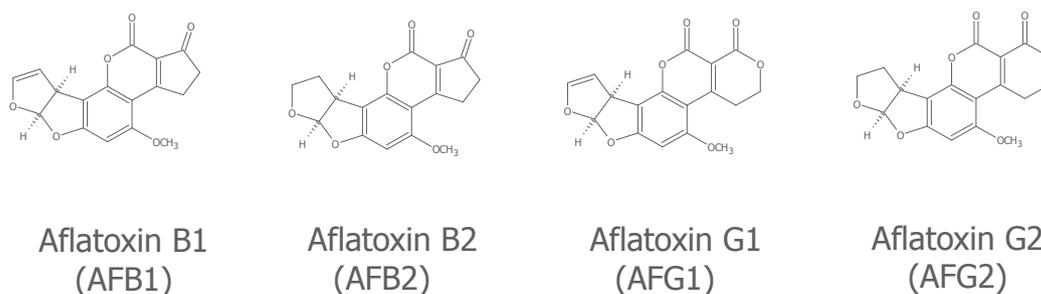
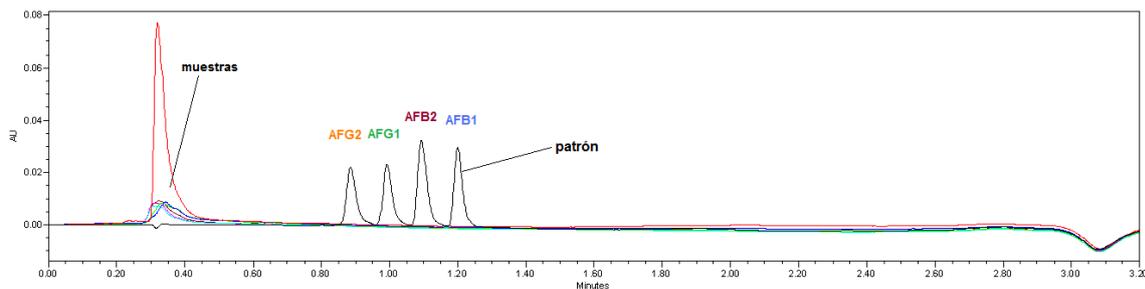


Figura 1. Estructura química de las aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>



**Figura 2.** Cromatograma UHPLC-UV/VIS de comparación de las muestras no inoculadas con el patrón de 0.4 mg/L  $\lambda=350$  nm. (AFG1= aflatoxina G<sub>1</sub>, AFG2= aflatoxina G<sub>2</sub>, AFB1= aflatoxina B<sub>1</sub>, AFB2= aflatoxina B<sub>2</sub>).

### Preparación e inoculación de las muestras de semillas de anacardo

Las muestras de semilla de marañón fueron divididas en dos grupos: uno para ser inoculado con el moho y el otro se dejó sin tratamiento alguno (sin inoculo). Para ello, se pesan 5 gramos de semilla de anacardo en matraces Erlenmeyer de 125 mL, se adiciona 5 ml de agua desionizada y se autoclavan a 121°C durante 30 min.

Una vez esterilizados, al grupo de muestras a inocular se les adiciona dos discos de 6 mm de cultivo de 7 ó 14 días de edad de la cepa de *A. parasiticus* incubada en oscuridad a 27±1 °C sobre agar PDA.

### Extracción de Aflatoxinas

Para la extracción de las aflatoxinas de las semillas de anacardo, se utiliza una mezcla de metanol/agua 70:30. Sobre el total de la muestra tratada se realizan dos extracciones sucesivas con 45 mL de la mezcla de solventes de extracción, se agitan durante 30 minutos y se filtran con papel de filtro Whatman número 3 por gravedad. Los filtrados se recogen en un matraz aforado de 100 mL y se enrasa con la mezcla de solventes de extracción.

### Preparación de la muestra para inyección al UHPLC

Se toman 10 mL del extracto y se agregan 8 mL de agua, esto se hace para alcanzar un contenido de 40% de metanol. La dilución resultante se filtra a través de un filtro de nylon de 0.22  $\mu$ m de tamaño de poro.

### Análisis cromatográfico

La separación cromatográfica de las toxinas se realiza mediante un cromatógrafo ACQUITY UPLC (Waters) acoplado a un detector UV (350 nm). La columna cromatográfica utilizada es una Acquity UPLC™ BEH C18 (2.1 x 50 mm,

1.7  $\mu$ m) a 30°C y flujo de 0.4 mL/min. La fase móvil consiste en (A) agua y (B) metanol. El gradiente de elución es lineal, incrementándose del 40% B al 85% B en 2,3 minutos, manteniéndose isocrático 0,2 min y volviendo a la situación inicial en 0,1 min. El equilibrio de la columna, antes de una nueva inyección, es de 0,6 min. El tiempo total de análisis, incluyendo el acondicionamiento inicial de la columna es de 3,2 min. El volumen de inyección es de 10  $\mu$ L.

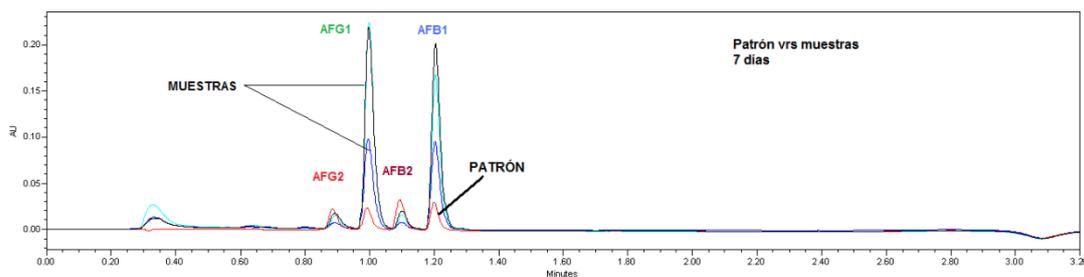
Con estas condiciones de extracción y de preparación de muestra el método permite detectar 0.4 mg/Kg de cualquiera de las 4 aflatoxinas en muestra de anacardo.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

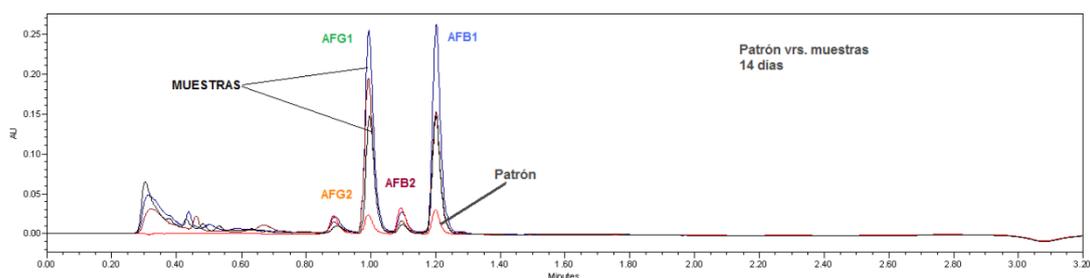
El análisis de aflatoxinas se efectuó mediante UHPLC. Esta técnica permite disminuir el tiempo de análisis y obtener una mejor resolución cromatográfica que la HPLC porque utiliza columnas rellenas con partículas de tamaño de alrededor de 1,7  $\mu$ m<sup>(15,17,18)</sup>.

En este trabajo, ajustadas las condiciones cromatográficas, se consiguió una buena resolución para la detección de las 4 micotoxinas, B<sub>1</sub>, G<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> y G<sub>2</sub> en sólo 3,2 minutos, tiempo que coincide con el reportado en el trabajo publicado previamente por Ventura *et al.*<sup>(15)</sup>.

Un punto a destacar de este trabajo es que el sistema de extracción de las toxinas a partir de las semillas de anacardo es muy simple y rápido. El método que se presenta, tanto la parte correspondiente a la extracción de las toxinas como su separación mediante UHPLC, demuestra que su identificación puede realizarse con un tiempo de análisis muy corto y con un bajo consumo de solventes



**Figura 3.** Cromatograma UHPLC-UV/VIS integrado patrón vrs muestras inoculadas a los 7 días, con el patrón de 0.4 mg/L,  $\lambda=350$  nm



**Figura 4.** Cromatograma UHPLC-UV/VIS integrado patrón vs muestras inoculadas a los 14 días, con el patrón de 0.4mg/L,  $\lambda=350$  nm

de fase móvil, lo que es favorable desde el punto de vista económico y medioambiental.

Las muestras no inoculadas, presentaron niveles de aflatoxinas no detectables por debajo del límite de detección del método (0.4 mg/kg), como se muestra en la figura 2, en la que se presenta una superposición de un cromatograma de patrón de aflatoxinas con el de una muestra no inoculada.

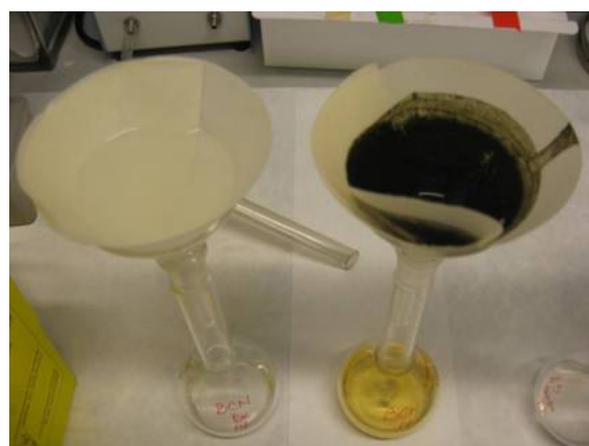
*A. parasiticus* CECT 2681 al ser inoculado en las muestras de semillas de anacardo e incubado a 27°C presenta un crecimiento abundante tanto a los 7 como a los 14 días de cultivo. En la Fotografía 1 pueden observarse filtrados provenientes del proceso de extracción de las aflatoxinas a partir de muestras inoculadas y sin inocular.

En las dos muestras inoculadas con *A. parasiticus*, se encontró que las cuatro aflatoxinas en estudio se produjeron tras los primeros 7 días de incubación y su concentración aumentó a los 14 días. Para ilustrarlo, en las figuras 3 y 4, a título de ejemplo, se muestran los cromatogramas de la muestra de El Salvador, a los 7 y 14 días de incubación respectivamente, mostrando integrado el patrón.

En la tabla 1 se presentan las concentraciones de aflatoxinas estimadas producidas sobre semillas de marañón inoculadas con *A. parasiticus*, por el método UHPLC-UV. Al no haberse detectado micotoxinas en las muestras no inoculadas, demuestra que éstas fueron producidas por la cepa de colección y no corresponden a contaminación natural.

**Tabla 1.** Contenido de aflatoxinas en semillas de marañón inoculadas después de 7 y 14 días, por UHPLC-UV/VIS. (AFG1= aflatoxina G<sub>1</sub>, AFG2= aflatoxina G<sub>2</sub>, AFB1= aflatoxina B<sub>1</sub>, AFB2= aflatoxina B<sub>2</sub>).

Muestras	Concentración de aflatoxinas en mg/kg			
	AFG2	AFG1	AFB2	AFB1
India Inoculada 7 días	10,3	122,6	6,7	97,7
India Inoculada 14 días	16,3	171,6	11,0	143,1
El Salvador Inoculada 7 días	20,2	266,3	13,88	164,8
El Salvador Inoculada 14 días	29,9	296,7	24,7	254,2



**Fotografía 1.** Filtrados provenientes del proceso de extracción de las aflatoxinas provenientes de muestras de anacardo sin inocular (izquierda) e inoculadas (derecha) con *A. parasiticus*.

## CONCLUSIONES

A partir de este estudio, podemos concluir que:

1. Las semillas de anacardo son un substrato adecuado para el desarrollo de aflatoxinas por parte de *Aspergillus parasiticus* CECT 2681
2. El UHPLC-UV es una técnica adecuada y rápida para el análisis cromatográfico de las aflatoxinas AFB1, AFB2, AFG1 y AFG2, a partir de un proceso simple de extracción de estos analitos en semillas de anacardo.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Wild CP, Gong YY. *Carcinogenesis* 2010; **31**: 71.
2. Agut M, Comellas L. *Chemistry today* 2009; **27**: 46.
3. Juan C, Zinedineb A, Montóia JC, Idrissib L, Mañesa J. *Food Control* 2007; **19**: 849.
4. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, vol. 56, Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins, International Agency for Research on Cancer, Lyon, 1993, p. 489.
5. Zhang D, Li P, Zhang Q, Zhang, W. *Biosensors & Bioelectronics* 2011; **26**: 2877.
6. Vosough M, Salemi A. *Food Chemistry* 2011; **127**: 827.
7. Rodrigues P, Venancio A, Lima N. *Food Research Int.* 2012; **48**: 76.

- 
8. EFSA <http://www.efsa.europa.eu/en/contamtopics/topic/aflatoxins.htm>. Recuperada en 25 de abril de 2013.
  9. Gottfried S, Herebian, D. *Current Analytical Chem.* 2013; **9**: 99.
  10. Rodrigues I, Naehrer K. *Phytopathologia Mediterranea* 2012; **51**: 175.
  11. Soleimany F, Jinap S, Faridah A, Khatib A. *Food Control* 2012; **25**: 647.
  12. Rubert J, Soler C, Manes J. *Food Control* 2012; **25**: 374.
  13. Liu BH, Hsu YT, Lu CC, Yu FY. *Food Control* 2013; **30**: 184.
  14. Sun X, Zhao X, Jian T, Gu X, Zhou J, Chu FS. *Food Control* 2006; **17**: 256.
  15. Ventura M, Guillén D, Anaya I, Broto-Puig F, Lliberia JL, Agut, M, Comellas L. *Rapid Commun. Mass. Spectrom.* 2006; **20**: 3199.
  16. Ventura M, Gómez A, Anaya I, Díaz J, Broto F, Agut, M, Comellas L. *J. Chromatogr. A* 2004; **1048**: 25.
  17. Wu N, Lippert JA, Lee ML; *J. Chromatogr. A* 2001; **911**:1.
  18. Jerkovic AD, Mellors JS, Jorgenson JW. *LCGC North Am.* 2003; **21**: 600.

## AGRADECIMIENTOS

El trabajo ha sido financiado dentro del proyecto IQS CRL-finin-100602.

Uno de los autores agradece a la Cátedra UNESCO de la Universidad Ramon Llull, a la Universidad Centroamericana José Simeón Cañas y al IQS, el soporte económico recibido.