

Evaluación de la posible presencia de micotoxinas en mango fresco y procesado

Mendoza Carrillo, J.M.^a, Mares Mares, E.^b, Ozuna López, C.^a, Abraham Juárez, M.R.^{a*}

^aUniversidad de Guanajuato, División de Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-Salamanca, Departamento de Alimentos, Carretera Irapuato-Silao km 9, C.P. 36500, Irapuato, Gto., México.

^bInstituto Tecnológico Superior de Guanajuato, Coord. De Ingeniería en Industrias Alimentarias, Carr. Guanajuato-Puentecillas km 10.5. Puentecillas. *mabraham@ugto.mx

RESUMEN: Los hongos pueden producir micotoxinas que pueden formar parte de productos derivados del mango, como pulpas que se han sometido a cierto tratamiento térmico. En un estudio previo se obtuvo el aislamiento y caracterización de hongos, logrando la identificación mediante microscopía de hongos *Aspergillus sp.* y *Penicillium sp.* presentes en la superficie del fruto (cascara) del mango fresco variedad Manila en descomposición a los 8 y 13 días de almacenamiento. Identificados los hongos se hizo un análisis de micotoxinas por medio del método de cromatografía de capa fina en placas de sílica gel, en las cuales se cargaron los extractos obtenidos y como estándar la aflatoxina B1 y la patulina, además se corrieron utilizando como fase móvil cloroformo-acetona (9:1), visualizándose en una foto documentador de luz ultravioleta. De acuerdo a los resultados, se identificaron tanto la aflatoxina como la patulina en la muestra en pulpa fresca.

Palabras clave: Mango, pulpa, micotoxina.

ABSTRACT: The fungi can produce mycotoxins that can be part of products derived from the mango, such as pulps that have undergone a certain heat treatment. In a previous study the isolation and characterization of fungi was obtained, obtaining the identification by microscopy of fungi *Aspergillus sp.* and *Penicillium sp.* present in the surface of the fruit (husk) of the mango variety Manila variety in decomposition at 8 and 13 days of storage. Once the fungi were identified, a mycotoxin analysis was done by means of the thin layer chromatography method in silica gel plates, in which the obtained extracts were loaded and as standard the aflatoxin B1 and the patulin, in addition they were run using as chloroform mobile phase -acetone (9:1), visualized in a photographic document of ultraviolet light. According to the results, both aflatoxin and patulin were identified in the sample in fresh pulp.

Keywords: Mango, pulp, mycotoxin.

Área: Frutas y hortalizas

INTRODUCCIÓN

El mango es una fruta tropical altamente consumida en el mundo, presenta un alto contenido de vitaminas, minerales, un agradable sabor y aroma, con lo cual se convierte en una de las frutas más apetecibles y demandadas por los consumidores (Sumaya *et al.*, 2012). El mango no está exento de ser atacado por algunas enfermedades antes y durante la post cosecha del mismo, se han desarrollado algunos tratamientos para prevenir estas enfermedades (SAGARPA, 2011). Otro problema que enfrenta el mango fresco es su perecibilidad, ya que su tiempo de vida en almacenamiento es máximo de 5 a 7 días, para esto la ciencia y tecnología de alimentos ha volcado sus esfuerzos desde hace décadas en darle valor agregado a esta materia prima, transformándola en productos procesados con un tiempo de vida mucho más amplio, uno de estos productos son las pulpas, aunque durante el procesamiento también puede sufrir contaminación el producto por microorganismos, ya que el mango en fresco presenta el ataque de ciertos hongos generadores de Micotoxinas; sustancias producidas principalmente por los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium* (Méndez *et al.*, 2009).

Son numerosos los factores que pueden influir para la contaminación, entre estos están la resistencia genética del cultivo, las condiciones climatológicas caracterizadas por temperaturas y humedades

relativamente altas, condiciones de transporte y almacenamiento inadecuado y un secado deficiente. Por lo que la contaminación del producto puede ocurrir en cualquier punto de la cadena alimenticia, desde la cosecha, recolección, almacenaje, transporte, elaboración y conservación, este último punto es muy importante ya que, si los procesos de conservación como la pasteurización no han sido eficientes, podría haber presencia de micotoxinas y por ende producir una enfermedad de transmisión alimentaria (ETA) (Slaughter *et al.*, 2009). Existen métodos para el análisis de las micotoxinas en pulpas de fruta y han ido evolucionando en busca de una mayor precisión en la identificación de estas sustancias. La Cromatografía en Capa Fina (TLC) es una de las técnicas utilizada para la identificación de la presencia de micotoxinas (Oriols, 2011). Por lo que en este trabajo se realizó la evaluación de la posible presencia de micotoxinas a partir de frutos a los cuales se les identifico hongos del tipo *Aspergillus sp.* y *Penicillium sp.*

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal. Se utilizaron mangos (*Mangifera indica* L) frescos de la variedad manila, los cuales fueron obtenidos en el mercado “Barahona” ubicado en Rosario Castellanos s/n de Municipio de Salamanca, Gto., y muestras de Pulpa de mango procesada proveniente de la Empresa Frozen Pulps de México S.A de C.V ubicada en la Localidad de Aldama Municipio de Irapuato, Gto. En un estudio previo, se obtuvo el aislamiento y caracterización de hongos, logrando la identificación mediante microscopia de hongos *Aspergillus sp.* y *Penicillium sp.* presentes en la superficie del fruto (cascara) del mango fresco variedad Manila en descomposición a los 8 y 13 días de almacenamiento. A partir de estos resultados, se procedio a la identificación de micotoxina en pulpa de mango fresca y procesada.

Extracción de micotoxinas. De las pulpas del mango manila fresca (pruebas) y la pulpa procesada se pesaron 12.5 g de cada muestra y se colocaron en un matraz Erlenmeyer con tapa esmerilada. Se agregaron 12.5 mL de la mezcla metanol: agua (60:40), 0.5 g de NaCl y 10 mL de hexano, luego se agitó durante 30 minutos. Posteriormente se decantó y filtró con una manta de cielo, se tomó un volumen de 12.5 mL de la capa inferior (metanol: agua), mediante el empleo de pipeta y se colocó en una ampolla de decantación. A continuación, se agregó en el embudo 25 mL de cloroformo, se agitó durante un minuto con cuidado y se dejó decantar para la separación de fases. Se tomó la porción y esto se filtró con papel de filtro añadiendo Na₂SO₄. Se realizó otra extracción con cloroformo, nuevamente, lavando el papel de filtro con una porción del solvente y se reunieron los extractos de cada muestra, y se mantuvo en cámara de extracción hasta evaporar el solvente por completo. La resuspensión de las Micotoxinas se realizó con una solución de tolueno-acetonitrilo (49:1) para colocar las muestras en las placas de TLC.

Técnica para el método por TLC . Teniendo las muestras de las siete pulpas de mango cada una con las tres repeticiones, se obtuvieron 21 muestras, en las cuales se hizo la extracción con el procedimiento anteriormente mencionado. Cuando se evaporaron los solventes dejando los residuos secos, éstos fueron disueltos con 100 µL de tolueno: acetonitrilo (98:2) para obtener la fase estacionaria. Se prepararon 7 placas de un diámetro 10.5 cm x 21 cm, se dividió en una escala numérica de 1 cm de separación para colocar cada volumen de muestra en el punto de referencia. En las placas de TLC de sílica gel fueron inyectados los extractos con la cantidad de 5 µL y 10 µL, 2 µL del control que fue la aflatoxina B1 y 5 µL de extracto más 2 µL del control. Al finalizar la inyección se introdujeron en la fase móvil, la cual era cloroformo: acetona (9:1) en un vaso precipitado de 1000 mL y se dejaron correr. Al obtener las placas corridas fueron observadas en un foto documentador de luz ultravioleta.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Micotoxinas presentes en mango fresco y procesado. Como se señala en la Figura 4, en la placa 1 en las muestras A₁, A₂ y A₃ los cuales corresponden al mango de la prueba 1 (P1), en la placa 4 en las muestras C₁, C₂ y C₃ que corresponde al mango de la prueba 3 (P3), en la placa 7 las muestras E₁ y E₂ las cuales

corresponden al mango de la prueba 5 (P5) y en la placa 9 en las muestras F₁, F₂, F₃, G₁, G₂ y G₃ las cuales corresponden al mango de la prueba 6 (P6) y a la pulpa procesada proveniente de una empresa (P7) se puede observar que nuestro resultado es positivo y se concluye que si existe presencia de patulina en las pulpas de mango tanto fresca como procesada.

En las placas de TLC donde se usó el control de aflatoxina B1 no hubo corrida de las muestras por lo que no hubo presencia de esta micotoxina en las pulpas de mango tanto fresca como en la procesada. El 70 % de las muestras de pulpas de mango tanto fresca como procesada tienen presencia de patulina, por lo que el 30% faltante no presentó presencia de esta micotoxina. Los hongos que identificamos en los mangos frescos corresponden a las placas que presentaron micotoxinas excepto una pulpa, ya que no se identificó el hongo generador de micotoxinas pero si presento en las placas de TLC la presencia de estas.

Las manchas negras que se encuentran en el mango la mayoría de las veces se les atribuye a las enfermedades de poscosecha como es: la pudrición. Al realizar los análisis microbiológicos, e identificar los hongos presentes en los frutos de mango de la variedad Manila, se puede observar que estos no son pertenecientes a los síntomas de la pudrición. Esto debido a que los hongos productores de la enfermedad son: *Lasiodiplodia* y *Neofusicoccum*, lo cual fue reportado por Sandoval *et al.*, (2012).

Los resultados de estos análisis y observando las placas de TLC no son atribuidos a los problemas de poscosecha si no a la presencia de micotoxinas. La patulina y la aflatoxina son micotoxinas producidas por un gran número de diferentes hongos de los géneros *Penicillium* y *Aspergillus*. Pueden detectarse en las frutas, hortalizas y cereales; éstas se encuentran por la infección natural de estos hongos en numerosas frutas procesadas o sin procesar. El grado de contaminación está relacionado con el grado de daño en el fruto, por consiguiente, se han realizado numerosos análisis sobre la patulina en los zumos de frutas como la manzana (Codex Alimentarius, 2014). La interacción entre los microorganismos no solo afecta al desarrollo microbiano, sino también puede producir un efecto marcado en la síntesis de micotoxinas. Es así como el crecimiento de una micotoxina sobre un alimento puede inhibir el crecimiento de otra o por el contrario, puede aumentar su efecto tóxico. Es conocido que un hongo puede producir varias toxinas sobre un alimento o una misma toxina sobre varios alimentos. Los hongos pueden proliferar formando colonias donde los niveles de micotoxina pueden llegar a ser altos y su peligrosidad puede variar grandemente (Villacís, 2011).

Tabla I. se indican las claves usadas para las pulpas y sus repeticiones, así como las características de los mangos de donde se extrajo esta.

Prueba	Mango	Repetición	Características
P1		A1 A2 A3	Hubo presencia de pudrición al sexto día y al octavo día fue la extracción de la pulpa
P2		B1 B2 B3	Hubo presencia de pudrición al sexto día y al octavo día se extrajo la pulpa
P3		C1 C2 C3	Hubo presencia de pudrición a partir del noveno día y al treceavo día se extrajo la pulpa
P4		D1 D2 D3	Hubo presencia de estrés hídrico en la piel al sexto día, al treceavo empezó la pudrición solo de la punta y al quinceavo día se extrajo la pulpa
P5		E1 E2 E3	Hubo presencia de pudrición al séptimo día y al treceavo día se extrajo la pulpa
P6		F1 F2 F3	Hubo presencia de pudrición al quinto día y se extrajo la pulpa al octavo día
P7		G1 G2 G3	Pulpa conservada por pasteurización y congelada en presentación de 20 L

Debido a la alta incidencia de hongos del género *Aspergillus* y *Penicillium* en frutas y cereales, cuando se recoge y se almacena en condiciones de altas temperaturas y humedad, presencia de insectos, daños mecánicos y transporte inadecuado, es posible observar el aumento de los niveles de contaminación por micotoxinas y por consiguiente, de los productos derivados como en el trigo en el cual afirma Trombete *et al.*, (2013). La Patulina no se reduce por medio de la pasteurización o por el uso de conservadores, por eso en la pulpa procesada también hubo presencia de micotoxinas ya que Soriano *et al.*, (2002) analizó seis jugos industrializados en los cuales se encontraron trazas de esta en dos de ellos (33%), y cuatro restantes fueron negativos (67%).

Para evitar la presencia de la Patulina en la producción de jugos de frutas o cualquier producto derivado de esta lo recomendable es no utilizar aquellas visualmente dañadas y realizar un buen almacenamiento y cuidado de estas. La preocupación por la contaminación por micotoxinas, se ha intensificado en los últimos años, como puede verse por el aumento del número de publicaciones sobre la materia (Soriano *et al.*, 2002), ya que tienen un efecto importante en la salud de los humanos por la ingesta de esta micotoxina lo cual puede provocar algunos síntomas crónicos como lo son: genotóxica, neurotóxica, irununotóxica, irununosupresiva y mutagénica y como síntomas agudos: náuseas, vómito, hemorragia e inflamación intestinal, degeneración de las células del epitelio, agitación, convulsiones, edema, hiperemia e incluso problemas en el hígado, bazo, pulmones, riñones, cerebro y sistema nervioso en general. (Villacís, 2011)

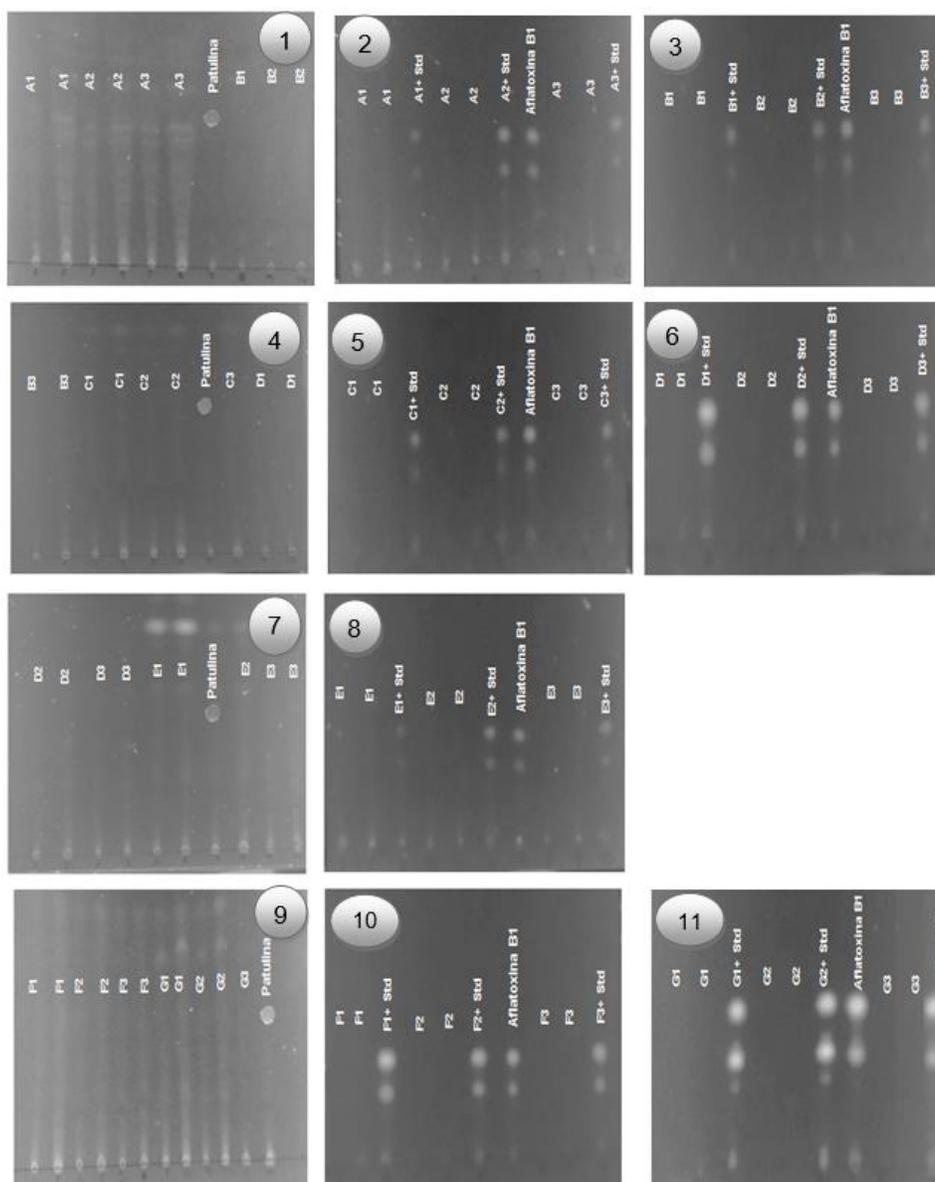


Figura 1. Detección de micotoxinas en pulpa de mango fresca y procesada por TLC

1. Pulpa P1 muestra A1, A2 y A3 a las cuales se les inyectó a cada punto 5 μ L y 10 μ L
4. Pulpa P3 muestra C1, C2 y C3 a las cuales se le inyectó a cada punto 5 μ L y 10 μ L
7. Pulpa P5 muestras E1 y E2 a las cuales se le inyectó a cada punto 5 μ L y 10 μ L
9. Pulpa P6 muestra F1, F2, F3, Pulpa P7 muestra G1, G2, G3 a las cuales se le inyectó a cada punto 5 μ L y 10 μ L

CONCLUSIÓN

De acuerdo con los resultados previos y con base la evaluación de micotoxinas se pudo identificar mediante micro cultivo y observar al microscopio a dos hongos generadores de Micotoxinas *Aspergillus sp* y *Penicillium sp* de acuerdo con su morfología y en el 70% de las muestras de pulpa tanto frescas como procesadas se encontró la presencia de la micotoxina Patulina, mientras que en ninguna de las pulpas se encontró la presencia de la micotoxina Aflatoxina.

BIBLIOGRAFÍA

- AGROMUEL. Pulpa de mango. Fecha de consulta 6 de Mayo del 2014. Disponible en línea en: <http://agrolmue.cl/pulpa-de-mango/>
- Alvarado Cepeda Yessica Abigail., 2013. Maduración y Frigoconservación de frutos de mango “Tommy Atkins” con diferentes dosis de maduración. Institución de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas. Edo. De México. Tesis de Maestría. 11p
- Arenas Guzmán Roberto. 2008. Micología Médica Ilustrada. México. 3era ed. Mcgrawn-Hill. 423p.
- Codex Alimentarius. Comité del codex sobre aditivos alimentarios y contaminantes de los alimentos. Fecha de consulta 3 de Julio del 2014. Disponible en línea en: ftp://ftp.fao.org/codex/meetings/CCFAC/CCFAC31/fa99_16s.pdf
- Méndez Albores Abraham y Moreno Martínez Ernesto. 2009. Las Micotoxinas: Contaminantes Naturales de los alimentos. Revista Ciencia. 1 p
- Oriols Pladevall Núria. 2011. Cromatografía en Capa Fina (TLC). Una herramienta útil para el Conservador-Restaurador. Fecha de consulta 5 de Julio. Disponible en línea en: http://unicum.cat/es/2011/06/cromatografia-en-capa-prima-tlc-una-eina-util-per-al-conservador-restaurador/?tmp_lang=es
- SAGARPA. 2011. IV Jornada de transferencia de tecnología en el cultivo de mango. Fecha de consulta 21 de Mayo del 2014. Disponible en línea en: http://www.fps.org.mx/divulgacion/index.php?option=com_content&view=article&id=818:iv-jornada-de-transferencia-de-tecnologia-en-el-cultivo-de-mango&catid=131:frutales&Itemid=408
- Sandoval Sánchez Maricarmen, Nieto Ángel Daniel, Sandoval-Islas J. Sergio, Téliz Ortiz Daniel, Orozco Santos Mario Y Silva Rojas H. Victoria. 2012. Hongos asociados a pudrición del pedúnculo y muerte descendente del mango (*Mangifera Indica* L.). *Agrociencia* 47: 61-73 2013. Volumen 47. No. 1. 60-70p.
- Slaughter. 2009. Métodos para el manejo de la maduración en mango. Universidad de California. Pág. 1-3
- Sumaya y col. 2012. Red de valor del mango y sus desechos con base en las propiedades nutricionales y funcionales. *Revista Mexicana de Agronegocios*. Volumen 30. 827p
- Trombete Felipe M., Saldanha Tatiana, Direito Glória M. y Fraga Marcelo E. 2013. Aflatoxinas y tricotecenos en trigo y derivados: incidencia de la contaminación y métodos de determinación. *Rev. Chil Nutr* Vol. 40. 181-185 p
- Villacís Reyes Cristina Soraya. 2011. Determinación del contenido de patulina en manzanas, jugos y néctares de manzana, por cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Quito. 14-20p