

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROALIMENTARIAS
ESCUELA DE AGRONOMÍA

Identificación de la capacidad toxigénica de *Aspergillus flavus* en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) y el efecto de la cocción del frijol sobre las micotoxinas

Dayana Marcela León Cortés

Tesis para optar al título profesional de Ingeniero Agrónomo con el grado de
Licenciado en Agronomía

2023

Identificación de la capacidad toxigénica de *Aspergillus flavus* en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) y el efecto de la cocción del frijol sobre las micotoxinas

Dayana Marcela León Cortés

Tesis para optar al título profesional de Ingeniero Agrónomo con el grado de Licenciado en
Agronomía

Universidad de Costa Rica

Facultad de Ciencias Agroalimentarias

Escuela de Agronomía

2023

Identificación de la capacidad toxigénica de *Aspergillus flavus* en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) y el efecto de la cocción del frijol sobre las micotoxinas

Dayana Marcela León Cortés

Tesis para optar al título profesional de Ingeniero Agrónomo con el grado de Licenciado en Agronomía



Maria Viñas Meneses Ph.D

DIRECTOR DE TESIS



Stefanny Campos Boza Lic.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL



Néstor Chaves Barrantes Dr.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL



Gabriel Vargas Asensio Ph.D

MIEMBRO DEL TRIBUNAL



Luis Gómez Alpízar Ph.D

DIRECTOR DE ESCUELA



Dayana Marcela León Cortés

SUSTENTANTE

DEDICATORIA

A mi abuela Marta, por su amor y apoyo incondicional en todo momento y circunstancia.

Que, con su ejemplo, me enseñó a ser una persona de fe, humilde y perseverante que se mantiene en pie en todo momento a pesar de la adversidad.

A mi familia y amistades, quienes me acompañaron y brindaron su cariño y apoyo incondicional en los momentos que más los necesité.

A la familia Sibaja Núñez, quienes me guiaron y aconsejaron con amor y fe.

AGRADECIMIENTOS

Un especial agradecimiento a mi Directora de tesis, la Dra. María Viñas, quien me dio su confianza y acompañamiento durante todo el proceso de la tesis. Me ayudó a crecer personal y profesionalmente.

A la Licda. Stefanny Campos, al M.Sc Diego Bogantes y al Lic. Kelvin Arce, por su gran apoyo, amistad, compañía y consejos dados en todo el proceso.

Al Dr. Néstor Chaves y al Dr. Gabriel Vargas, por su aporte profesional durante el proceso.

A Ricardo Monge, futuro colega, por su amistad y apoyo en este proceso.

Al Centro de Investigaciones en Granos y Semillas, y todos sus profesores y funcionarios que aportaron y acompañaron durante el desarrollo de la tesis.

A todas mis amistades, por todo su apoyo y por compartir su valioso tiempo en momentos de crisis y felicidad.

A mi familia, por su amor, escucha, consejos y apoyo incondicional.

A la Universidad de Costa Rica y su sistema de apoyo socioeconómico, por permitir mi desarrollo profesional.

A todas las personas que aportaron en la realización de este trabajo.

TABLA DE CONTENIDOS

DEDICATORIA.....	III
AGRADECIMIENTOS.....	IV
TABLA DE CONTENIDOS.....	V
LISTA DE CUADROS.....	VII
LISTA DE FIGURAS.....	VIII
LISTA DE ANEXOS.....	X
RESUMEN.....	XI
1. Introducción.....	1
2. Objetivos.....	4
2.1. Objetivo general.....	4
2.2. Objetivos específicos.....	4
3. Revisión de literatura.....	5
4. Metodología.....	9
4.1. Localización.....	9
4.2. Material Experimental.....	9
5. Procedimiento general.....	10
5.1. Determinación de la capacidad toxigénica de <i>Aspergillus flavus</i> en diferentes variedades de granos de frijol.....	11
5.2. Efecto de distintos métodos de cocción del frijol sobre la reducción de la contaminación de aflatoxinas.....	12
5.3. Efecto de distintos tiempos de remojo del frijol, previo a la cocción, sobre la reducción de la contaminación de aflatoxinas.....	15
6. Diseño experimental.....	16
6.1. Determinación de la capacidad toxigénica de <i>Aspergillus flavus</i> en diferentes variedades de granos de frijol.....	16
6.2. Efecto de distintos métodos de cocción del frijol sobre la reducción de la contaminación de aflatoxinas.....	16
6.3. Efecto de distintos tiempos de remojo del frijol previo a la cocción sobre la reducción de la contaminación de aflatoxinas.....	16
6.4. Análisis estadístico de los datos.....	17
7. Resultados.....	17

7.1. Capacidad toxigénica de <i>Aspergillus flavus</i> en diferentes variedades de granos de frijol	17
7.2. Efecto de distintos métodos de cocción del frijol sobre la reducción de la contaminación de aflatoxinas	22
7.3. Efecto de distintos tiempos de remojo del frijol previo a la cocción sobre la reducción de la contaminación de aflatoxinas	27
8. Discusión	30
8.1. Capacidad toxigénica de <i>Aspergillus flavus</i> en diferentes variedades de granos de frijol	30
8.2. Efecto de distintos métodos de cocción del frijol sobre la reducción de la contaminación de aflatoxinas	34
8.3. Efecto de distintos tiempos de remojo del frijol previo a la cocción sobre la reducción de la contaminación de aflatoxinas	36
9. Conclusiones	37
10. Recomendaciones	37
11. Referencias bibliográficas	38
12. Anexos	48

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Factores de calidad del grano de frijol comercial negro y rojo utilizado para las pruebas de cocción y remojo, Costa Rica, 2022.....	10
Cuadro 2. Tratamientos para determinar el efecto de la cocción del grano de frijol negro y rojo sobre la reducción de la contaminación por aflatoxinas. Laboratorio de Granos y Laboratorio de Micotoxinas del Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS) de la Universidad de Costa Rica. San Pedro de Montes de Oca, San José, Costa Rica, 2022.	14
Cuadro 3. Concentración de aflatoxinas totales y su reducción luego de diferentes tratamientos de cocción de los granos rojo y negro, previamente contaminados artificialmente con AFB1. Tratamientos de cocción: Olla normal (N), olla de presión por 20 min (P20) o 30 min (P30), y olla de cocimiento lento por 6 h (CL6) o 8 h (CL8). Laboratorio de Granos y Laboratorio de Micotoxinas del Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS) de la Universidad de Costa Rica. San Pedro de Montes de Oca, San José, Costa Rica, 2022.	25
Cuadro 4. Concentración de aflatoxinas totales y su reducción en granos de frijol negro o rojo luego de diferentes tiempos de remojo de los granos previamente enriquecidos con un patrón de AFB1 y cocinados con olla de cocimiento lento durante 6 h. Laboratorio de Micotoxinas del Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS) de la Universidad de Costa Rica. San Pedro de Montes de Oca, San José, Costa Rica, 2022.....	28

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Concentración de aflatoxinas totales producidas por *Aspergillus flavus* en granos molidos de 10 variedades de frijol común (*P. vulgaris* L.) con diferente color de grano: grano blanco (variedad: Surú), grano amarillo (variedad: Mantequilla), grano negro (variedades: Guaymí, Nambí, Brunca y Matambú) y grano rojo (variedades: Chánguena, Cabécar, Taynín y Generalito) producidas a nivel nacional; en una variedad de frijol tépari (*P. acutifolius*) manchado (variedad: Ingrato) y de maní (*Arachis hypogaea*). Análisis realizados luego de dos semanas de cultivo a 30 °C. Las barras muestran el intervalo de confianza, mientras que el punto negro se refiere al promedio de cuatro repeticiones. Cada punto rojo equivale al valor obtenido en cada repetición. Letras distintas muestran diferencias significativas entre variedad. Laboratorio de Granos y Laboratorio de Micotoxinas del Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS) de la Universidad de Costa Rica. San Pedro de Montes de Oca, San José, Costa Rica, 2022..... 18
- Figura 2.** Diagrama biplot según el análisis de componentes principales tomando en cuenta la concentración de aflatoxinas producidas por el hongo *A. flavus* y los polifenoles presentes en granos molidos de 10 variedades de frijol común (*P. vulgaris* L.) con diferente color de grano: grano blanco (variedad: Surú), grano amarillo (variedad: Mantequilla), grano negro (variedades: Guaymí, Nambí, Brunca y Matambú) y grano rojo (variedades: Chánguena, Cabécar, Taynín y Generalito); y en una especie de frijol tépari (*P. acutifolius*) café manchado (variedad: Ingrato). Análisis realizados luego de dos semanas a 30 °C. Los ejes indican la significancia de la explicación de los datos. El símbolo más pequeño equivale al valor obtenido en cada repetición, mientras que el símbolo más grande, representa el promedio de cada variedad. El círculo alrededor de los datos de las variedades muestra el 95% de significancia. Cada flecha muestra la correlación respecto a las aflatoxinas y su longitud muestra la representatividad del polifenol por variedad. Laboratorio de Granos y Laboratorio de Micotoxinas del Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS) de la Universidad de Costa Rica. San Pedro de Montes de Oca, San José, Costa Rica, 2023..... 20
- Figura 3.** Correlación de la concentración de polifenoles (catequina, ácido 4-Hidroxibenzoico, quercetina, ácido protocatecuico, kaempferol, epicatequina e isoquercetina) y aflatoxinas presentes en granos molidos de 10 variedades de frijol común (*P. vulgaris* L.) con diferente color de grano: grano blanco (variedad: Surú), grano amarillo (variedad: Mantequilla), grano negro (variedades: Guaymí, Nambí, Brunca y Matambú) y grano rojo (variedades: Chánguena, Cabécar, Taynín y Generalito); y en la especie de frijol tépari (*P. acutifolius*) café manchado (variedad: Ingrato). Laboratorio de Granos y Laboratorio de Micotoxinas del Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS) de la Universidad de Costa Rica. San Pedro de Montes de Oca, San José, Costa Rica, 2023. 21
- Figura 4.** Correlación de la concentración de polifenoles catequina (A) y ácido 4-hidroxibenzoico (B), y las aflatoxinas presentes en granos molidos de 10 variedades de frijol común (*P. vulgaris* L.) con diferente color de grano: grano blanco (variedad: Surú), grano

amarillo (variedad: Mantequilla), grano negro (variedades: Guaymí, Nambí, Brunca y Matambú) y grano rojo (variedades: Chánguena, Cabécar, Tayní y Generalito); y en la especie de frijol tépari (*P. acutifolius*) café manchado (variedad: Ingrato). Laboratorio de Granos y Laboratorio de Micotoxinas del Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS) de la Universidad de Costa Rica. San Pedro de Montes de Oca, San José, Costa Rica, 2023..... 22

Figura 5. Porcentaje de reducción de aflatoxinas totales en granos y caldo de frijol rojo (A) y negro (B) luego de diferentes tratamientos de cocción de los granos previamente enriquecidos con AFB1. Tratamientos de cocción: Olla normal (N), olla de presión por 20 min (P20) o 30 min (P30), y olla de cocimiento lento por 6 h (CL6) o 8 h (CL8). Las barras muestran el intervalo de confianza, mientras que el punto negro se refiere al promedio de cuatro repeticiones. Cada punto rojo equivale al valor obtenido en cada repetición. Letras distintas muestran diferencias significativas entre tratamientos. Laboratorio de Granos y Laboratorio de Micotoxinas del Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS) de la Universidad de Costa Rica. San Pedro de Montes de Oca, San José, Costa Rica, 2022. 26

Figura 6. Temperatura de cocción en olla normal (A), cocimiento lento (B) y presión (C) de granos de frijol rojo y negro utilizados para las pruebas de cocción y remojo. El registro de las temperaturas en cocimiento lento inició una vez encendida, en la olla normal y olla de presión inició una vez se alcanzó la ebullición del agua y la presión máxima en las respectivas ollas. Laboratorio de Procesamiento Agrícola del Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS) de la Universidad de Costa Rica. San Pedro de Montes de Oca, San José, Costa Rica, 2022..... 27

Figura 7. Porcentaje de reducción de aflatoxinas totales en granos y caldo de frijol rojo (A) o negro (B) luego de diferentes tiempos de remojo de los granos previamente enriquecidos con AFB1 y cocinados con olla de cocimiento lento durante 6 h. Las barras muestran el intervalo de confianza, mientras que el punto negro se refiere al promedio de cuatro repeticiones. Cada punto rojo equivale al valor obtenido en cada repetición. Letras distintas muestran diferencias significativas entre tratamiento. Laboratorio de Micotoxinas del Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS) de la Universidad de Costa Rica. San Pedro de Montes de Oca, San José, Costa Rica, 2022..... 29

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Aflatoxinas totales de los testigos absolutos de las variedades de frijol para determinar la capacidad toxigénica de <i>A. flavus</i> . Luego de la incubación durante 15 días a 30°C con agua estéril en lugar de esporas.	48
Anexo 2. Resultados de la encuesta realizada durante el primer semestre del 2023 con una población de 184 personas respecto al consumo de frijol en grano (A), preferencia de coloración del frijol (B), forma de adquirirlo (C), cantidad de grano al cocinar (D), uso del remojo previo a la cocción (E) y el tipo de olla para su cocción (F).....	49
Anexo 3. Aflatoxinas totales de los granos de frijol comerciales utilizados para determinar el efecto de la cocción y el remojo.	49
Anexo 4. Concentración de aflatoxinas totales en frijol contaminado con esporas de <i>A. flavus</i> , luego de incubación por 8 o 15 días a diferentes temperaturas. Laboratorio de Micotoxinas del Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS) de la Universidad de Costa Rica. San Pedro de Montes de Oca, San José, Costa Rica, 2022.	50
Anexo 5. Porcentaje de recuperación de aflatoxinas totales en frijol rojo contaminado de forma artificial con un patrón puro de AFB1 en benceno:acetonitrilo (98:2) y preparado con diferentes disolventes (agua y metanol), Laboratorio de Micotoxinas del Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS) de la Universidad de Costa Rica. San Pedro de Montes de Oca, San José, Costa Rica, 2022.....	50
Anexo 6. Porcentaje de recuperación de aflatoxinas totales (%) en grano de frijol enriquecido con un patrón de AFB1 (500 ng/ml) puro, contemplando el efecto de dilución en la cocción, Laboratorio de Micotoxinas del Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS) de la Universidad de Costa Rica. San Pedro de Montes de Oca, San José, Costa Rica, 2022.	51

RESUMEN

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es una de las leguminosas más consumidas en América Latina por su alto aporte nutricional; sin embargo, puede ser susceptible a la contaminación por micotoxinas. Las micotoxinas son metabolitos secundarios que pueden ser producidas por diversos géneros de hongos (*Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*). Específicamente se conoce que *Aspergillus flavus* es una de las especies con mayor capacidad toxigénica al producir las aflatoxinas, uno de los tipos de micotoxinas más importantes desde el punto de vista de la salud pública. Por esto, en este trabajo se determinó la capacidad toxigénica de *A. flavus* en diferentes variedades de frijol (Brunca, Cabécar, Chánguena, Generalito, Guaymí, Ingrato, Mantequilla, Matambú, Nambí, Surú y Tayní), y el efecto de distintos métodos de cocción (olla normal, presión y cocimiento lento) y tiempos de remojo del frijol sobre la reducción de la contaminación del grano por aflatoxinas. Se determinó que la capacidad toxigénica de *A. flavus* tiende a ser mayor en las variedades de color negro y menor en las variedades de color rojo. Las variedades rojas se asociaron a polifenoles del grupo de los flavonoides y ácidos hidroxibenzoicos, correlacionados negativamente con las aflatoxinas ($p < 0,0094$), principalmente la catequina y el ácido 4-hidroxibenzoico. El mayor porcentaje de reducción de la contaminación del grano por aflatoxinas se observó con cocimiento lento, tanto en frijol rojo como negro, aunque la reducción fue mayor en frijol negro. No se observó un efecto del remojo previo a la cocción sobre la reducción de la contaminación del grano por aflatoxinas. Se concluye que *A. flavus* es menos toxigénico en granos de frijol con presencia de flavonoides y ácidos hidroxibenzoicos; además el tiempo prolongado de exposición de los granos de frijol contaminados a una fuente de calor tiene efecto en la reducción de aflatoxinas.

1. Introducción

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es una de las leguminosas más consumidas en América Latina por su alto aporte nutricional como fuente de proteína, minerales, antioxidantes y vitaminas; por lo que es un grano que aporta en la seguridad alimentaria de esta región (Broughton et al., 2003; Gepts et al., 2008).

Este grano puede ser susceptible a la contaminación de toxinas producidas por distintos hongos (Rojas et al., 2021). Estas sustancias son conocidas como micotoxinas y son metabolitos secundarios sintetizados por algunas especies de hongos que pueden encontrarse a lo largo de toda la cadena de producción agro-alimentaria, desde el campo hasta los alimentos procesados. Estas toxinas pueden llegar a causar efectos adversos en la salud de los humanos al ser altamente toxigénicas y carcinogénicas (Suman, 2021).

En Costa Rica se cuenta con los Decretos 27980-S y 27964, que regulan el nivel máximo de aflatoxinas permitidos en distintos granos (maní, maíz, arroz, frijol, trigo y otros cereales, oleaginosas y leguminosas en general) (Presidencia de la República, & Ministerio de Salud, 1999), debido a la importancia de ingerir alimentos de buena calidad y con un manejo sanitario adecuado. Específicamente, el Decreto Ejecutivo 27980-S es el que indica el nivel máximo de aflatoxinas permitido en frijol (20 µg/kg) (Presidencia de la República, & Ministerio de Salud, 1999). Lo anterior, se considera en investigaciones científicas realizadas que han mostrado que la alta contaminación de alimentos por aflatoxinas tiene un efecto cancerígeno y, por ende, es aconsejable una regulación de la cantidad de estas toxinas en los alimentos (Alves Dos Santos-Ciscon et al., 2019; Castillo & Zambrano, 2020; Granados-Chinchilla et al., 2017; Marroquín et al., 2014; Suman, 2021).

La determinación de la capacidad toxigénica de hongos en determinado producto agrícola, permite predecir la probabilidad de contaminación de ese producto con micotoxinas (Suman, 2021). Debido a lo anterior, y a que el frijol es un alimento de consumo habitual, se han realizado estudios, tales como el uso de sustrato con base en este grano para analizar la producción de micotoxinas por parte de distintos aislamientos de hongos toxigénicos

(Hitokoto et al., 1981); no obstante, actualmente no existen estudios de la capacidad toxigénica de *A. flavus* en las variedades de frijol comercializadas en Costa Rica.

Las variedades de interés comercial a nivel nacional como las negras: Nambí, Guaymí, Brunca y Matambú; las rojas: Cabécar, Chánguena y Taynín; y la blanca: Surú, fueron mejoradas para darles una mayor adaptabilidad, mejor potencial de rendimiento, buenas características agronómicas y resistencia en algún grado a los principales patógenos de importancia económica; con excepción de las variedades Mantequilla (amarilla), Ingrato (café) y Generalito (roja) que no han sido mejoradas, pero de igual forma son importantes en la producción nacional. Además, la variedad Cabécar y Nambí son las más producidas a nivel nacional.

La variedad de frijol es un factor que podría influir en la capacidad toxigénica de los hongos, ya que la composición física (materia seca y humedad) y química (proteína, fibra y grasa) puede variar. Por ende, la disponibilidad e interacción de los distintos compuestos del grano de frijol podrían contribuir o inhibir la producción de aflatoxinas por parte del hongo (Castillo & Zambrano, 2020). Además de componentes como carbohidratos, vitaminas y fibra soluble, el frijol produce metabolitos secundarios como los compuestos fenólicos que le confieren al grano las propiedades antioxidantes antes mencionadas; estos polifenoles han sido estudiados en este grano por sus efectos antibacteriales favorables y se ha encontrado que pueden diferir según la coloración del grano (Yang et al., 2018).

Debido a las implicaciones que tienen las micotoxinas en la salud humana, es necesario controlar cada paso de la cadena de producción y comercialización (campo, procesamiento y almacenamiento) para propiciar condiciones idóneas que mitiguen la contaminación por micotoxinas del producto final (Suman, 2021). Sin embargo, la prevención de esta contaminación suele ser insuficiente, por lo que es necesario la aplicación de algún método de detoxificación de micotoxinas como el tratamiento térmico, aunque, según las condiciones utilizadas, este puede no ser efectivo y generar cambios en la composición de los alimentos (Jard et al., 2011).

Se conoce que algunas micotoxinas son estables hasta cierto grado bajo condiciones usuales de cocción; sin embargo, la temperatura y el tiempo de cocimiento pueden llegar a

afectar su concentración (Ramos et al., 2020). Asimismo, la contaminación inicial, la concentración y el tipo de micotoxina, el tiempo y la temperatura de cocción, el contenido de humedad, entre otros factores, pueden tener un rol significativo en la degradación de las micotoxinas (Jard et al., 2011).

Debido a lo anterior, en esta investigación se pretende determinar la capacidad toxigénica de *Aspergillus flavus* en diferentes variedades de granos de frijol y estudiar el impacto de diferentes métodos de cocción y tiempos de remojo de este grano sobre las aflatoxinas.

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

Determinar la capacidad toxigénica de *Aspergillus flavus* en diferentes variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), y el efecto de la cocción y remojo sobre la concentración de las aflatoxinas totales presentes, para conocer la probabilidad de contaminación por micotoxinas del grano.

2.2. Objetivos específicos

- 1.** Cuantificar la capacidad toxigénica de un aislamiento de *Aspergillus flavus* en 10 variedades de frijol para determinar la susceptibilidad de contaminación por aflatoxinas del grano.
- 2.** Comparar el efecto de distintos métodos de cocción del frijol comercial negro y rojo, para conocer su impacto en la concentración de aflatoxinas totales presentes en los granos.
- 3.** Comparar el efecto de diferentes tiempos de remojo del frijol comercial negro y rojo previo a su cocción, para conocer su impacto en la concentración de aflatoxinas totales presentes en los granos.

3. Revisión de literatura

El frijol es una leguminosa de gran relevancia por su aporte nutricional, diversidad y facilidad de obtención en el mercado nacional. Es un grano con alto contenido de proteína vegetal y que a nivel comercial se pueden encontrar en distintos tamaños, colores, espesor del caldo y sabor; sin embargo, para que el aporte nutricional del frijol se mantenga, es importante asegurar su inocuidad y proporcionar las condiciones de almacenamiento idóneas en toda la cadena agroalimentaria (Castillo & Zambrano, 2020).

En Costa Rica, la producción de frijol se desarrolla principalmente en tres regiones geográficas (Chorotega, Huetar Norte y Brunca). Sin embargo, al pasar los años se ha observado una disminución considerable en el área destinada a la producción de este grano, por lo que no es suficiente para abastecer la demanda nacional. Se conoce que la cosecha en Costa Rica solamente abastece el 25% del total necesario y, por lo tanto, se debe importar un 75% de frijol para terminar de cubrir la demanda (Valerín, 2019).

Los granos de esta leguminosa son susceptibles a la contaminación por micotoxinas (Rojas et al., 2021), las cuales son metabolitos secundarios sintetizados por distintas especies de varios géneros de hongos toxigénicos que tienen la capacidad de colonizar una amplia gama de productos agrícolas (Garrido-Ramírez et al., 2018). Las principales micotoxinas de relevancia para la salud pública son: aflatoxinas, fumonisinas, zearalenona, patulina, ocratoxinas y tricotecenos (Omotayo et al., 2019). La mayoría de estas toxinas son producidas por tres géneros de hongos: *Fusarium*, *Penicillium* y *Aspergillus*; específicamente, *Aspergillus flavus*, aparte de ser un contaminante común en los sistemas agrícolas, es la principal especie que produce aflatoxinas, uno de los tipos de micotoxinas más importantes desde el punto de salud pública (Abdolshahi et al., 2018; Troestch & Vega, 2019).

La seguridad alimentaria es cada vez más crítica en países subdesarrollados, lo que incrementa la malnutrición a causa de la contaminación de los productos alimenticios por micotoxinas, específicamente las aflatoxinas producidas por el hongo *A. flavus* (Kumari et al., 2021). Lo anterior se puede asociar a una deficiente legislación y una baja tecnificación

agrícola, en conjunto con un alto desconocimiento por parte de las poblaciones sobre las consecuencias de estas toxinas (Serrano-Colli & Cardona-Castro, 2015).

El impacto que tienen las aflatoxinas en la salud humana ha sido sujeto de estudio, se ha identificado que estas tienen efectos carcinogénicos, mutagénicos y teratogénicos. Además, pueden afectar el rendimiento de los cultivos (Divakara et al., 2017; de Luna-López et al., 2013; Rojas et al., 2021). Lo anterior como consecuencia de la producción de estas toxinas en distintos ambientes según factores como la composición, el daño físico y el agua disponible del grano, la humedad relativa, la temperatura, el oxígeno y vectores como los insectos (Calisaya & Pinto, 2018).

Luna-López et al. (2013), evaluaron la resistencia a las aflatoxinas de once genotipos de maíz, se realizó la inoculación de los granos con esporas de dos cepas toxigénicas de *A. flavus*. Al considerar la colonización de *A. flavus* en el grano y la acumulación de las aflatoxinas, los autores observaron que algunos genotipos de maíz fueron más resistentes a la infección por *A. flavus*. Además, la concentración de aflatoxina B1 (AFB1) fue mucho mayor en comparación con las aflatoxinas B2, G1 y G2. Por último, concluyen que la resistencia se puede atribuir a barreras físicas y compuestos antifúngicos presentes en los genotipos más resistentes (de Luna-López et al., 2013). Respecto a esta resistencia, las plantas sintetizan metabolitos secundarios como mecanismo de defensa a diversos patógenos, en los que sobresalen los polifenoles, particularmente los flavonoides y ácidos fenólicos que tienen actividad antifúngica (Acosta-Estrada et al. 2014; García-Mateos et al. 2021; Guzmán et al. 2002; Palou et al. 2008; Zamorano et al. 2018).

Los polifenoles y flavonoides (fitonutrientes) tienen mecanismos moleculares que inhiben las micotoxinas por su actividad biológica en los alimentos como: las propiedades antioxidantes, la habilidad de modificar la membrana fúngica, la inhibición de la actividad enzimática y la regulación de la expresión de genes involucrados en la síntesis de micotoxinas (Hamad et al., 2023). Se recomienda el uso de extractos naturales de plantas que contengan estos polifenoles para inhibir tanto el crecimiento del hongo como la producción de las micotoxinas (Hamad et al., 2023). Hay ciertos polifenoles que han sido objeto de estudio en el frijol común en cuanto a su presencia y capacidad antimicotoxigénica (Hamad et al., 2023; Yang et al. 2018) como los ácidos cafeico, ferúlico, sinápico y p-cumárico que pertenecen al

grupo de los ácidos hidroxicinámicos, y el ácido gálico, ácido 4-hidroxibenzoico y ácido protocatecuico que pertenecen al grupo de los ácidos hidroxibenzoicos (Belščak-Cvitanović et al. 2018; Weber & Passon, 2019; Yang et al. 2018). También se asocian flavonoides como la quercetina, isoquercetina y el kaempferol que pertenecen al subgrupo de los flavonoles; y la catequina e isocatequina al subgrupo de los flavanoles (Belščak-Cvitanović et al. 2018; Yang et al. 2018).

En otra investigación, se estudió el potencial y la habilidad toxigénica de distintas cepas de *Fusarium poae* y *Fusarium avenaceum* en granos de arroz, y se determinó el efecto de estas cepas y de distintos sustratos en la cantidad y tipo de micotoxinas producidas *in vitro* (Vogelgsang et al., 2008). Para esto, inocularon arroz estéril con suspensiones de conidias de cada una de las cepas en estudio, e inocularon granos de maíz partidos, y granos enteros de trigo, arroz y avena. Analizaron el contenido de las micotoxinas moniliformina, tricotecenos A y B, eniatina A, A1, B y B1, y beauvericina con cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC MS/MS) (Vogelgsang et al., 2008). Los autores observaron que la concentración de una misma micotoxina puede aumentar dependiendo de la matriz utilizada (Vogelgsang et al., 2008). Asimismo, para obtener resultados certeros en estudios de capacidad toxigénica *in vitro* se deben proporcionar las condiciones adecuadas durante la incubación, ya que, puede influir directamente en la producción de las aflatoxinas por parte del hongo (Okereke, 2020).

Como aporte de un plan de Seguridad Alimentaria e Inocuidad del Gobierno Nacional de Ecuador, se trabajó en la determinación del contenido total de aflatoxinas en frijol comercial de diferentes variedades (Castillo & Zambrano, 2020). Según el estudio, hay distintos factores que pueden influir en la presencia o ausencia de aflatoxinas en el grano: el manejo desde campo, la humedad de almacenamiento y la variedad, ya sea frijol negro o rojo (Castillo & Zambrano, 2020). En ese sentido, se determinó la concentración de aflatoxinas totales en granos de frijol de variedades comerciales, mejoradas y silvestres; y se observó que los granos provenientes de variedades silvestres tenían un contenido de humedad y una concentración de aflatoxinas más bajas, seguidas de las variedades comerciales y, por último, de las variedades mejoradas, que presentaron los valores más altos (Peña-Betancourt & Conde-Martínez, 2012).

Existen estrategias para reducir la contaminación de granos por micotoxinas, por ejemplo, tratamientos físicos que pueden reducir su presencia en los granos o transformarlos en metabolitos con una capacidad toxigénica menor (Roig, 2013). Los métodos físicos se basan en eliminar o inactivar la micotoxina manteniendo las propiedades físicas y el valor nutritivo del alimento sin generar productos tóxicos (Roig, 2013). En distintas muestras comerciales de arroz, se evaluó el efecto de la cocción sobre las micotoxinas, para ello se utilizó una cocción análoga a la doméstica y un exceso de agua. Su análisis posterior a la cocción arrojó que la mayoría de las muestras presentaron una reducción en la concentración de micotoxinas (beauvericina y eniatina A, A1, B y B1), pero no se eliminaron por completo (Roig, 2013).

En otro estudio, se observó que *Aspergillus* es el hongo más prevalente productor de micotoxinas en los alimentos y por esto, se realizó un inventario de posibles micotoxinas producidas por especies de *Aspergillus* en asociación con los tipos de frijoles secos más populares en Brasil (Alves Dos Santos-Ciscon et al., 2019). Lo anterior, mediante la caracterización del potencial toxigénico por medio de la detección de genes implicados en la biosíntesis de las aflatoxinas. Se obtuvo que las especies de *Aspergillus* que contienen grupos de genes toxigénicos se encuentran con frecuencia en frijoles producidos en Brasil, lo que sugiere que hay un riesgo potencialmente alto de ingesta diaria de micotoxinas por parte de la población (Alves Dos Santos-Ciscon et al., 2019). Esta última investigación plantea la necesidad de realizar estudios que puedan dilucidar la capacidad toxigénica de *Aspergillus* en frijol y así contribuir con estrategias para prevenir la contaminación por toxinas en este grano.

Hasta ahora no existen estudios en frijol común que evalúen el efecto de la cocción sobre la concentración de aflatoxinas en el grano. Sin embargo, hay un precedente respecto a la capacidad toxigénica de *A. flavus* en diferentes variedades consumidas y comercializadas en Costa Rica, como lo son guaymí y matambú (variedades negras), cabécar y taynín (variedades rojas) y surú (variedad blanca); no obstante, no observó diferencias significativas del grado de contaminación por aflatoxinas entre las variedades (Sancho, 2016).

4. Metodología

4.1. Localización

La investigación se desarrolló en el Laboratorio de Granos y Laboratorio de Micotoxinas del Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS) de la Universidad de Costa Rica. San Pedro de Montes de Oca, San José, Costa Rica. Localización: 9.940079095005279, -84.04844744587285; altitud media: 1205 m.s.n.m.

4.2. Material Experimental

El material experimental fue representativo a las variedades de frijol que se comercializan a nivel nacional. Para llevar a cabo el primer objetivo específico, se utilizó un aislamiento toxigénico de *Aspergillus flavus*, obtenido a partir de frijol cultivado en Costa Rica (Carranza-Mesén et al., 2022). Además, se utilizaron 11 variedades de grano de frijol aportadas por diferentes unidades de la Universidad de Costa Rica. De la Estación Experimental Agrícola Fabio Baudrit Moreno (EEAFBM) se obtuvieron las siguientes variedades: Nambí (negro), Generalito y Chánguena (rojo), Mantequilla (amarillo), Surú (blanco) e Ingrato (manchado). Del Laboratorio de Semillas del CIGRAS se obtuvieron las variedades Brunca y Matambú (negro) y Tayní (rojo). Mientras que las variedades Guaymí (negro) y Cabécar (rojo) fueron facilitadas por el Laboratorio de Micotoxinas del CIGRAS.

Para las pruebas de cocción y remojo del frijol (segundo y tercer objetivo específico, respectivamente), se utilizó frijol negro y rojo comercializado a nivel nacional con un tiempo de cocción ≤ 95 min y los factores de calidad indicados en el cuadro 1.

Cuadro 1. Factores de calidad del grano de frijol comercial negro y rojo utilizado para las pruebas de cocción y remojo, Costa Rica, 2022.

Factor de calidad	Porcentaje (%)	
	Frijol negro	Frijol rojo
Grano contrastante	0,24	0,23
Grano quebrado	0,28	0,23
Grano mal formado	0,90	0,45
Grano sin cáscara	0,38	0,75
Impureza	0,00	0,00
Humedad	≤ 16	≤ 16
Infestación	0	0

5. Procedimiento general

Para determinar la capacidad toxigénica de *A. flavus* en frijol, el hongo se cultivó en un sustrato con base en las diferentes variedades de granos de frijol mencionados anteriormente; y para el análisis de contenido de los polifenoles, se utilizó el mismo sustrato preparado con base en las variedades. Mientras que, para determinar el efecto de diferentes tipos y tiempos de cocción, así como tiempos de remojo sobre la reducción de la contaminación por aflatoxinas, se utilizó un patrón de aflatoxina B1 (AFB1) y granos de frijol negro y rojo comercial.

La toma de datos de la concentración de aflatoxinas y del contenido de polifenoles se realizó una vez concluido cada experimento mediante los protocolos de extracción y cuantificación de las aflatoxinas totales y de polifenoles, respectivamente. Además, para la determinación del efecto de distintos métodos de cocción y diferentes tiempos de remojo sobre la reducción de la contaminación por aflatoxinas, también se cuantificó la concentración inicial de aflatoxinas totales en el frijol comercial negro y rojo.

5.1. Determinación de la capacidad toxigénica de *Aspergillus flavus* en diferentes variedades de granos de frijol

Para activar el aislamiento de *A. flavus*, se tomaron esporas del hongo almacenadas a -80°C y se cultivaron de la siguiente manera: dentro de una cámara de bioseguridad con instrumentación y equipo desinfectado, se agregó 10 μl de la solución de esporas de *A. flavus* en placas de Petri con medio Czapeck Yeast Extract Agar (CYA) (PhytoTech Labs). Las placas se sellaron con papel Parafilm y se colocaron en una incubadora a 28°C por aproximadamente una semana, hasta observar crecimiento de micelio suficiente para la extracción de esporas. Se observaron las características y el crecimiento del micelio con el fin de corroborar que coincidan con la morfología de *A. flavus*, basado en la metodología de Klich (2002).

La preparación de la solución de esporas se realizó de la siguiente manera: en un tubo Falcon (15 ml) se agregó 4 ml de agua destilada previamente autoclavada dentro de una cámara de bioseguridad. Con ayuda de un sacabocados, se extrajeron discos de micelio de las placas Petri inoculadas y se adicionaron al tubo. Se agitó vigorosamente y se transfirió la totalidad de la solución sin los discos a un tubo nuevo. Se realizó el ajuste de la concentración de esporas a 500 esporas/ μl .

El medio de cultivo con base en frijol para la determinación de la capacidad toxigénica, se preparó de la siguiente manera: se tomaron 25 g de grano molido con un tamaño de partícula de 2 mm (Mesh N° 10) y se colocó en frascos de vidrio para licuadora de 300 ml, se agregó 55 ml de agua destilada y se mezcló. Luego, los frascos se taparon con papel aluminio y se autoclavaron a una temperatura de 121°C durante 25 minutos. Además, de forma simultánea, se realizó el mismo procedimiento para preparar el medio de cultivo con base en maní (control positivo).

Luego, los 25 g de frijol molido, previamente autoclavados, se inocularon con 2 ml de la solución de esporas de *A. flavus* (500 esporas/ μl) y se incubaron en condiciones óptimas para la producción de aflatoxinas (30°C por dos semanas). El control absoluto consistió en agregar 2 ml de agua destilada previamente autoclavada en lugar de la solución que contiene las esporas, mientras que el control positivo consistió en 25 g de maní molido previamente autoclavado e inoculado con 2 ml de la solución de esporas de *A. flavus* (500 esporas/ μl).

Por último, se realizó la cuantificación de aflatoxinas totales mediante el método oficial de la AOAC 991.31 basado en columnas de inmunoafinidad (AflaTest®, VICAM) (Latimer, 2016). Se realizaron cuatro repeticiones por variedad de frijol, incluyendo los controles absoluto y positivo (96 frascos en total). La unidad experimental estuvo compuesta por cada frasco inoculado con las esporas.

5.1.2. Análisis de polifenoles presentes en diferentes variedades de granos de frijol

La extracción de polifenoles se realizó utilizando los granos en las mismas condiciones que para la determinación de la capacidad toxigénica: se tomaron 25 g de grano molido (tamaño de partícula de 2 mm, mesh N° 10) y se colocó en frascos de vidrio para licuadora de 300 ml, se agregó 55 ml de agua destilada y se mezcló. Luego, los frascos se taparon con papel aluminio y se autoclavaron a una temperatura de 121°C durante 25 minutos. Luego, a los 25 g de frijol molido, previamente autoclavados, se les agregó 2 ml de agua destilada previamente autoclavada y se incubaron a 30°C por dos semanas. Posterior a la incubación, se liofilizó la totalidad de cada muestra durante tres días. Por último, se realizó la extracción y cuantificación de las dos fracciones de polifenoles (solubles e insolubles) mediante el método de extracción y cuantificación de polifenoles por medio de cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (HPLC/MS) descrito por Lux et al. (2020).

5.2. Efecto de distintos métodos de cocción del frijol sobre la reducción de la contaminación de aflatoxinas

Como información complementaria, se implementó una encuesta para conocer la preferencia de consumo y la forma de preparación del grano de frijol actualmente en los hogares costarricenses. Se realizó por medio de los formularios de Google y se compartió por distintos medios. El formulario está disponible en <https://forms.gle/3Gbt7mgEtY9XH3ZU9>

5.2.1. Pruebas preliminares:

a) Contaminación natural de los granos con aflatoxinas:

Se realizaron pruebas para contaminar los granos de forma natural con aflatoxinas utilizando esporas de *A. flavus* de la siguiente manera: a) se agregó 250 g de grano de frijol entero en un frasco de vidrio; b) se esterilizó los granos con gas cloro (Lindsey et al., 2017); c) se le agregó una concentración y cantidad conocida de solución de esporas; y d) se extrajo y cuantificó las aflatoxinas a los ocho y 15 días de incubación como se indicó en la sección 5.1.

b) Determinación del disolvente adecuado para la contaminación artificial de los granos de frijol:

Se realizaron pruebas de contaminación artificial de los granos utilizando un patrón de aflatoxina B1 (AFB1) (Sigma-Aldrich, USA) disuelto en benceno:acetonitrilo (98:2) (patrón puro) o diluido en agua o metanol al 100%. Se utilizó 80 g de grano de frijol rojo entero al cual se le agregó 30 ml del patrón disuelto en el solvente respectivo a una concentración final de 100 µg/kg. El patrón puro se añadió a 25 g de grano a una concentración teórica final de 100 µg/kg. Luego de 16 horas, se realizó la extracción y cuantificación de aflatoxinas totales como se indicó en la sección 5.1.

c) Determinación del porcentaje de recuperación de aflatoxinas a partir de granos de frijol:

Se determinó el porcentaje de recuperación de las aflatoxinas a partir de frijol rojo y negro, sin cocción. Para ello, se enriqueció por duplicado 250 g de grano de frijol rojo o negro con un patrón de AFB1 disuelto en benceno:acetonitrilo (98:2) a una concentración final de 25 µg/kg y se dejó secar durante 30 min; luego se añadió 1,25 L de agua; y se dejó en remojo durante 30 min. Luego de este tiempo, se separó el grano del caldo, y la muestra de grano se homogeneizó mediante maceración con mortero. Se tomó una muestra de 25 g de grano o caldo para la extracción y cuantificación de las aflatoxinas totales utilizando la metodología indicada en la sección 5.1. Posteriormente, se definió el porcentaje de recuperación de aflatoxinas totales mediante la siguiente fórmula: [Concentración final] *

100% / [Concentración inicial (25 µg/kg)]. El porcentaje de recuperación del frijol rojo o negro se tomó en cuenta para los cálculos.

5.2.2. Pruebas de cocción

Para determinar el efecto de la cocción sobre la reducción de la contaminación por aflatoxinas, se contaminó artificialmente 250 g de grano de frijol negro o rojo con un patrón de aflatoxina B1 (AFB1) (Sigma-Aldrich, USA) disuelto en benceno:acetonitrilo (98:2). El enriquecimiento se realizó de la siguiente manera: a) al grano de frijol se le agregó 0,5 ml del patrón de AFB1 para llegar a una concentración de aflatoxinas conocida en la muestra de 93,81 µg/kg; b) se dejó secar durante 30 min; c) y se le agregó 1,25 L de agua.

Para la cocción, se utilizaron ollas de presión y cocimiento lento de 4 L, ambas de la marca TelStar, y ollas comunes de aluminio de 4 L. En cada olla se agregó 250 g de frijol con 1,25 L de agua. Se usaron tres métodos de cocción con diferentes tiempos (Cuadro 2). Luego de la cocción, se separó el grano del caldo y se realizó la extracción y cuantificación de aflatoxinas, para esto se utilizó el protocolo indicado anteriormente en la sección 5.1.

Cuadro 2. Tratamientos para determinar el efecto de la cocción del grano de frijol negro y rojo sobre la reducción de la contaminación por aflatoxinas. Laboratorio de Granos y Laboratorio de Micotoxinas del Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS) de la Universidad de Costa Rica. San Pedro de Montes de Oca, San José, Costa Rica, 2022.

Tipo de olla	Color del grano	Tiempo
Normal	Rojo	110 min (1,8 h)
	Negro	95 min (1,6 h)
Presión	Rojo o negro	20 min (0,3 h)
		30 min (0,5 h)
Cocimiento lento "high"	Rojo o negro	360 min (6 h)
		480 min (8 h)

Se realizaron tres repeticiones para cada uno de los cinco tratamientos de cocción por frijol comercial (negro y rojo). La unidad experimental estuvo compuesta por cada olla con grano de frijol contaminado con aflatoxinas. El porcentaje de reducción se calculó de la siguiente manera: $100 - ([\text{Concentración final}] / [\text{Concentración teórica inicial}] * 100)$.

5.2.3. Temperatura de cocción

Para conocer el comportamiento de la temperatura durante la cocción, la misma se determinó dentro de cada olla con sensores termopares sin contacto con los granos. En el caso de la olla normal, la determinación se realizó durante 95 min (frijol negro) y 110 min (frijol rojo) se inició una vez que se agregó los granos en el agua hirviendo. En el caso de la olla de cocimiento lento, la temperatura se determinó durante 6 h, mientras que, para la olla de presión, la medición se realizó durante 30 min e inició una vez alcanzada la presión. Para esto se utilizaron tres sensores termopares y se registró los datos utilizando el software Scanlink2.

5.3 Efecto de distintos tiempos de remojo del frijol, previo a la cocción, sobre la reducción de la contaminación de aflatoxinas

Para determinar el efecto de los tiempos de remojo, se enriqueció 250 g de grano de frijol negro o rojo con un patrón de AFB1 como se indicó en la sección 5.2.2., y se agregó 1,25 L de agua a temperatura ambiente. Se usó tres tiempos de remojo: 16 h, 24 h y 48 h. Posteriormente, se cocinaron los frijoles en olla de cocimiento lento durante seis horas. Luego de la cocción, se separó el grano del caldo y se realizó la extracción y cuantificación de aflatoxinas totales a partir de cada uno (grano y caldo). Para ello se utilizó el protocolo indicado anteriormente en la sección 5.1.

Se realizaron tres repeticiones para cada uno de los tres tratamientos de remojo por frijol comercial (negro y rojo). La unidad experimental estuvo compuesta por cada olla con grano de frijol.

6. Diseño experimental

6.1. Determinación de la capacidad toxigénica de *Aspergillus flavus* en diferentes variedades de granos de frijol

Se realizó con un diseño irrestricto y se utilizaron 10 variedades de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) y una variedad de frijol tépari (*P. acutifolius*). Por cada variedad se realizaron cuatro réplicas y el control absoluto (solo agua autoclavada sin esporas), además del control positivo (medio de cultivo con base en maní).

6.1.2 Análisis de polifenoles presentes en diferentes variedades de granos de frijol

Se realizó con un diseño irrestricto y se utilizaron 10 variedades de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) y una variedad de frijol tépari (*P. acutifolius*). Por cada variedad se realizaron cuatro réplicas.

6.2. Efecto de distintos métodos de cocción del frijol sobre la reducción de la contaminación de aflatoxinas

Se utilizó un diseño factorial 5x2, es decir, se realizaron cinco tratamientos por frijol comercial (negro y rojo). Cada tratamiento contó con tres réplicas y su respectivo control absoluto (grano enriquecido con aflatoxinas, pero sin cocción). Las repeticiones por tratamiento se realizaron simultáneamente.

6.3. Efecto de distintos tiempos de remojo del frijol previo a la cocción sobre la reducción de la contaminación de aflatoxinas

Se hizo a través de un diseño factorial 3x2, es decir, se realizaron tres tratamientos por frijol comercial (negro y rojo). Cada tratamiento contó con tres réplicas y su respectivo control absoluto (grano enriquecido con aflatoxinas, pero sin remojo). Las repeticiones por tratamiento se realizaron simultáneamente.

6.4. Análisis estadístico de los datos

Para iniciar con el análisis de la capacidad toxigénica de *A. flavus* y de los distintos métodos de cocción y tiempos de remojo, se revisó la distribución de los residuales, la normalidad y la homocedasticidad. Al aprobarse los supuestos, se utilizó ANOVA como método de análisis estadístico de los datos a través del uso del lenguaje estadístico R (R Core Team, 2022) por medio del entorno de desarrollo integrado RStudio (RStudio Team, 2022). Posteriormente, para identificar diferencias entre los tratamientos se utilizó la prueba de Tukey (datos normales) ($p \leq 0,05$).

En cuanto al análisis del contenido de polifenoles, se utilizó el análisis de componentes principales (PCA) a través del uso del lenguaje estadístico R (R Core Team, 2022) por medio del entorno de desarrollo integrado RStudio (RStudio Team, 2022); y el análisis de correlación con el programa de cálculo Microsoft Excel.

7. Resultados

7.1. Capacidad toxigénica de *Aspergillus flavus* en diferentes variedades de granos de frijol

Según lo esperado, *A. flavus* produjo la concentración más alta de aflatoxinas cuando se cultivó en medio con base en maní (testigo positivo). En cuanto a las distintas variedades de frijol, en el análisis estadístico se observó que hubo diferencias y estas fueron significativas, lo que permitió agrupar las variedades según la concentración de aflatoxinas totales de la siguiente manera: en las variedades con la letra “f” el hongo tienen una capacidad toxigénica alta, en las variedades con las letras “bde” una capacidad media y en las variedades con la letra “a” tienen una capacidad baja (Figura 1).

El hongo produjo una concentración alta de aflatoxinas de hasta 594,94 $\mu\text{g}/\text{kg}$ cuando se cultivó en maní y en medio con base en grano de las variedades negras Matambú y Brunca, y la variedad blanca Surú. Seguido de concentraciones medias en las variedades Generalito (roja) y Nambí (negra) con 224,87 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y 248,02 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectivamente. Mientras que las concentraciones más bajas de aflatoxinas se obtuvieron principalmente en las variedades rojas como lo son Chánguena, Cabécar y Tayní, y en las variedades Mantequilla (amarilla),

Guaymí (negra) e Ingrato (manchado) desde 42,33 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Ingrato) hasta 164,02 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Tayní) (Figura 1).

Es importante agregar además que no se detectaron aflatoxinas en los testigos absolutos de las variedades de frijol o los valores se encontraron por debajo del límite de cuantificación ($\text{LoQ} < 1,6 \mu\text{g}/\text{kg}$) o detección ($\text{LoD} < 0,48 \mu\text{g}/\text{kg}$) (Anexo 1).

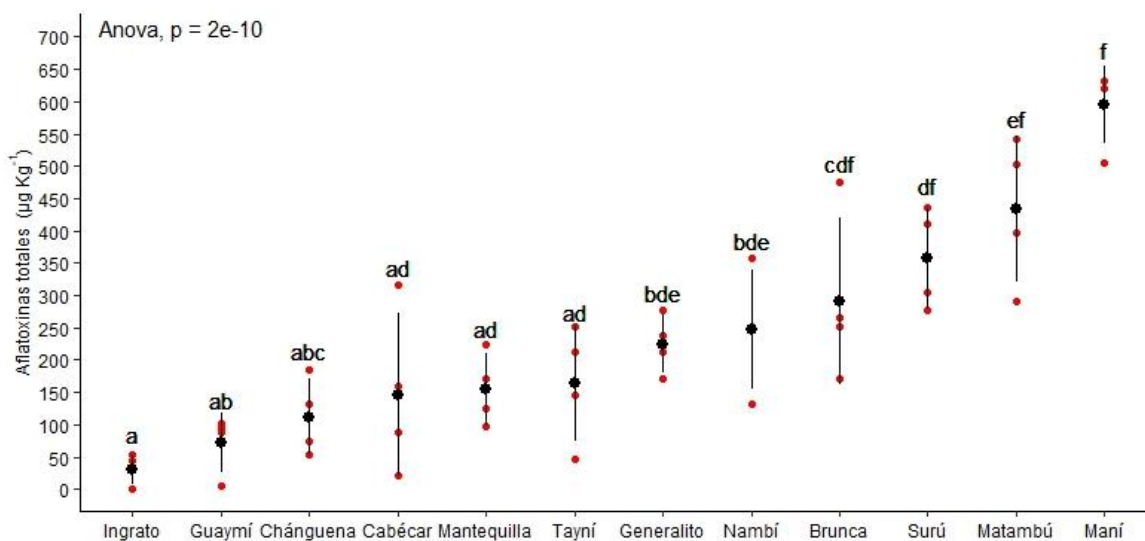


Figura 1. Concentración de aflatoxinas totales producidas por *Aspergillus flavus* en granos molidos de 10 variedades de frijol común (*P. vulgaris* L.) con diferente color de grano: grano blanco (variedad: Surú), grano amarillo (variedad: Mantequilla), grano negro (variedades: Guaymí, Nambí, Brunca y Matambú) y grano rojo (variedades: Chánguena, Cabécar, Tayní y Generalito) producidas a nivel nacional; en una variedad de frijol tépari (*P. acutifolius*) manchado (variedad: Ingrato) y de maní (*Arachis hypogaea*). Análisis realizados luego de dos semanas de cultivo a 30 °C. Las barras muestran el intervalo de confianza, mientras que el punto negro se refiere al promedio de cuatro repeticiones. Cada punto rojo equivale al valor obtenido en cada repetición. Letras distintas muestran diferencias significativas entre variedad. Laboratorio de Granos y Laboratorio de Micotoxinas del Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS) de la Universidad de Costa Rica. San Pedro de Montes de Oca, San José, Costa Rica, 2022.

Se observó con una significancia del 42,1%, que los polifenoles ácido ferúlico, ácido cafeico, ácido sinápico, ácido gálico y ácido p-cumárico se correlacionan positivamente con las aflatoxinas, es decir, en los granos de las variedades en las cuales el hongo produjo más aflatoxinas la concentración de estos polifenoles en el grano era mayor (Figura 2). Lo contrario ocurrió con la catequina, el ácido 4-hidroxibenzoico, quercetina, ácido protocatecuico, kaempferol, epicatequina e isoquercetina, ya que el hongo produjo menos aflatoxinas en los granos de las variedades con mayor concentración de esos polifenoles (Figura 2); además, se evidencia una correlación negativa de estos polifenoles respecto a la concentración de aflatoxinas con un $p < 0,0094$ y un coeficiente de determinación (R) de $-0,4210$ (Figura 3). De estos polifenoles, la catequina y el ácido 4-hidroxibenzoico son los que tienen la correlación negativa más alta con la producción de aflatoxinas. En el caso de la catequina, el R fue de $-0,4416$ con un $p < 0,0016$ (Figura 4A), mientras que en el caso del ácido 4-hidroxibenzoico el valor de R fue de $-0,4132$ y el valor $p < 0,0016$ (Figura 4B).

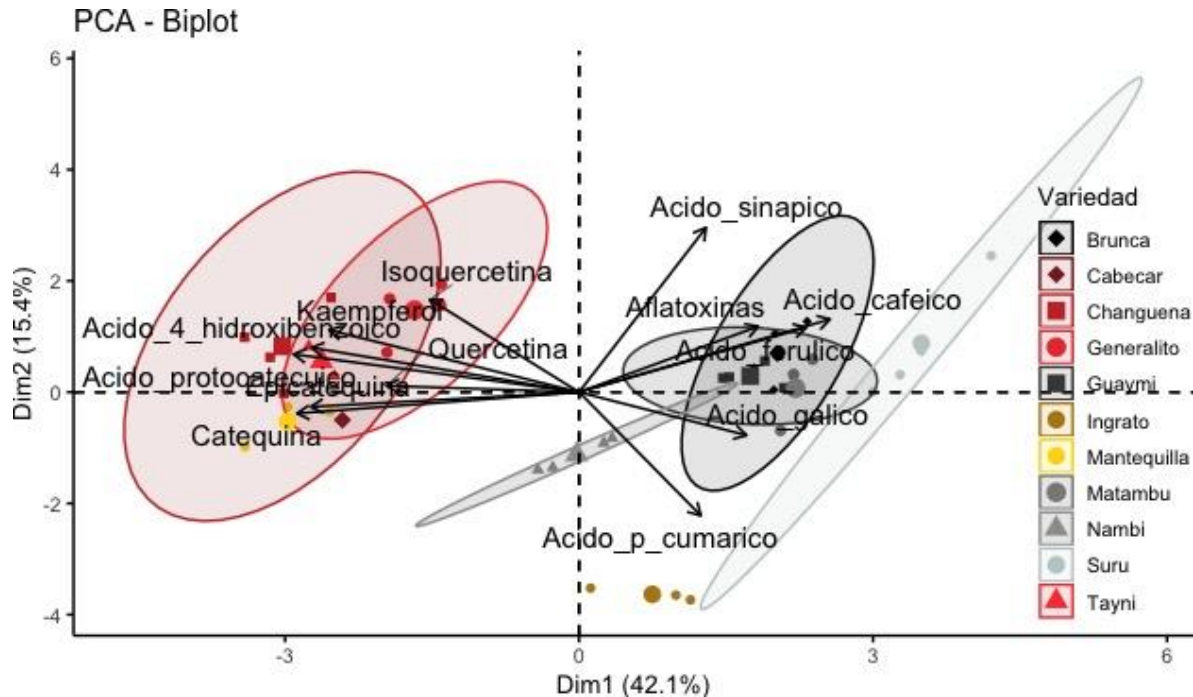


Figura 2. Diagrama biplot según el análisis de componentes principales tomando en cuenta la concentración de aflatoxinas producidas por el hongo *A. flavus* y los polifenoles presentes en granos molidos de 10 variedades de frijol común (*P. vulgaris* L.) con diferente color de grano: grano blanco (variedad: Surú), grano amarillo (variedad: Mantequilla), grano negro (variedades: Guaymí, Nambí, Brunca y Matambú) y grano rojo (variedades: Chánguena, Cabécar, Tayní y Generalito); y en una especie de frijol tépari (*P. acutifolius*) café manchado (variedad: Ingrato). Análisis realizados luego de dos semanas a 30 °C. Los ejes indican la significancia de la explicación de los datos. El símbolo más pequeño equivale al valor obtenido en cada repetición, mientras que el símbolo más grande, representa el promedio de cada variedad. El círculo alrededor de los datos de las variedades muestra el 95% de significancia. Cada flecha muestra la correlación respecto a las aflatoxinas y su longitud muestra la representatividad del polifenol por variedad. Laboratorio de Granos y Laboratorio de Micotoxinas del Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS) de la Universidad de Costa Rica. San Pedro de Montes de Oca, San José, Costa Rica, 2023.

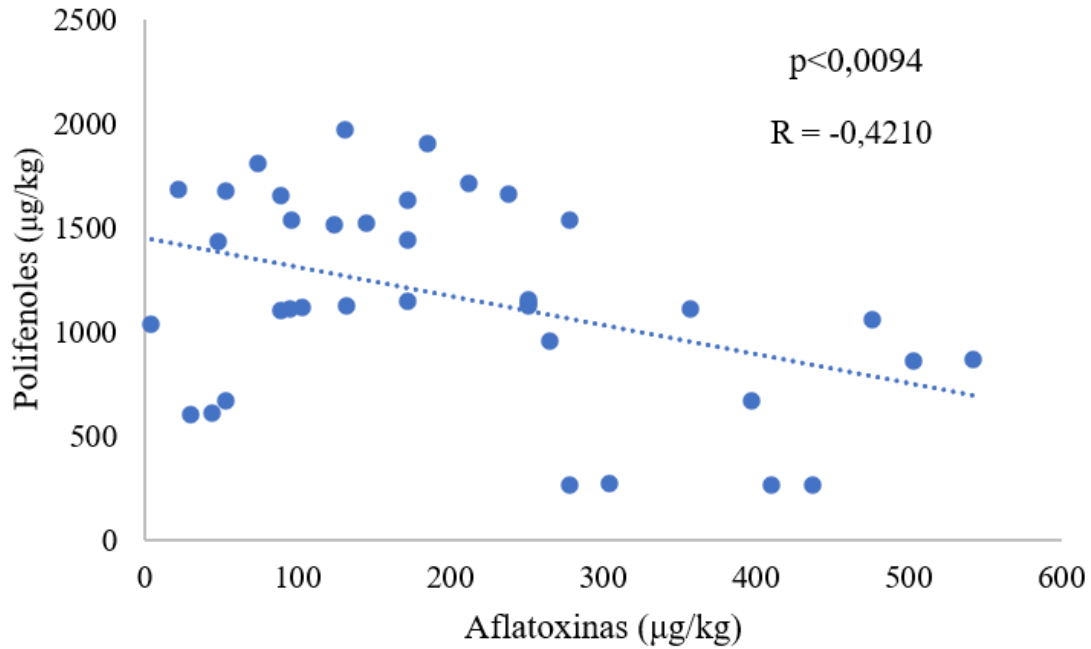


Figura 3. Correlación de la concentración de polifenoles (catequina, ácido 4-Hidroxibenzoico, quercetina, ácido protocatecuico, kaempferol, epicatequina e isoquercetina) y aflatoxinas presentes en granos molidos de 10 variedades de frijol común (*P. vulgaris* L.) con diferente color de grano: grano blanco (variedad: Surú), grano amarillo (variedad: Mantequilla), grano negro (variedades: Guaymí, Nambí, Brunca y Matambú) y grano rojo (variedades: Chánguena, Cabécar, Taynín y Generalito); y en la especie de frijol tépari (*P. acutifolius*) café manchado (variedad: Ingrato). Laboratorio de Granos y Laboratorio de Micotoxinas del Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS) de la Universidad de Costa Rica. San Pedro de Montes de Oca, San José, Costa Rica, 2023.

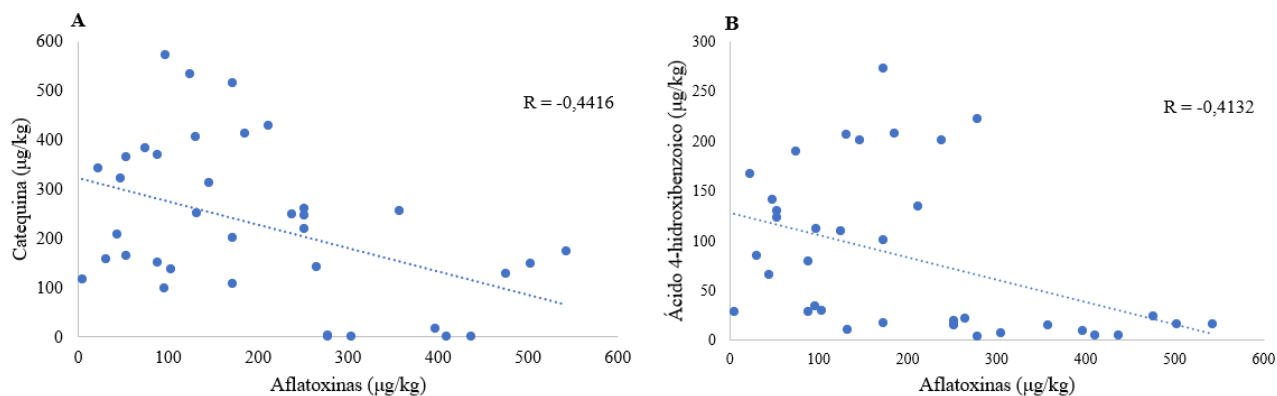


Figura 4. Correlación de la concentración de polifenoles catequina (A) y ácido 4-hidroxibenzoico (B), y las aflatoxinas presentes en granos molidos de 10 variedades de frijol común (*P. vulgaris* L.) con diferente color de grano: grano blanco (variedad: Surú), grano amarillo (variedad: Mantequilla), grano negro (variedades: Guaymí, Nambí, Brunca y Matambú) y grano rojo (variedades: Chánguena, Cabécar, TaynÍ y Generalito); y en la especie de frijol tépari (*P. acutifolius*) café manchado (variedad: Ingrato). Laboratorio de Granos y Laboratorio de Micotoxinas del Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS) de la Universidad de Costa Rica. San Pedro de Montes de Oca, San José, Costa Rica, 2023.

7.2. Efecto de distintos métodos de cocción del frijol sobre la reducción de la contaminación de aflatoxinas

En la encuesta realizada durante el primer semestre del 2023 con una población de 184 personas, se obtuvo que el 97,8% compra y consume el frijol en grano, y que hay mayor preferencia de consumo del grano rojo (58%). De esta población, el 87,8% cocina el grano y el 50% cocina 500 g de frijol con una preferencia a la olla de presión como método de cocción (46%), seguido del cocimiento lento (38%) y la olla normal (16%); además que un 49% coloca los granos de frijol en remojo previo a la cocción (Anexo 2).

Previo a las pruebas preliminares, se realizó el análisis de aflatoxinas totales a ambos lotes comerciales de grano de frijol (rojo y negro), los cuales no tenían aflatoxinas o los valores se encontraban por debajo del LoQ ($<1,6 \mu\text{g}/\text{kg}$) y LoD ($<0,48 \mu\text{g}/\text{kg}$) (Anexo 3).

7.2.1. Pruebas preliminares

En cuanto a las pruebas para contaminar los granos de forma natural con esporas de *A. flavus*, solamente en la tercera prueba se obtuvo aflatoxinas; sin embargo, los valores obtenidos no fueron confiables debido a la alta desviación entre las repeticiones (Anexo 4). Es por lo anterior, que los experimentos se realizaron mediante contaminación artificial de los granos con patrones puros de aflatoxinas y no mediante inoculaciones naturales con el hongo productor de aflatoxinas.

Además, se realizó una prueba de contaminación artificial del grano con un patrón puro de AFB1 para determinar el disolvente adecuado. Se obtuvieron porcentajes de recuperación mayores al 100% cuando se utilizó el patrón disuelto en benceno:acetonitrilo (98:2) y con el agua, mientras que, cuando el disolvente utilizado fue metanol, el porcentaje de recuperación se redujo a 85,1% (Anexo 5). Basado en estos resultados, se decidió utilizar el patrón disuelto en benceno:acetonitrilo (98:2) para la contaminación artificial de las muestras.

Por último, previo al montaje de las pruebas de cocción, se determinó que el porcentaje de recuperación de aflatoxinas totales para el frijol comercial rojo y negro fue de 65,4% y 70,4%, respectivamente (Anexo 6).

7.2.2. Pruebas de cocción

Luego de la cocción, independientemente del tratamiento, se observó que la mayor concentración de aflatoxinas totales permanecía en los granos (60-90%) y no en el caldo (10-43%) en ambos tipos de grano (rojo y negro). En el tratamiento con olla normal (N), las aflatoxinas permanecieron más en el grano (86-90%) comparado con cocimiento lento (CL) (77% -83%) y olla de presión (P) (60%-81%).

En el grano rojo, la concentración de aflatoxinas luego del cocimiento con olla normal (N) y presión (P20 y P30) osciló entre 31,6 µg/kg y 34,1 µg/kg (grano), y de 4,3 µg/kg a 13,7 µg/kg (caldo); mientras que la concentración luego del cocimiento lento (CL6 y CL8) fue menor, entre 22,9 µg/kg y 24,5 µg/kg (grano), y 4,8 µg/kg a 5,5 µg/kg (caldo) (Cuadro 3). En cuanto al grano negro, se observó un comportamiento similar que en el grano rojo; cuando el frijol se cocinó con olla normal (N) y de presión (P20 y P30) se obtuvo una concentración de aflatoxinas mayor, de 26 µg/kg a 27,9 µg/kg (grano) y de 5,2 µg/kg a 6,2 µg/kg (caldo), mientras que cuando se cocinaron con olla de cocimiento lento (CL6 y CL8) la concentración fue de 18,9 µg/kg a 19,4 µg/kg (grano) y de 3,2 µg/kg a 4,5 µg/kg (caldo) (Cuadro 3).

El porcentaje de reducción de aflatoxinas fue menor en el grano que en el caldo, independientemente del color del grano. En el tratamiento con olla normal (N) se alcanzó un porcentaje de reducción del 66-71% en el grano y del 94-95% en el caldo; mientras que con olla de presión (P20 y P30), los porcentajes de reducción fueron desde 64-72% (grano) y 85-94% (caldo). Por último, en olla de cocimiento lento (CL6 y CL8) se observó una reducción del 74-80% (grano) y 94-97% (caldo) (Cuadro 3).

Se observó mayor reducción de aflatoxinas en el frijol negro comparado con frijol rojo cocinados con presión por 20 min (P20) ($p < 0,0034$) y con cocimiento lento por 6 y 8 horas ($p < 0,0056$ y $p < 0,0121$, respectivamente). El mayor porcentaje de reducción de aflatoxinas en frijol rojo y negro fue en el tratamiento de cocimiento lento por 6 y 8 horas (Figura 5). En frijol rojo, se redujo el 70% luego de 6 horas de cocción lenta y 68% luego de 8 horas (Figura 5A), mientras que, en frijol negro se redujo un 76% luego de 6 horas de cocción lenta y un 74% luego de 8 horas (Figura 5B). Para el caso del frijol negro, la

reducción observada con olla normal (N) fue similar que en olla de presión por 20 y 30 minutos (Figura 5B).

Cuadro 3. Concentración de aflatoxinas totales y su reducción luego de diferentes tratamientos de cocción de los granos rojo y negro, previamente contaminados artificialmente con AFB1. Tratamientos de cocción: Olla normal (N), olla de presión por 20 min (P20) o 30 min (P30), y olla de cocimiento lento por 6 h (CL6) o 8 h (CL8). Laboratorio de Granos y Laboratorio de Micotoxinas del Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS) de la Universidad de Costa Rica. San Pedro de Montes de Oca, San José, Costa Rica, 2022.

Color del grano	Tratamiento	Aflatoxinas totales ($\mu\text{g}/\text{kg}$) [Reducción (%)]		
		Grano	Caldo	Grano + Caldo
Rojo	N	32,1 \pm 0,0 [66]	4,3 \pm 0,6 [95]	36,4 \pm 3,0 [61,2]
	P20	34,1 \pm 1,3 [64]	13,7 \pm 3,0 [85]	31,3 \pm 1,8 [49,0]
	P30	31,6 \pm 0,5 [66]	13,7 \pm 3,9 [85]	34,1 \pm 1,5 [51,8]
	CL6	22,9 \pm 0,9 [76]	4,8 \pm 0,3 [95]	22,1 \pm 0,5 [70,4]
	CL8	24,5 \pm 0,9 [74]	5,5 \pm 0,3 [94]	23,9 \pm 0,8 [68,1]
Negro	N	27,0 \pm 3,0 [71]	5,4 \pm 0,1 [94]	32,3 \pm 3,0 [65,5]
	P20	26,0 \pm 1,7 [72]	5,2 \pm 0,7 [94]	31,3 \pm 1,8 [66,7]
	P30	27,9 \pm 1,3 [70]	6,2 \pm 0,3 [93]	34,1 \pm 1,5 [63,7]
	CL6	18,9 \pm 0,5 [80]	3,2 \pm 0,0 [97]	22,1 \pm 0,5 [76,4]
	CL8	19,4 \pm 0,5 [79]	4,5 \pm 0,4 [95]	23,9 \pm 0,8 [74,5]

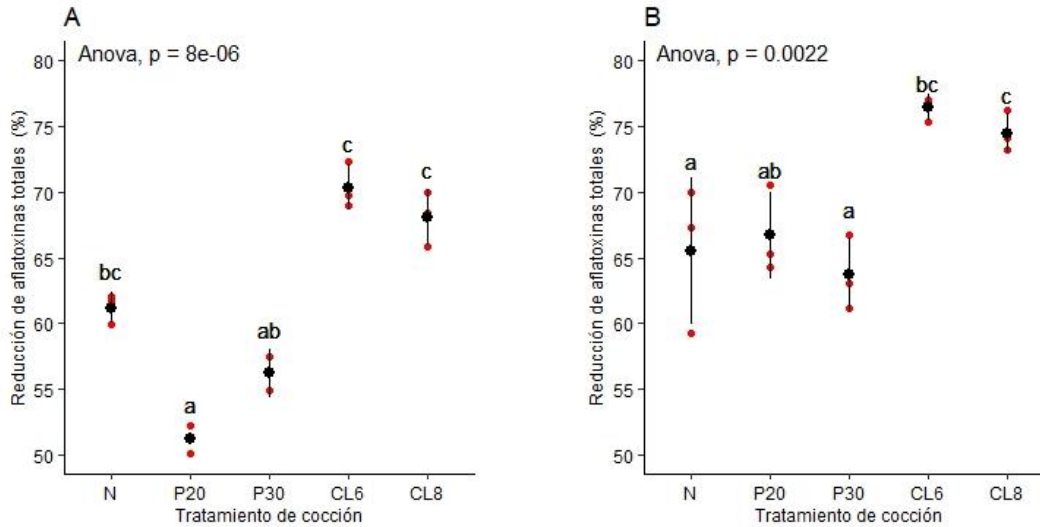


Figura 5. Porcentaje de reducción de aflatoxinas totales en granos y caldo de frijol rojo (A) y negro (B) luego de diferentes tratamientos de cocción de los granos previamente enriquecidos con AFB1. Tratamientos de cocción: Olla normal (N), olla de presión por 20 min (P20) o 30 min (P30), y olla de cocimiento lento por 6 h (CL6) o 8 h (CL8). Las barras muestran el intervalo de confianza, mientras que el punto negro se refiere al promedio de cuatro repeticiones. Cada punto rojo equivale al valor obtenido en cada repetición. Letras distintas muestran diferencias significativas entre tratamientos. Laboratorio de Granos y Laboratorio de Micotoxinas del Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS) de la Universidad de Costa Rica. San Pedro de Montes de Oca, San José, Costa Rica, 2022.

7.2.3 Temperatura de cocción

La temperatura a la cual llegó la olla en cada uno de los tratamientos de cocción fue diferente. En el caso de la olla normal, la temperatura máxima fue de 94°C en el frijol negro y 88°C en el grano rojo, siendo entre sí diferentes significativamente ($p < 2,2e^{-16}$) (Figura 6A). Al igual que en la olla normal, la olla de cocimiento lento llegó a una temperatura mayor en el frijol negro comparado con el rojo ($p < 2,119e^{-14}$) (Figura 6B). Con este último método de cocción, la temperatura máxima que alcanzó el frijol negro fue de 90°C y el frijol rojo de 83°C. En cuanto a la olla de presión, en esta se obtuvo una temperatura máxima de 114°C en frijol negro y rojo (Figura 6C).

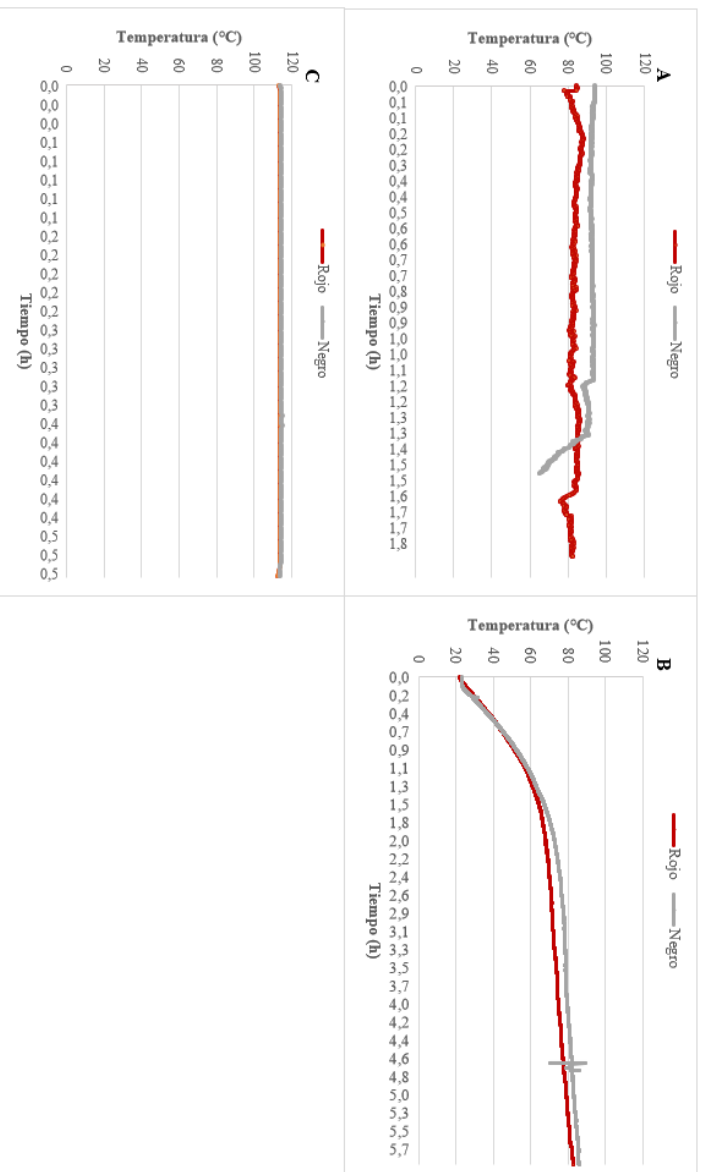


Figura 6. Temperatura de cocción en olla normal (A), cocimiento lento (B) y presión (C) de granos de frijol rojo y negro utilizados para las pruebas de cocción y remojo. El registro de las temperaturas en cocimiento lento inició una vez encendida, en la olla normal y olla de presión inició una vez se alcanzó la ebullición del agua y la presión máxima en las respectivas ollas. Laboratorio de Procesamiento Agrícola del Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS) de la Universidad de Costa Rica. San Pedro de Montes de Oca, San José, Costa Rica, 2022.

7.3. Efecto de distintos tiempos de remojo del frijol previo a la cocción sobre la reducción de la contaminación de aflatoxinas

Al igual que en las pruebas de cocción, cuando se agregó un periodo de remojo por 16, 24 o 48 horas, la mayor concentración de aflatoxinas permaneció en los granos (70-82,2%) y no en el caldo (17,8-30%), independientemente del tratamiento y el color del grano. En el grano rojo se obtuvo una concentración de aflatoxinas que osciló desde 17,3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a 21,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$, y para el grano negro se obtuvo una concentración desde 18,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a 18,9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Cuadro 4).

Respecto al efecto del remojo sobre el porcentaje de reducción de la contaminación de aflatoxinas, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos en ambos frijoles comerciales. Este porcentaje en el frijol rojo osciló entre 73% y 76%; y en el frijol negro fue de 75% a 76% (Figura 7), y son similares a los observados cuando los granos se cocinaron en olla de cocimiento lento sin un período previo de remojo.

Cuadro 4. Concentración de aflatoxinas totales y su reducción en granos de frijol negro o rojo luego de diferentes tiempos de remojo de los granos previamente enriquecidos con un patrón de AFB1 y cocinados con olla de cocimiento lento durante 6 h. Laboratorio de Micotoxinas del Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS) de la Universidad de Costa Rica. San Pedro de Montes de Oca, San José, Costa Rica, 2022.

Color del grano	Tiempo de remojo (h)	Aflatoxinas totales ($\mu\text{g}/\text{kg}$) [Reducción (%)]		
		Grano	Caldo	Grano + Caldo
Rojo	16	17,3 \pm 0,5 [82]	5,1 \pm 0,1 [94]	22,5 \pm 0,4 [76,0]
	24	18,3 \pm 0,9 [81]	5,5 \pm 0,4 [94]	23,8 \pm 0,8 [74,6]
	48	21,4 \pm 0,9 [77]	3,8 \pm 0,2 [96]	25,2 \pm 0,9 [73,1]
Negro	16	18,4 \pm 2,2 [80]	4,2 \pm 0,9 [96]	22,6 \pm 2,7 [75,9]
	24	18,9 \pm 1,3 [80]	3,7 \pm 0,7 [96]	23,2 \pm 1,0 [75,3]
	48	18,5 \pm 0,8 [80]	4,0 \pm 0,2 [96]	22,5 \pm 0,6 [76,0]

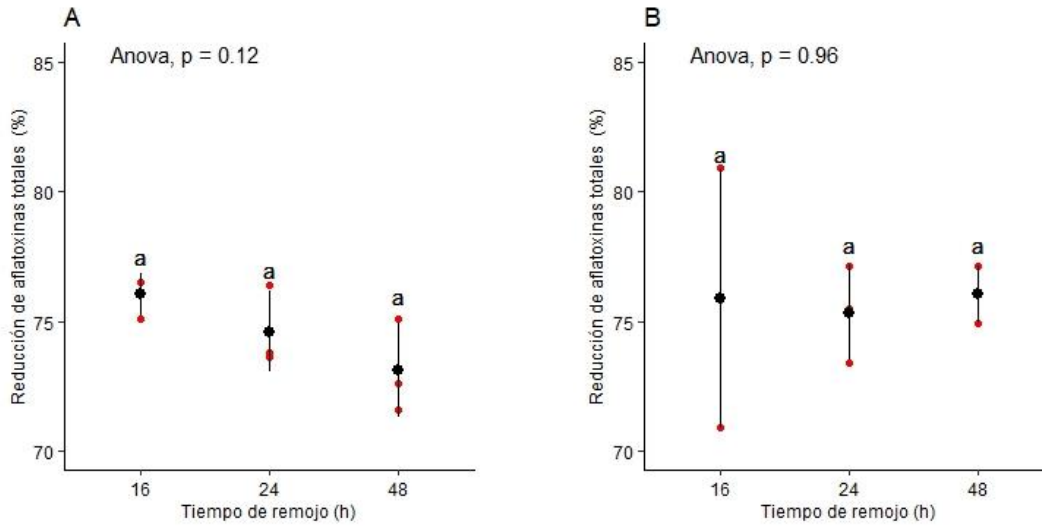


Figura 7. Porcentaje de reducción de aflatoxinas totales en granos y caldo de frijol rojo (A) o negro (B) luego de diferentes tiempos de remojo de los granos previamente enriquecidos con AFB1 y cocinados con olla de cocimiento lento durante 6 h. Las barras muestran el intervalo de confianza, mientras que el punto negro se refiere al promedio de cuatro repeticiones. Cada punto rojo equivale al valor obtenido en cada repetición. Letras distintas muestran diferencias significativas entre tratamiento. Laboratorio de Micotoxinas del Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS) de la Universidad de Costa Rica. San Pedro de Montes de Oca, San José, Costa Rica, 2022.

8. Discusión

Previamente, se ha encontrado que la composición de las variedades de grano de frijol tiene un efecto sobre la producción de aflatoxinas por parte de una cepa toxigénica de *A. flavus* (Castillo & Zambrano, 2020). Específicamente, el contenido y el tipo de polifenoles tienen un papel relevante en la producción de estas toxinas (Yang et al., 2018), ya que hay distintos polifenoles que se asocian más a unas variedades según su coloración y se correlacionan positiva o negativamente con la concentración de aflatoxinas presentes en el grano. Por otro lado, estudios previos han demostrado que los métodos de cocción podrían reducir el contenido de micotoxinas en los alimentos en cierto porcentaje según la humedad, la temperatura y el tiempo en el que se exponga el grano al tratamiento de cocción (Roig, 2013).

8.1. Capacidad toxigénica de *Aspergillus flavus* en diferentes variedades de granos de frijol

La capacidad toxigénica de *A. flavus* fue distinta en las variedades de frijol, ya que se obtuvo concentraciones altas en las variedades Matambú, Brunca y Surú (Figura 1). Esta capacidad puede deberse a que estas variedades suelen tener mayor susceptibilidad a patógenos de importancia económica como lo son *Thanatephorus cucumeris* (Mustia hilachosa) y *Pseudocercospora griseola* (Mancha angular); en cambio, las variedades de frijol en las que se obtuvo una baja concentración de aflatoxinas tienen resistencia intermedia a estos patógenos (Hernández-Fonseca et al. 2021; Vargas et al. 2018). Entonces, las variedades con resistencia intermedia a hongos tienen la capacidad de inhibir el crecimiento y desarrollo del patógeno en los granos debido a características propias de su composición. El hongo al verse limitado probablemente no va a ser capaz de producir las aflatoxinas (metabolitos secundarios) por la falta de la susceptibilidad del grano.

Por otro lado, como se mencionó anteriormente, el papel de los ácidos fenólicos y flavonoides presentes en las variedades de frijol permitió explicar los resultados obtenidos

de la capacidad toxigénica según la variedad del grano, ya que uno de los factores que influyen en el contenido de estos compuestos es el genotipo del frijol (Yang et al., 2018). En las variedades de color negro predominaron los polifenoles ácidos cafeico, ferúlico, sinápico, p-cumárico y gálico donde el hongo produjo una concentración media y alta de aflatoxinas y estas se correlacionaron positivamente con la concentración de esos polifenoles (Figura 2). Por el contrario, en las variedades de color rojo en las cuales el hongo produjo menor concentración de aflatoxinas prevalecen los polifenoles del grupo de los flavonoides (Figura 1 y 2). Aunque el ácido 4-hidroxibenzoico y el ácido protocatecuico pertenecen a otro grupo, los ácidos hidroxibenzoicos, también se correlacionaron negativamente con las aflatoxinas (Figura 2 y 3) (Belščak-Cvitanović et al. 2018; Yang et al., 2018).

Además, Hussain et al. (2011), al implementar extractos de *Viscum album* obtuvieron una actividad antimicrobiana y antifúngica contra diversos patógenos dentro de los cuales se encontraba *A. flavus*. Específicamente, los flavonoides es el grupo más recurrente en las plantas y se han estudiado extractos de diferentes plantas que contienen catequina y quercetina, ambos polifenoles asociados al frijol según la literatura, en los que se observó que tienen un efecto antifúngico (Cota, 2021; Espinosa-Alonso et al. 2006; García, 2016; Mojica et al. 2015; Rosas et al. 2021; Yang et al., 2018). Estos dos polifenoles podrían explicar la concentración baja y media de aflatoxinas producida por el hongo en las variedades rojas y en la variedad amarilla (Figura 1), ya que la catequina fue uno de los polifenoles que se correlacionó negativamente y en mayor medida con la concentración de aflatoxinas (Figura 4). Asimismo, Cota (2021) en tres extractos naturales que contenían catequina, observó una inhibición fúngica entre 50-100% contra los hongos *Rhizoctonia solani* y *Phytophthora capsici*.

En cuanto al ácido 4-hidroxibenzoico, el segundo polifenol, después de la catequina, con el que se correlacionó negativamente la concentración de aflatoxinas producida por el hongo, hay evidencia que es un compuesto con efecto antifúngico sobre una especie de *Aspergillus* que afecta a las personas directamente (*A. fumigatus*) y sobre *Alternaria alternata*; lo que coincide con los datos obtenidos en el presente trabajo (Figura 2 y 4) (Broberg et al. 2007; Luz, 2020; Romero-Cortes et al. 2019).

Entre los otros polifenoles correlacionados negativamente con la concentración de aflatoxinas producida por el hongo, se sabe que el ácido protocatecuico confiere resistencia a una enfermedad fungosa en cebolla; además que se ha observado que derivados sintéticos de este, tienen actividad fungicida (Arantes, 2011; Kakkar y Bais, 2014). El kaempferol también se ha encontrado en frijol (Espinosa-Alonso et al. 2006; Mojica et al. 2015; Yang et al., 2018) y, al igual que la quercetina, tiene potencial antifúngico, específicamente se ha observado un efecto contra *A. flavus* (Brilhante et al. 2017; Da Silva et al. 2013). También, Cáceres et al. (2014) compararon el efecto antifúngico de tres extractos naturales sobre *A. niger*, en dos de estos extractos identificaron la presencia de kaempferol y kaempferol + catequina, duplicando o triplicando (respectivamente) la efectividad de la inhibición del hongo. Al igual que en la presente investigación, se correlacionó negativamente el efecto antifúngico con los polifenoles (Figura 2). En cuanto a la isoquercetina, este es un flavonoide que tiene capacidad antifúngica, Aguilar & Juep (2018) probaron la actividad antifúngica de un extracto de flores de *Tropaeolum majus* L. (mastuerzo) que contenía isoquercetina, quercetina y kaempferol sobre *Sporothrix schenckii* y vio efectos de inhibición sobre este hongo. Por último, en la epicatequina, de igual forma encontrada en frijol (Mojica et al. 2015; Yang et al., 2018) y en extractos compuestos principalmente por este flavonoide, se observó que tiene la capacidad de inhibir el crecimiento fúngico (Mojica et al. 2015; Xoca-Orozco et al. 2018).

De los ácidos fenólicos correlacionados positivamente con las aflatoxinas (Figura 2), los ácidos p-cumárico, ferúlico, cafeico y sinápico son productos de la transformación del ácido cinámico (Dutra, 2021). De los cuales, todos excepto el p-cumárico han sido encontrados previamente en frijol (Chen et al. 2015; Espinosa-Alonso et al. 2006). Respecto al ácido ferúlico, se ha observado que potencia el desarrollo de *Phytophthora cinnamomi*, un hongo patógeno de plantas (Matei et al. 2019). En cuanto al ácido gálico, este es uno de los compuestos fenólicos más abundantes en el frijol (García, 2016); sin embargo, no tiene efecto significativo en la inhibición del crecimiento fúngico de *Fusarium culmorum* independientemente de su concentración, además que se ha observado un comportamiento sinérgico con *P. cinnamomi* (Matei et al. 2019). Lo anterior, coincide con lo observado en este trabajo, donde estos polifenoles posiblemente tienen un efecto sinérgico en el hongo *A. flavus* que potencia la producción de aflatoxinas.

El ácido cafeico tiene efecto antifúngico, ya que en un estudio se analizó tres extractos naturales, dentro de los cuales se contempló la hoja sen (*Florenxia cernuda* DC) que como componente bioactivo principal tiene el ácido cafeico (Trejo-Márquez et al. 2015; Rolim 2022). No obstante, en el presente trabajo este fue uno de los polifenoles mayormente correlacionados de forma positiva con la producción de aflatoxinas, es decir, en este caso no inhibió la producción de aflatoxinas por parte de *A. flavus* (Figura 2). Esto podría explicarse con lo que menciona Xoca-Orozco et al. (2018) en su estudio, donde concluyen que la concentración de los compuestos presentes en los extractos puede influir en la magnitud del efecto inhibitorio fúngico; probablemente la concentración del compuesto encontrada en el frijol es insuficiente para tener un efecto en la inhibición de la producción de aflatoxinas por parte de *A. flavus*.

En cuanto al ácido sinápico, Lazo (1991), menciona que es un compuesto antimicrobiano comúnmente producido por las plantas, sin embargo, al igual que el ácido cafeico, se correlacionó positivamente con las aflatoxinas poniendo en evidencia que en el frijol no tiene efecto antifúngico o antimicotoxigénico (Figura 2).

La literatura asocia el color del grano de frijol con algunos de los polifenoles más comunes (Yang et al., 2018); sin embargo, no en todos los casos se obtuvieron correlaciones positivas del polifenol, ya que no se encontró una correlación positiva entre la concentración de polifenoles y el color del grano. El grano de frijol de color negro se asoció principalmente con la quercetina, el ácido ferúlico y el kaempferol (Espinosa-Alonso et al. 2006; García, 2016; Mojica et al. 2015); no obstante, en el presente estudio solamente el ferúlico correlacionó positivamente con el color de grano negro (Figura 2). En el grano de frijol rojo se menciona que el ácido p-cumárico está asociado a este; sin embargo, en el presente trabajo no se correlacionó con este color de grano, sino más bien con la especie *P. acutifolius* (Ingrato) (Figura 2 y 3) (García-Lafuente et al. 2014). Por último, el grano de frijol blanco se le asocia con los ácidos ferúlico y p-cumárico (García-Lafuente et al. 2014; García, 2016) lo que coincide con lo obtenido en el presente trabajo (Figura 2).

En la capacidad toxigénica de *A. flavus* sobre el grano de frijol influyen diversos factores. En primer lugar, las resistencias intermedias a patógenos que son intrínsecas de las variedades que pueden limitar el desarrollo del hongo y por ende la producción de las

aflatoxinas; asimismo, los polifenoles que forman parte de la composición de metabolitos secundarios que producen las distintas variedades de grano de frijol utilizadas. Más relevante aún, los tipos específicos de polifenoles con capacidad antifúngica asociados a las diferentes variedades ya sean del grupo de los ácidos fenólicos o flavonoides; donde principalmente los flavonoides se suelen correlacionar negativamente con las aflatoxinas y a las variedades de color rojo. A parte del tipo de compuesto, su concentración puede tener influencia sobre la capacidad de inhibición de las aflatoxinas, ya que se puede observar un efecto sinérgico de ciertos polifenoles con las aflatoxinas a pesar de que en la literatura se les confiere actividad antifúngica.

8.2. Efecto de distintos métodos de cocción del frijol sobre la reducción de la contaminación de aflatoxinas

En el presente estudio, la reducción de la contaminación por aflatoxinas en el frijol a pesar de que se conoce que son resistentes a la degradación (Ramos et al., 2020), fue mayor al 50% indiferentemente del método de cocción y del color del grano. De acuerdo con la literatura, estas se descomponen de 237-306°C según el tiempo de calentamiento, humedad del alimento y el pH en el que se encuentren. También se menciona que no se degradan con la cocción o hervido, pero en autoclave se pueden destruir en conjunto con amonio o hipoclorito de sodio (Carvajal 2013; Martínez et al. 2013; Soriano del Castillo, 2007). Respecto a esto, hay procesos que se pueden implementar para descontaminar o detoxificar esta toxina de los alimentos, pero la efectividad del tratamiento depende de varios factores, dentro de los cuales se encuentran la temperatura y el tiempo de exposición del grano (Cuadro 3) (Asociación de fabricantes de harinas y sémolas de España, 2015; Carvajal, 2013; Soriano del Castillo, 2007).

Según López (2020), se necesitan temperaturas superiores a los 150°C para observar reducciones significativas debido a la estabilidad térmica de las micotoxinas en general. Sin embargo, en el presente estudio se observó una reducción de las aflatoxinas en frijol con temperaturas que no superaron los 114°C (Figura 5 y 6). Al respecto, en un ensayo similar a este, se contaminaron artificialmente diversas matrices con aflatoxinas para determinar el porcentaje de reducción, los autores observaron que, en la leche, al aplicar un tratamiento de

calor a 120°C durante 15 min se redujo un 24% de la aflatoxina M1; en maní observaron una reducción de hasta 80-100% de AFB1 con autoclave (116 °C, 0,7 bar) y añadiendo una salmuera de 5% NaCl durante 30 min. Además, en aceite de oliva se aplicó un calentamiento de 200°C por 20 min y de 250°C por 10 min, logrando una disminución de 25 y 65%, respectivamente (Martínez et al. 2013). Lo anterior demuestra que la reducción de las aflatoxinas es posible según la matriz y las condiciones de temperatura, el tiempo de exposición o la fuente de calor que se utilice a pesar de la estabilidad de la molécula mencionada en la literatura.

Esto se refleja en los resultados obtenidos en el presente trabajo, de manera que en los tratamientos de cocción de olla normal y cocimiento lento se obtuvo temperaturas máximas similares (94 °C y 90 °C, respectivamente), mientras que en los tratamientos de presión se observó una temperatura mayor a estas (114 °C), pero menores a las temperaturas reportadas por la literatura que se han visto como efectivas para descomponer la molécula. En los tratamientos de cocimiento lento durante 6 y 8 h se presentó la mayor reducción en el porcentaje de aflatoxinas en ambos granos (rojo y negro) a pesar de ser el tratamiento de cocción con la menor temperatura (Figura 5 y 6). En este caso, Martínez et al. (2013) recalcan que el tiempo al que es sometida la matriz al método de calor puede variar la efectividad de los tratamientos de temperatura, lo que conlleva a una mayor eficacia en el proceso de descontaminación. Esto se traduce de manera que un mayor tiempo de exposición al calor (cocimiento lento) generó una mayor reducción de aflatoxinas; lo que indica que la temperatura por sí sola no es un factor determinante en la reducción de aflatoxinas, debido a que la olla de presión presentó una mayor temperatura; sin embargo, no generó la mayor reducción de aflatoxinas durante la cocción.

En los métodos de descontaminación o detoxificación también se busca que sean fáciles de usar e implementar, así como económicos (Altamirano, 2019). Los tres sistemas de cocción implementados en el presente trabajo son los utilizados actualmente en la cocina costarricense en mayor o menor preferencia, por lo que son métodos factibles y accesibles para la población. Con los resultados obtenidos, ahora estos sistemas aparte de permitir la preparación del frijol en grano para su consumo, se conoce que son adecuados para la eventual reducción de las aflatoxinas presentes en frijol contaminado. Principalmente el

método de cocimiento lento que permitiría obtener un grano de frijol más inocuo para el consumidor al reducir las aflatoxinas en mayor medida; no obstante, es el segundo método más utilizado por la población encuestada (Anexo 2).

También, como se observó en los resultados obtenidos, a pesar de que las aflatoxinas se pueden disolver en solventes ligeramente polares como el agua (Asociación de fabricantes de harinas y sémolas de España, 2015), en este trabajo hubo una mayor concentración de aflatoxinas en el grano que en el caldo (Cuadro 3). Esto se atribuye a que el patrón de AFB1 utilizado para la contaminación del frijol, se impregnó de forma correcta en los granos pudiendo simular la contaminación natural.

Por último, es importante considerar que la temperatura alcanzada por los granos en los métodos de olla normal y cocimiento lento fue mayor en el frijol negro que en el frijol rojo (Figura 6). Sin embargo, respecto al porcentaje de reducción de aflatoxinas, solamente en cocimiento lento hubo una diferencia significativa según el color del grano, donde el grano negro tuvo una mayor reducción respecto al grano rojo (Figura 5). Y puesto que el grano rojo es preferido por la población encuestada, se podría traducir en un mayor consumo de aflatoxinas en caso de que el grano obtenido se encuentre contaminado (Anexo 2).

8.3. Efecto de distintos tiempos de remojo del frijol previo a la cocción sobre la reducción de la contaminación de aflatoxinas

El efecto del remojo del grano de frijol tanto rojo como negro previo a la cocción no tuvo efecto sobre la reducción de las aflatoxinas, sino más bien que la reducción en la contaminación de aflatoxinas obtenido se debió solamente al tratamiento de cocción utilizado, el cual fue la olla de cocimiento lento durante 6 horas (Cuadro 4 y Figura 7). Lo anterior, a pesar de que estas toxinas se pueden perder en el agua de remojo y son susceptibles a su descomposición en presencia de agua (hidrólisis alcalina) al ser metabolitos secundarios (Molina & Ochoa, 2015; Rosales, 2003). Por último, como se mencionó anteriormente, el patrón de AFB1 utilizado para contaminar los granos se impregnó de forma adecuada en el grano simulando una contaminación natural. Lo que mantuvo la toxina adherida al grano

durante el tiempo que se aplicó el remojo y, por lo tanto, no hubo influencia del remojo sobre la reducción de estas toxinas.

9. Conclusiones

Las variedades de frijol de color rojo tienen menor susceptibilidad a la contaminación por aflatoxinas producidas por *A. flavus* y esto está probablemente asociado a los polifenoles del grupo de los flavonoides y los ácidos hidroxibenzoicos presentes en el grano, los cuales tienen propiedades antifúngicas. En cambio, las variedades de color negro tienden a ser más susceptibles a la contaminación por aflatoxinas y se correlacionan positivamente a polifenoles del grupo de los ácidos fenólicos. Los polifenoles más correlacionados con la inhibición de la producción de aflatoxinas por *A. flavus* fueron la catequina y el ácido 4-hidroxibenzoico.

En cuanto a los tratamientos de cocción, todos los métodos utilizados redujeron las aflatoxinas presentes en los granos, aunque en mayor medida el cocimiento lento, ya sea por 6 u 8 horas. El factor determinante fue el tiempo de exposición del grano a la fuente de calor. Por último, el remojo de los granos de frijol previo a la cocción no es un factor que influye en la reducción de la contaminación de aflatoxinas en frijol.

10. Recomendaciones

Para estudios futuros, se recomienda repetir el ensayo de la capacidad toxigénica de *A. flavus* con granos producidos y almacenados en las mismas condiciones desde campo, ya que las variedades utilizadas no fueron facilitadas desde un mismo manejo agronómico y puede haber prácticas que afecten la susceptibilidad postcosecha de los granos. Se recomienda, además, realizar la contaminación natural de los granos desde invernadero o campo para determinar el efecto de los diferentes métodos de cocción, ya que así sería una situación más similar a lo que ocurre naturalmente.

11. Referencias bibliográficas

- Abdolshahi, A., Monzajeb, L., Salehi, B., Sharifi-Rad, M., Ghobakhloo, S., Iriti, M., & Shafiri-Rad, J. (2018). Antifungal activities of coating incorporated with *Saccharomyces cerevisiae* cell wall mannoprotein on *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin production in pistachio (*Pistacia vera* L.). *Journal of Food safety*, 39(2), Article e12608. <https://doi.org/10.1111/jfs.12608>
- Acosta-Estrada, B., Gutiérrez-Urbe, J., & Serna-Saldívar, S. (2014). Bound phenolics in foods, a review. *Food Chemistry*, 152, 46–55. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.093>
- Aguilar, R., & Juep, W. (2018). *Determinación de la actividad antifúngica in vitro del extracto hidroalcohólico de las flores de Tropaeolum majus L. “mastuerzo” frente a Sporothrix schenckii*. [Tesis Profesional, Universidad Privada Antonio Guillermo Urrello]. Repositorio Institucional. <http://repositorio.upagu.edu.pe/handle/UPAGU/605>
- Altamirano, J. (2019). *Aflatoxinas AFMI en Leche de Consumo: Aspectos Toxicológicos y Metodológicos de Evaluación Pericial*. [Trabajo final para obtener el título de Especialista en Criminalística y Actividades Periciales, Universidad Nacional de Córdoba]. Repositorio digital UNC. <https://rdu.unc.edu.ar/handle/11086/14126>
- Alves Dos Santos-Ciscon, B., van Diepeningen, A., da Cruz Machado, J., Eleutéria Dias, I., & Waalwijk, C. (2019). *Aspergillus* species from Brazilian dry beans and their toxigenic potential. *International Journal of Food Microbiology*, 292, 91-100. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.12.006>
- Arantes, L. (2011). *Estudo da atividade antidermatofítica de protocatecuatos contra T. rubrum e T. interdigitale*. [Tesis Posgrado, Universidade Estadual Paulista - UNESP]. Repositorio Institucional UNESP. <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/94784?locale-attribute=en>

- Asociación de fabricantes de harinas y sémolas de España, S. (2015). Recomendaciones para la prevención, el control y la vigilancia de las micotoxinas en las fábricas de harinas y sémolas. *Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente Secretaría General Técnica*. [En línea]. <http://publicacionesoficiales.boe.es>.
- Belščak-Cvitanović, A., Durgo, K., Huđek, A., Bačun-Družina, V., & Komes, D. (2018). Overview of polyphenols and their properties. *Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications*, 3–44. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813572-3.00001-4>
- Brilhante, R., Sales, J., Pereira, V., Castelo-Branco, D., Cordeiro, R., de Souza, C., Paiva, M., dos Santos, J., Sidrim, J., Rocha, M. (2017). Research advances on the multiple uses of *Moringa oleifera*: A sustainable alternative for socially neglected population. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 10(7), 621–630. <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2017.07.002>
- Broberg, A., Jacobsson, K., Strom, K., & Schnurer, J. (2007). Metabolite profiles of lactic acid bacteria in grass silage. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(17), 5547–5552. <https://doi.org/10.1128/aem.02939-06>
- Broughton, W.J., Hernández, G., Blair, M., Beebe, S., Gepts, P., & Vanderleyden, J. (2003). Beans (*Phaseolus* spp.) – model food legumes. *Plant and Soil*, 252, 55–128. <https://doi.org/10.1023/A:1024146710611>
- Calisaya, M., & Pinto, J. (2018). *Aflatoxinas en cereales comercializados a granel en mercados del distrito de Villa María del Triunfo, Lima*. [Tesis de licenciatura, Universidad Inca Garcilaso de la Vega]. Repositorio de la Universidad Inca Garcilaso de la Vega. <http://repositorio.uigv.edu.pe/handle/20.500.11818/3238>
- Carranza-Mesén, F., Blanco-Meneses, M., Granados-Montero, M., & Viñas, M. (2022). *Aspergillus* species associated with grains of groundnuts (*Arachis hypogaea* L.) and common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivated in Costa Rica. *Agronomía Mesoamericana*, 33 (Especial), 50810. <https://doi.org/10.15517/am.v33iEspecial.50810>

- Carvajal, M. (2013). Transformación de la aflatoxina B1 de alimentos, en el cancerígeno humano, aducto AFB1-ADN. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 16(2), 109–120. [https://doi.org/10.1016/s1405-888x\(13\)72082-5](https://doi.org/10.1016/s1405-888x(13)72082-5)
- Cáceres, I., Colorado, R., Salas, E., Muñoz, L., & Hernández, L. (2014). Actividad antifúngica *in vitro* de extractos acuosos de especias contra *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*, *Geotrichum candidum*, *Trichoderma* spp., *Penicillium digitatum* y *Aspergillus niger*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 31(2), 105-112.
- Castillo, J., & Zambrano, C. (2020). Estudio del contenido de aflatoxinas en distintas variedades de fréjol (*Phaseolus vulgaris* L.), considerando las características de manejo en la cadena agroalimentaria para determinar riesgo alimentario. [Trabajo de titulación, Universidad de las Fuerzas Armadas]. Repositorio Institucional de la Universidad de las Fuerzas Armadas. <http://repositorio.espe.edu.ec/handle/21000/22286>
- Chen, P., Bozzo, G., Freixas-Coutin, J., Marcone, M., Pauls, P., Tang, Y., Zhang, B., Liu, R., Tsao, R. (2015). Free and conjugated phenolic compounds and their antioxidant activities in regular and non-darkening cranberry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seed coats. *Journal of Functional Foods*, 18, 1047–1056. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.10.032>
- Cota, D. (2021). *Actividad biológica de extractos vegetales para el control de Fusarium solani, Rhizoctonia solani y Phytophthora capsici en cultivo de chile*. [Tesis, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro]. Repositorio digital Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/handle/123456789/47826>
- de Luna-López, M., Valdivia-Flores, A., Jaramillo-Juárez, F., Reyes, J., Ortiz-Martínez, R., & Quezada-Tristán, T. (2013). Association between *Aspergillus flavus* colonization and aflatoxins production in immature grains of maize genotypes. *Journal of Food Science and Engineering*, 88-698. <https://doi.org/10.17265/2159-5828/2013.12.007>

- Da Silva, C., de Andrade, J., de Sousa, R., Figueiredo, N., Sampaio, L., Magalhães, H., Cavalcanti, B., Gaspar, D., de Andrade, G., Pampolha, I., de Barros, G., de Moraes, M., Pinto, M., Barbosa, T., Nobre Júnior, H. (2013). Synergistic effect of the flavonoid catechin, quercetin, or epigallocatechin gallate with fluconazole induces apoptosis in *Candida tropicalis* resistant to fluconazole. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(3), 1468–1478. <https://doi.org/10.1128/aac.00651-13>
- Divakara, S. T., Aiyaz, M., Chandra Nayaka, S., & Chandra, N S. (2017). Effect of toxigenic *Aspergillus flavus* and aflatoxins on seed quality parameters of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Microbial Biosystems Journal*, 2(1), 1-8. <https://doi.org/10.21608/mb.2017.5252>
- Dutra, T. (2021). *Síntese e avaliação antimicrobiana de diésteres derivados cinâmicos*. [Programa de PósGraduação, Universidade Federal da Paraíba]. Repositorio Institucional da UFPB. <https://repositorio.ufpb.br/jspui/handle/123456789/23490>
- Espinosa-Alonso, L., Lygin, A., Widholm, J., Valverde, M., & Paredes-Lopez, O. (2006). Polyphenols in Wild and Weedy Mexican Common Beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(12), 4436–4444. <https://doi.org/10.1021/jf060185e>
- García, Y. (2016). *Compuestos fenólicos y actividad antioxidante en testa y grano de 54 poblaciones nativas de frijol común (Phaseolus vulgaris L.)*. [Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias Alimentarias, Universidad Veracruzana]. <https://www.uv.mx/mca/files/2018/01/L.-N.-Yatzil-Denih-Garcia-Diaz.pdf>
- García-Lafuente, A., Moro, C., Manchón, N., Gonzalo-Ruiz, A., Villares, A., Guillamón, E., Rostagno, M., Mateo-Vivaracho, L. (2014). In vitro anti-inflammatory activity of phenolic rich extracts from white and red common beans. *Food Chemistry*, 161, 216–223. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.04.004>
- García-Mateos, M., Acosta-Ramos, M., Rodríguez-Pérez, E., Vásquez-Sánchez, J., & Hernández-Ramos, L. (2021). Extractos naturales para el control de *Colletotrichum*

- gloeosporioides in vitro*, en periodo de floración y poscosecha del fruto de *Carica papaya*. *Polibotánica*, 51, 213-228. <https://doi.org/10.18387/polibotanica.51.14>
- Garrido-Ramírez, E., Hernández-Gómez, E., Espinosa-Paz, N., Camas-Gómez, R., Quiroga-Madrigal, R., Rincón-Espinosa, M., & Farrera-Ruíz, L. (2018). Identificación de hongos y micotoxinas asociadas a granos de café (*Coffea* L.) en Chiapas, México. *Agro Productividad*, 11(12), 57-64. <https://doi.org/10.32854/agrop.v11i12.1307>
- Gepts, P., Aragão, F.J.L., Barros, E., Blair, M.W., Brondani, R., Broughton, W., Galasso, I., Hernández, G., Kami, J., Lariguet, P., McClean, P., Melotto, M., Miklas, P., Pauls, P., Pedrosa-Harand, A., Porch, T., Sánchez, F., Sparvoli, F., & Yu, K. (2008). Genomics of *Phaseolus* beans, a major source of dietary protein and micronutrients in the tropics. In Moore, P.H.; Ming, R. (eds.). *Plant Genetics and Genomics: Crops and Models*. New York, NY, Springer p. 113-143.
- Granados-Chinchilla, F., Molina, M., Chavarría, G., Alfaro-Cascante, M., Bogantes-Ledezma, D., & Murillo-Williams, A. (2017). Aflatoxins occurrence through the food chain in Costa Rica: Applying the One Health approach to mycotoxin surveillance. *Food Control*, 82, 217-226. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.06.023>
- Guzmán, S., Acosta, J., Álvarez, M., García, S., & Loarca, G. (2002). Calidad alimentaria y potencial nutracéutico del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). *Agricultura Técnica en México*, 28(2), 159-173.
- Hamad, G., Mehany, T., Simal-Gandara, J., Abou-alella, S., Esua, O., Abdel-Wahhab, M & Hafez, E. (2023). A review of recent innovative strategies for controlling mycotoxins in foods. *Food Control*, 144, 109350. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.109350>
- Hernández-Fonseca, J., Chaves-Barrantes, N., Araya-Villalobos, R., & Rosas-Sotomayor, J. (2021). “Surú”: Variedad de frijol común de grano blanco (Raza Mesoamérica). *Agronomía Costarricense*, 45(1), 9-18. <https://doi.org/10.15517/rac.v45i1.45658>

- Hitokoto, H., Morozumi, S., Wauke, T., Sakai, S., & Kurata, H. (1981). Fungal contamination and mycotoxin producing potential of dried beans. *Mycopathologia*, 73, 33-38. <https://doi.org/10.1007/BF00443011>
- Hussain, M., Khan, M., Hussain, N., & Habib, T. (2011). Antibacterial and antifungal potential of leaves and twigs of *Viscum album* L. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(23), 5545-5549.
- Jard, G., Liboz, T., Mathieu, F., Guyonvarc'h., & Lebrihi, A. (2011). Review of mycotoxin reduction in food and feed: from prevention in the field to detoxification by adsorption or transformation. *Food Additives and Contaminants*, 28(11), 1590-1609. <https://doi.org/10.1080/19440049.2011.595377>
- Kakkar, S., & Bais, S. (2014). A Review on Protocatechuic Acid and Its Pharmacological Potential. *ISRN Pharmacology*, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2014/952943>
- Klich, M. A. (2002). Identification of common *Aspergillus* species (1st ed.). Centraalbureau Voor Schimmelcultures.
- Kumari, P., Gogoi, R., Srinivasa, N., & Shekhar, M. (2021). Characterization of aflatoxigenic *Aspergillus flavus* associated with aflatoxin B1 (AFB1) production in maize Kernel in India. *Indian Phytopathology*, 74, 103-112. <https://doi.org/10.1007/s42360-020-00292-1>
- Latimer, G. (2016). Official methods of analysis of AOAC International. AOAC International, 20(1).
- Lazo, W. (1991). Antimicrobianos producidos por plantas. *Boletín Micológico*. 6(1-2), 37-39.
- Lux, P., Freiling, M., Stuetz, W., von Tucher, S., Carle, R., Steingass, C., & Frank, J. (2020). (Poly)phenols, carotenoids, and tocopherols in corn (*Zea mays* L.) kernels as affected by phosphate fertilization and sowing time. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b07009>

- Luz, C. (2020). *Actividad antifúngica y antitoxigénica in vitro y en alimentos de bacterias ácido lácticas*. [Tesis doctoral internacional, Universidad de Valencia]. Servicio de Bibliotecas RODERIC de la Universidad de Valencia. <https://roderic.uv.es/handle/10550/75462>
- Matei, P., Buzón-Durán, L., Pérez-Lebeña, E., Martín-Gil, J., Ramos-Sánchez, M., Martín-Ramos, P., & Iacomí, B. (2019). *Actividad antifúngica contra Fusarium culmorum de los extractos de hojas de Stevia rebaudiana y sus combinaciones con extractos de semillas de Silybum marianum y Lycium barbarum* (No. COMPON-2019-agri-3456).
- Marroquín-Cardona, A., Johnson, N.M., Phillips, T.D., & Hayes, A.W. (2014). Mycotoxins in a changing global environment – A review. *Food and Chemical Toxicology*, 69, 220-230. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.04.025>
- Martínez, M., Vargas del Río, L., & Gómez, V. (2013). Aflatoxinas: incidencia, impactos en la salud, control y prevención. *Biosalud*, 12(2), 89-109. <https://revistasoj.s.ucaldas.edu.co/index.php/biosalud/article/view/4698>
- Mojica, L., Meyer, A., Berhow, M., & de Mejía, E. (2015). Bean cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.) have similar high antioxidant capacity, in vitro inhibition of α -amylase and α -glucosidase while diverse phenolic composition and concentration. *Food Research International*, 69, 38–48. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.12.007>
- Molina, M., & Ochoa, M. (2015). *Caracterización del proceso tradicional del pelado de maíz con ceniza a ser utilizado como estrategia de detoxificación de aflatoxinas y fumonisinas. Caso de estudio: Nabón–Ecuador*. [Tesis previa a la obtención del título de Bioquímica Farmacéutica, Universidad de Cuenca]. Repositorio Institucional UCUENCA. <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/29634>
- Okereke, V. (2020). Impact of water activity and temperature on the growth and aflatoxin production by two toxigenic isolates of *Aspergillus flavus* on ginger. *Journal of Spices and Aromatic Crops*, 29(1), 72-77. <https://doi.org/10.25081/josac.2020.v29.i1.6154>

- Omotayo, O., Omotayo, A., Mwanza, M., & Babalola, O. (2019). Prevalence of mycotoxins and their consequences on human health. *Toxicological Research*, 35(1), 1–7. <https://doi.org/10.5487/TR.2019.35.1.001>
- Palou, A., Anadón, A., Calderón, V., Rubio, J., Barea, M., Espín de Gea, J., Barberán, F. (2008). Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en relación con la aplicación de luz UVC para la inducción de compuestos bioactivos en uvas. *Revista del Comité Científico de la AESAN*, 7, 15-30.
- Peña-Betancourt, S., & Conde-Martínez, V. (2012). Contenido de aflatoxinas y proteína en 13 variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 3(1), 201-206. <https://www.scielo.org.mx/pdf/remexca/v3n1/v3n1a14.pdf>
- Presidencia de la República, & Ministerio de salud (1999, junio 7). Decreto 27980-S: Fija el nivel máximo de aflatoxinas permitido en maíz (*Zea mays*), arroz (*Oryza sativa*), frijol (*Phaseolus vulgaris*), trigo (*Triticum aestivum*) y otros cereales, oleaginosas y leguminosas. *Sistema Costarricense de Información Jurídica*. http://www.pgrweb.go.cr/scij/Busqueda/Normativa/Normas/nrm_texto_completo.aspx?param1=NRTC&nValor1=1&nValor2=57488&nValor3=63078&strTipM=TC
- Ramos, A., Marín, S., Molino, F., Vila, P., & Sanchis, V. (2020). Las micotoxinas: El enemigo silencioso. *ARBOR Ciencia, Pensamiento y Cultura*, 196(795), Artículo a540. <https://doi.org/10.3989/arbor.2020.795n1004>
- Roig, M. (2013). *Descontaminación de micotoxinas emergentes mediante el procesado de alimentos*. [Tesis doctoral, Universidad de Valencia]. Servicio de Bibliotecas RODERIC de la Universidad de Valencia. <https://roderic.uv.es/handle/10550/32542>
- Rojas, J., Chacón-Cruzado, M., Castañeda-Peláez, L., & Díaz-Tello, A. (2021). Cuantificación de aflatoxinas carcinogénicas en alimentos no procesados y su implicación para el consumo en Lima, Perú. *Nutrición Hospitalaria*, 38(1), 146-151. <https://dx.doi.org/10.20960/nh.03240>

- R Core Team. (2022). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing. <https://www.R-project.org/>
- RStudio Team (2022). *RStudio: Integrated Development for R*. *RStudio*. <http://www.rstudio.com/>
- Rolim, P. (2022). Potencial antifúngico, antioxidante e irritativo do óleo de citronela (*Cymbopogon nardus*) associado ao éster fenetil do ácido cafeico (CAPE). [Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”]. Repositorio Institucional Unesp. <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/237479>
- Romero-Cortes, T., Pérez, V., López, P., Rodríguez-Jimenes, G., Robles-Olvera, V., Aparicio, J., & Cuervo-Parra, J. (2019). Antifungal activity of vanilla juice and vanillin against *Alternaria alternata*. *CyTA - Journal of Food*, 17(1), 375–383. <https://doi.org/10.1080/19476337.2019.1586776>
- Rosales-López, C. (2003). *Optimización del proceso de bioseparación de compuestos fenólicos a partir de dos variedades de frijol negro (Phaseolus vulgaris L.), maíz azul (Zea mays L.) y jamaica (Hibiscus sabdariffa L.)*. [Tesis, Tecnológico de Costa Rica]. Repositorio TEC. <https://repositoriotec.tec.ac.cr/handle/2238/233>
- Rosas, I., Hernández, F., Palomo, L., Martínez, S., Ascacio, J., & Rodríguez, R. (2021). Polifenoles de diferentes fuentes vegetales y su efecto in vitro contra patógenos del garbanzo. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 12(8). <https://doi.org/10.29312/remexca.v12i8.2742>
- Sancho, D. (2016). *Capacidad de producción de aflatoxinas de aislamientos de Aspergillus provenientes del cultivo de frijol y su relación con el tamaño de los esclerocios*. [Tesis de licenciatura, Universidad de Costa Rica]. Repositorio Institucional de la Universidad de Costa Rica. <https://www.kerwa.ucr.ac.cr/handle/10669/76803>
- Serrano-Colli, H., & Cardona-Castro, N. (2015). Mycotoxicosis and mycotoxins: generalities and basic aspects. *Revista CES Medicina*, 29(1), 143-152. <http://www.scielo.org.co/pdf/cesm/v29n1/v29n1a12.pdf>

- Soriano del Castillo, J. (2007). *Micotoxinas en alimentos*. Ediciones Díaz de Santos.
<https://www.editdiazdesantos.com/wwwdat/pdf/9788479788087.pdf>
- Suman, M. (2021). Last decade studies on mycotoxins' fate during food processing: an overview. *Current Opinion in Food Science*, 41, 70–80.
<https://doi.org/10.1016/j.cofs.2021.02.015>
- Trejo-Márquez, M., Vargas-Martínez, M., Sánchez-Soto, A., Lira, A., Pascual-Bustamante, S., Granados, G., Villavicencio, A. (2015). Extracción de compuestos bioactivos de plantas del desierto mexicano para su aplicación en envases activos para zarzamora. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 16(1), 101-107.
- Troestch, J., & Vega, A. (2019). Control de los niveles de micotoxinas del arroz consumido en Panamá, como parámetro de inocuidad. *Revista Plus Economía*, 7(1), 32-42.
<http://revistas.unachi.ac.pa/index.php/pluseconomia/article/view/286>
- Valerín, J. (2019). *Informe situacional granos básicos 2012-2019: Frijol-Maíz*. Ministerio de Agricultura y Ganadería de Costa Rica.
<http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/E16-11088.pdf>
- Vargas, A., Watler, W., Morales, M., & Vignola, R. (2018). *Prácticas efectivas para la reducción de impactos por eventos climáticos en Costa Rica. Cultivo de frijol*. Ministerio de Agricultura y Ganadería de Costa Rica.
<https://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/F01-8160.pdf>
- Vogelgsang, S., Sulyok, M., Bänziger, I., Krska, R., Schuhmacher, R., & Forrer, H. (2008). Effect of fungal strain and cereal substrate on *in vitro* mycotoxin production by *Fusarium poae* and *Fusarium avenaceum*. *Food Additives and Contaminants*, 25(6), 745-757. <https://doi.org/10.1080/02652030701768461>
- Weber, F., & Passon, M. (2019). Characterization and Quantification of Polyphenols in Fruits. *Polyphenols in Plants*, 111–121. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813768-0.00007-4>

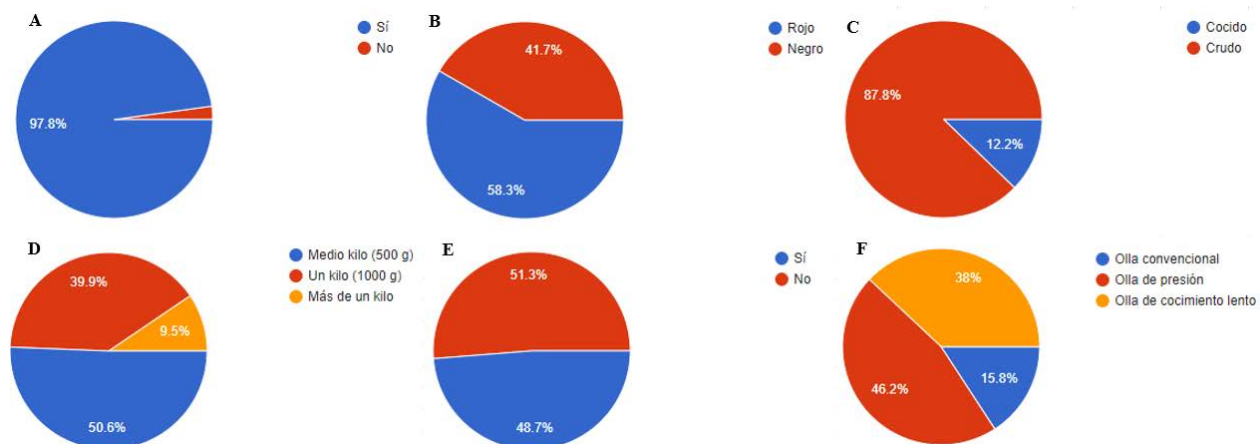
- Xoca-Orozco, L., Zamora-Gasga, V., Espinosa-Alonso, G., Velázquez-Estrada, R., López-García, U., Sáyago-Ayerdi, S., & Chacón-López, A. (2018). Actividad antioxidante y antifúngica *in vitro* de extractos de carambola (*Averrhoa carambola* L.). *Biotecnia*, 20(2), 104-109.
- Yang, Q., Gan, R., Ge, Y., Zhang, D., & Corke, H. (2018). Polyphenols in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.): Chemistry, analysis, and factors affecting composition. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12391>
- Zamorano, P., Morales, M., & Rojano, B. (2018). Composición Química Proximal, Capacidad Antioxidante y Actividad Antifúngica de Peciolo de Nalca (*Gunnera tinctoria*). *Información Tecnológica*, 29(2), 185–194. <https://doi.org/10.4067/s0718-07642018000200185>

12. Anexos

Anexo 1. Aflatoxinas totales de los testigos absolutos de las variedades de frijol para determinar la capacidad toxigénica de *A. flavus*. Luego de la incubación durante 15 días a 30°C con agua estéril en lugar de esporas.

Variedad	Aflatoxinas totales (µg/kg)
Surú	0,07
Mantequilla	1,45
Nambí	0,30
Guaymí	1,27
Chánguena	0,00
Cabécar	0,00
Generalito	0,00
Brunca	0,00
Tayní	0,22
Matambú	0,50
Ingrato	0,00

Anexo 2. Resultados de la encuesta realizada durante el primer semestre del 2023 con una población de 184 personas respecto al consumo de frijol en grano (A), preferencia de coloración del frijol (B), forma de adquirirlo (C), cantidad de grano al cocinar (D), uso del remojo previo a la cocción (E) y el tipo de olla para su cocción (F).



Anexo 3. Aflatoxinas totales de los granos de frijol comerciales utilizados para determinar el efecto de la cocción y el remojo.

Frijol comercial	Aflatoxinas totales ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Negro	0,000
Rojo	0,012

Anexo 4. Concentración de aflatoxinas totales en frijol contaminado con esporas de *A. flavus*, luego de incubación por 8 o 15 días a diferentes temperaturas. Laboratorio de Micotoxinas del Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS) de la Universidad de Costa Rica. San Pedro de Montes de Oca, San José, Costa Rica, 2022.

Prueba	Frijol comercial	Concentración de solución de esporas (esp/ μ l)	Solución de esporas (μ l)	Temperatura ($^{\circ}$ C)	Concentración de aflatoxinas totales (μ g/kg)	
					8 días	15 días
1	Negro/Rojo	2	500	26	0,0	0,0
				30	0,0	0,0
2	Negro	20	1000	30	0,0	0,0
		200			0,0	0,0
3	Rojo	200	2000	30	133,4 \pm 179,1	8,45 \pm 3,61
			3000		11,6 \pm 13,3	2,05 \pm 1,20
4	Negro	200	3000	30	0,0	0,0
	Rojo				0,0	0,0

Anexo 5. Porcentaje de recuperación de aflatoxinas totales en frijol rojo contaminado de forma artificial con un patrón puro de AFB1 en benceno:acetonitrilo (98:2) y preparado con diferentes disolventes (agua y metanol), Laboratorio de Micotoxinas del Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS) de la Universidad de Costa Rica. San Pedro de Montes de Oca, San José, Costa Rica, 2022.

Prueba	Enriquecimiento	Porcentaje de recuperación (%)
1	AFB1	130 \pm 42
2	Agua + AFB1	112 \pm 23
	Metanol + AFB1	85,1 \pm 37,3

Anexo 6. Porcentaje de recuperación de aflatoxinas totales (%) en grano de frijol enriquecido con un patrón de AFB1 (500 ng/ml) puro, contemplando el efecto de dilución en la cocción, Laboratorio de Micotoxinas del Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS) de la Universidad de Costa Rica. San Pedro de Montes de Oca, San José, Costa Rica, 2022.

Variedad	Porcentaje de recuperación (%)
Negro	70,4
Rojo	65,4