



# Universidad Nacional Autónoma de México

---

Facultad de Química

DETERMINACION DE AFLATOXINAS EN EL GRANO DE CACAO

## Tesis Mancomunada

MA. MARGARITA MURILLO MURILLO  
IRMA OLIVIA DOMINGUEZ RUIZ

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

1 9 8 3



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## INDICE GENERAL

<u>TEMA</u>	<u>PAGINA</u>
I.- Introducción	
1.1 Objetivo	1
1.2 Presentación del tema	1
II.- Generalidades	
2.1 El Cacao	4
2.2 Composición química del grano de Cacao	6
2.3 Etapas de beneficiado del Cacao	9
2.4 Factores que influyen en el desarrollo de hongos y producción de lycotoxinas	10
2.5 Aflatoxinas	14
2.6 <u>Aspergillus flavus</u>	27
III.- Materiales y Métodos	
3.1 Muestreo	30
3.2 Prueba de Jerte	30
3.3 Determinación de humedad	32
3.4 Preparación de la muestra y obtención del extracto	34
3.5 Purificación del extracto de Aflatoxinas por cromatografía en columna	36
3.6 Preparación de patrones	38
3.7 Cromatografía en capa fina	40

<u>TEMA</u>	<u>PAGINA</u>
IV.- Parte experimental	
4.1 Determinación de Aflatoxinas a grano de cacao almacenado	44
4.2 Determinación de Aflatoxinas a grano de cacao incubado a 27°C y 85% de HR	47
4.3 Determinación de Aflatoxinas a grano de cacao inoculado con una cepa de <u>Aspergillus flavus Link</u>	48
V.- Resultados y discusión	
5.1 Determinación de Aflatoxinas a grano de cacao almacenado	50
5.2 Determinación de Aflatoxinas a grano de cacao incubado a 27°C y 85% de HR	51
5.3 Determinación de Aflatoxinas a grano de cacao inoculado con una cepa de <u>Aspergillus flavus Link</u>	53
VI.- Conclusiones y Recomendaciones	55
VII.- Bibliografía	57

## I.- INTRODUCCION

### 1.1 OBJETIVO

El objetivo fundamental de este trabajo, consiste en la determinación de aflatoxinas por cromatografía en placa fina, presentes en el grano de cacao lavado sin fermentar; establecer la relación que pueda existir entre la presencia de aflatoxinas y el porcentaje de grano mohoso.

### 1.2 PRESENTACION DEL TEMA

El enmohecimiento del cacao es uno de los defectos más graves del grano, no solo por el sabor a humedad que causan, sino por las toxinas que producen. Entre los hongos que comunmente causan enmohecimiento del cacao se encuentran: Aspergillus ochraceus, A. flavus, A. parasiticus, A. glaucus, A. niger y diversos Penicillium.

Las condiciones ambientales tanto como la naturaleza del sustrato son factores muy importantes para el crecimiento de estos hongos.

Aspergillus flavus es considerado un microorganismo cosmopolita presente en el suelo, sobre materia orgánica y sobre alimentos diversos, así como semillas, especialmente oleaginosas.

Se ha encontrado que algunas cepas de Aspergillus flavus y A. parasiticus son las más importantes productoras de aflatoxinas. (46).

Las aflatoxinas son un grupo de metabolitos secundarios altamente tóxicos, que pueden producir daños fisiológicos y estados patológicos, en el hombre y diversos animales. Estudios realizados recientemente establecen una relación entre la frecuencia de cáncer en el hígado y el consumo de alimentos contaminados con aflatoxinas en ciertas regiones de Africa. Siendo también capaces de causar daños a nivel genético como mutagenicidad y teratogenicidad; esto es, la producción de anomalías y monstruosidades en el organismo. (30).

El cacao y el chocolate son artículos de la dieta común y de lujo en muchos países. Contiene proteína y grasa que proporcionan un alto contenido energético en relación con su volumen y peso. La elaboración de la almendra de cacao durante su manufactura tiene como propósito principal la producción de chocolate comestible, cacaos para bebidas, cocoa y manteca de cacao que se usa en la elaboración de cosméticos y preparaciones farmacéuticas, ésta constituye alrededor del 56 por ciento de las almendras de un buen cacao. (5, 11).

En México el consumo de productos que provienen del cacao es razonable, 25.4 miles de toneladas, por lo que puede llegar a ser para la población una fuente de intoxicación. Por esto, consideramos necesario que se lleven a cabo controles periódicos que determinen la presencia y el nivel de contaminación en el grano de cacao.(20)

## II.- GENERALIDADES

### 2.1 EL CACAO

El árbol de cacao *Theobroma L.* es una planta americana típica del trópico, se extiende espontáneamente por la cuenca Amazónica, la zona del Caribe y la del Pacífico - Centroamericano. Pertenecce al estrato inferior de los bosques bajos, donde predominan condiciones de calor, sobra y humedad específicos.(12, 51).

Ha sido cultivado desde tiempos prehispánicos por los indios del Sur y Centroamérica. Los españoles que llegaron a México en el siglo XVI encontraron al cacao como un producto establecido, lo que indicaba que había sido cultivado mucho tiempo atrás.(51).

Los cacaos cultivados se clasifican en dos grandes grupos que son: Criollo y Forastero. Esta clasificación muy justificada tanto por las formas y demás características del fruto, como por el origen inmediato de dichas variantes.

**Criollo:** Es el cacao cultivado en Venezuela, el fruto es grande, alargado, rugoso, con surcos acentuados, corteza delgada, el color va desde amarillo dorado al rojo oscuro, lo que sirve para diferenciar subtipos.

El grano es grande, cotiledón blanco a violeta pálido, la pulpa es muy dulce. En este sentido resulta ser - el grano de mejor calidad.

Forastero: Pertenecen a este grupo los cacaos corrientes del Brasil y Africa Occidental, así como el cacao Nacional del Ecuador y variedades cultivadas en América Central y del Sur. La mazorca es generalmente amarilla, de formas variables, de cáscara gruesa y difícil de cortar. Granos más o menos aplastados con cotiledones de color púrpura subido. Este tipo de cacao representa el - 80% de la producción mundial.

Hay un tercer tipo de cacao que se denomina "Trinitario", que proviene de la hibridación de cacao criollo y forastero. El cacao trinitario tiene gran variabilidad, su producto, la mazorca y el grano presentan caracteres - que si por un lado les hace aproximarse a los criollos - por otro a los forasteros. Este tipo de cacao proporciona del 10-15% de la producción mundial y se cultiva básicamente en todos los países donde anteriormente se cultivaba el criollo (México, América Central, Trinidad, Colombia y Venezuela). Su calidad es mejor que la del forastero y su vigor y resistencia mejor que la de los criollos. (4, 35).

En México se producen 38.250 miles de toneladas, esto representa el 2.7% de la producción mundial, y se exportan 4.31 miles de toneladas, que representan el 0.40% de la producción mundial. (20).

## 2.2 COMPOSICION QUIMICA DEL GRANO DE CACAJO

La composición química del cacao tiene, además de un interés teórico, aplicaciones inmediatas, puesto que con su conocimiento se obtiene una aproximación de los productos extraídos del suelo con la cosecha; de las necesidades de fertilizantes de una tierra; de las carencias o límites tóxicos de algunos alimentos; de la utilización de diversos subproductos para combustibles; abonos y materia prima para la industria de la fermentación, etc.

De acuerdo a los datos citados por Harrison (Cuadro I), se puede deducir el alto poder nutritivo del cacao y por lo tanto, de su derivado el chocolate, que se encuentra enriquecido con azúcares, que le convierten en un alimento de gran valor energético.

La riqueza en vitaminas de un producto directamente derivado del cacao, como es el polvo de cacao, en el que se ha reducido el contenido de grasas del grano al 22%, - se señala a continuación, refiriéndose a 100 gr del producto. (35).

CUADRO I (35).

Vitamina A .....	41	u.i.
" B <sub>1</sub> (tiamina) .....	0,09	mg
" B <sub>2</sub> (riboflavina) .....	0,25	mg
" B <sub>5</sub> (ácido nicotínico) ...	0,09	mg

El grano de cacao propiamente dicho tiene cantidades apreciables de otras vitaminas; especialmente la cútícula contiene de 28 a 35 u.i. de vitamina D (calciferol) en 1 gr.

El gérmen del grano, que como los gérmenes de muchas semillas tiene concentrados muchos compuestos, encierra un aceite con un contenido en Betacaroteno (provitamina A) del orden de las 800 a 1400 u.i. en 1 gr; - también contiene este aceite una gran cantidad de calciferol.

## CUADRO II (35).

Composición del grano fresco de cacao, según Harrison.

Dato	Cáscara %	Cotiledones %	Cutícula y pulpa %
Agua .....	84,5	36,6	83
Celulosa digestible .....	4	2,8	6,6
Fibras leñosas .....	5,3	0	0
Albuminoides .....	1	4,8	0,3
Materia nitrogenada .....	0	2,8	0,05
Grasa .....	0,1	30,6	0,4
Glucosa .....	0	0,9	0,1
Sacarosa .....	1	0,2	1
Almidón .....	0,4	6	1,3
Materias astringentes ...	0,2	4,9	0,1
Pectina .....	1	1,4	1,1
Rojo de cacao .....	0,6	1,5	0,7
Teobromina .....	0,1	0	0
Lignina .....	0	3,5	2,5
Cafeína .....	0	0,2	0
Acido tartárico libre ...	0,3	0	0,6
Acido acético libre .....	0,1	0	indicios
Acido tartárico comb .....	0,6	0,5	0,35
Peróxido de hierro .....	0,01	0,03	0,01
Magnesio .....	0,1	0,45	0,07
Cal .....	0,04	0,11	0,03
Potasa .....	0,36	0,64	0,25
Sosa .....	0,07	0,07	0,01
Sílice .....	0,01	0,02	0,01
Anhídrido sulfúrico .....	0,03	0,05	0,03
Anhídrido fosfórico .....	0,1	1,05	0,01
Cloro .....	0,03	0,03	0,06

2.3 ETAPAS DE BENEFICIADO DEL CACAO

Para que el cacao sea apto para su comercialización y almacenamiento debe ser sometido a diferentes etapas de beneficio que tienen como fin, mejorar su calidad, convertirlo en un producto conservable, de fácil transporte y - que posea las cualidades de aroma y sabor que dan todo su valor comercial, para su posterior utilización en las industrias de la alimentación, de las grasas y farmacéuticas. (51).

Estas etapas son:

- a) Recepción. El cacao llega a los fermentadores, generalmente en bolsas de polietileno dentro de sacos de yute o henequén que permiten su fácil manejo.
- b) Selección. Tiene como fin rechazar el cacao, - que por sus características no este en condiciones de ser fermentado así como seleccionar los granos que por su estado de madurez, riqueza de pulpa, antigüedad de corte, - etc. deban ser fermentados por separado.
- c) Fermentación. Facilita la eliminación de la pulpa y mejora los caracteres organolépticos del grano a consecuencia de una fermentación interna estimulada por la - elevación de temperatura exterior.

c) Secado. Con la disminución de la humedad del grano hasta un grado que cree un medio poco susceptible al ataque de insectos.

e) Clasificación. Hecha a mano ó en máquinas, tiene como meta presentar comercialmente el producto de tal manera que sea lo más homogéneo posible, tanto en su forma y color como en su tamaño.

Se almacena el grano una vez que ha sido envasado - en costales de henequén o de polietileno. Las bodegas - deben ser construídas de manera que la humedad del grano sea lo más baja posible tomando en cuenta las condiciones locales. Los sacos deben colocarse sobre estantes, para evitar el contacto con el suelo o las paredes del edificio, ya que estas deben ser rociadas periódicamente con insecticidas. La ventilación debe ser perfectamente regulable y debe impedirse la entrada de roedores y aves al almacén. (37)

#### 2.4 FACTORES QUE INFLUYEN EN EL DESARROLLO DE HONGOS Y PRODUCCION DE MYCOTOXINAS.

Entre los principales factores, que influyen para el desarrollo de hongos estan: Humedad, temperatura, ai reacción, el sustrato y el período de incubación en el sustrato.

El componente ambiental de mayor control crítico para el crecimiento de hongos es la humedad. (49).

Los hongos son capaces de desarrollarse en productos con bajo contenido de humedad, donde las bacterias requieren mayores niveles. En base a sus necesidades de humedad los hongos pueden agruparse en tres amplias categorías:

a) Hongos de campo. Son los que invaden las semillas en desarrollo a madurar mientras están en la planta. Esta invasión se presenta en las semillas con 25 y 30% de humedad. Cuando se ha cosechado el grano, estos hongos detienen su desarrollo, debido a que los niveles de humedad en el grano han bajado. Entre estos hongos se pueden citar a Diplodia, Fusarium, Nigrospora, Helminthosporium, y Alternaria.

b) Hongos de almacén. Son aquellos encontrados en las semillas a las condiciones de humedad normalmente encontradas en grano almacenado del 13 al 18%. Estas son principalmente las especies de Aspergillus y Penicillium.

Los miembros de Aspergillus glaucus, generalmente predominan al 13 ó 15% de humedad, mientras que por arriba del 15% predominan Aspergillus flavus y A. ochraceus.

Forman sus vegetaciones en los pliegues de los cotiledones, cubriéndolos casi siempre de color verde grisáceo. En vista de esto es recomendable que el grano sea secado al mínimo contenido de humedad dentro de las 24 - horas después de la cosecha para retardar y evitar el crecimiento de estos hongos. El período de almacenamiento - es otro factor importante para la conservación del grano; si el período de almacenamiento es largo, el contenido de humedad deberá ser bajo. También debe tomarse en cuenta la condición inicial del producto en cuanto a su estado físico y biológico, ya que los granos dañados físicamente serán más propensos al ataque por hongos, y su período de almacenamiento se verá reducido.

c) Hongos de descomposición avanzada. Requieren - condiciones similares de humedad como los hongos de campo - pero raramente se desarrollan en semillas en el campo.

(6).

La humedad relativa y el contenido de agua del sustrato influyen de manera importante en el crecimiento y - producción de mycotoxinas. Las cantidades óptimas tienen valores similares para cada especie de hongo en sustratos naturales.

Aspergillus flavus, es un hongo mesófilo, ya que sus

requerimientos mínimos de agua para crecer están entre - 80 y 90% de humedad relativa, teniendo como cantidad mínima para la germinación de las esporas de los hongos 80% de HR, y el valor mínimo para la esporulación 85% de HR.

Temperatura. La temperatura más favorable para su desarrollo esta entre 23 y 27°C, las temperaturas mayores de 48°C matan al hongo o lo obligan a producir esporas resistentes.

Aireación. Los hongos son organismos aeróbicos, pero existen diferencias significativas en sus necesidades de oxígeno. La composición del ambiente gaseoso influye en las reacciones fisiológicas de los hongos y por lo tanto en la síntesis de metabolitos. Aspergillus flavus es muy flexible en cuanto a su tolerancia a altas concentraciones de bióxido de carbono, oxígeno y nitrógeno, tolerando también bajas concentraciones de oxígeno.

Sustrato. Es otro factor importante en el crecimiento del hongo y la producción de mycotoxinas. Se ha reportado que los sustratos naturales dan mayores rendimientos en la producción de aflatoxinas que los sustratos artificiales. Entre los sustratos naturales los que soportan mayor producción de aflatoxinas se encuentran: avellanas,

semillas de algodón, trigo, arroz, cacahuate, soya y maíz sustratos con alto contenido de carbohidratos así como - oleaginosas. (9).

## 2.5 AFLATOXINAS

Las aflatoxinas son un grupo de metabolitos secundarios, producidos por ciertas cepas de Aspergillus flavus y A. parasiticus. Esta toxina es una mezcla de diversos compuestos, cuatro de los cuales pudieron ser aislados en un estado puro, y demostrar que son tóxicos en diversos - animales. (Ver cuadro III).

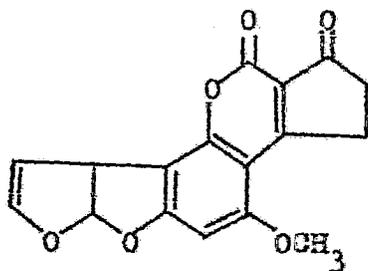
La separación de las cuatro sustancias fué hecha en base al color de su fluorescencia y de su relativa movilidad cromatográfica (Rf), y fueron llamadas:  $B_1$ ,  $B_2$ ,  $G_1$  y  $G_2$ , existen además las toxinas  $M_1$  y  $M_2$  que son derivados hidroxilados de  $B_1$  y  $B_2$ , y las aflatoxinas  $B_{2a}$  y  $G_{2a}$  derivados con grupos hidroxilos en la posición C-2 del anillo furano, siendo hemiacetales de  $B_1$  y  $G_2$  respectivamente.

Observadas bajo luz ultravioleta en un cromatograma que contiene extractos de aflatoxinas, la fluorescencia - individual que presentan es:

B <sub>1</sub>	- - - - -	Azul
B <sub>2</sub>	- - - - -	Azul
G <sub>1</sub>	- - - - -	Verde
G <sub>2</sub>	- - - - -	Verde-azul
M <sub>1</sub>	- - - - -	Azul-violeta
M <sub>2</sub>	- - - - -	Violeta

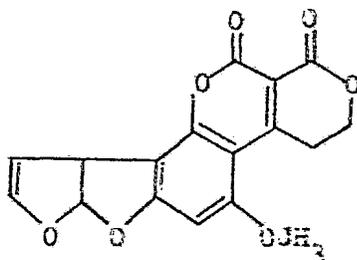
Con respecto a la toxicidad que presentan, B<sub>1</sub> es la más tóxica, siguiendo en orden decreciente: M<sub>1</sub>, G<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, - M<sub>2</sub> y G<sub>2</sub>. (7, 24).

Estudios de resonancia magnética nuclear de aflatoxina B<sub>1</sub>, mostraron que cuatro moléculas de hidrógeno se - juntaron a dos moléculas de carbono adyacentes al anillo ciclopentanona; de esta forma se propuso la que es ahora aceptada como la estructura de aflatoxina B<sub>1</sub>. (29).



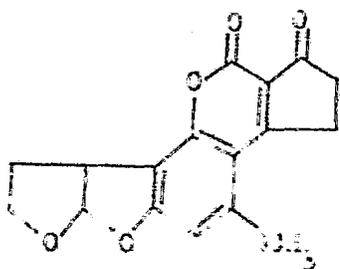
Aflatoxina B<sub>1</sub>

La estructura de  $G_1$ , es muy similar a la de  $B_1$ , pero tiene dos funciones lactona en vez de una, ésta estructura fué confirmada realizando análisis de rayos x.

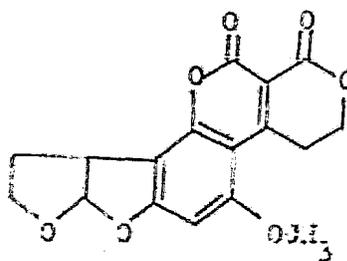


Aflatoxina  $G_1$

Las aflatoxinas  $B_2$  y  $G_2$ , son dihidroderivados de  $B_1$  y  $G_1$ . Ellos pueden ser sintetizados por reducción de la doble ligadura en el tercer 1 del anillo dihidrofurano.

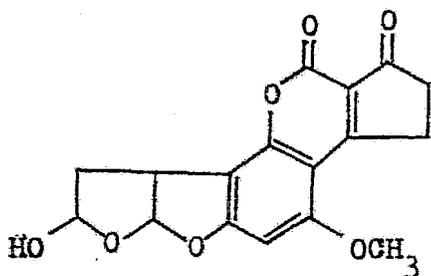
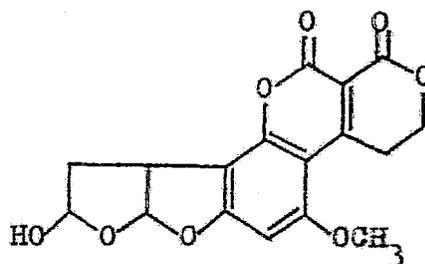


Aflatoxina  $B_2$

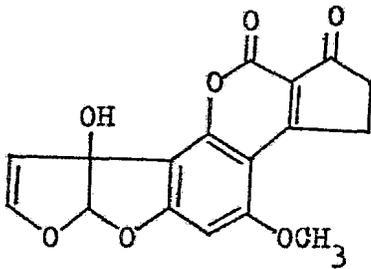
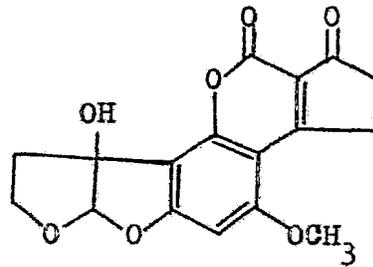


Aflatoxina  $G_2$

Más tarde se identificaron dos nuevas aflatoxinas, - una con fluorescencia azul y otra con fluorescencia verde que en base a sus Rf bajo luz UV, así como a estudios de su espectro de resonancia magnética nuclear se pudo ver - que eran 2-hidroxy derivados de aflatoxina B<sub>2</sub> y G<sub>2</sub>, y se les llamo: Aflatoxina B<sub>2a</sub> y G<sub>2a</sub>. Estos dos compuestos - son de 60 a 100 veces menos tóxicos que B<sub>1</sub>. Sus estructuras son las siguientes:

Aflatoxina B<sub>2a</sub>Aflatoxina G<sub>2a</sub>

Existen otras dos aflatoxinas, pero solo se ha logrado identificar su presencia en la leche y estas son:  $M_1$  y  $M_2$  y comunmente se les denomina como toxinas de la leche. Su estructura es la siguiente:

Aflatoxina  $M_1$ Aflatoxina  $M_2$

La estructura química de las aflatoxinas hace aparecer tres elementos esenciales:

1.- Son derivados de la cumarina, poseen una función lactona. Esta función es relativamente frágil y puede fácilmente hidrolisarse en un medio alcalino, por lo que, las moléculas que han perdido esta función por hidrólisis son desprovistas de su actividad.

2.- Poseen un agrupamiento bifurano que asegura una gran rigidez en una extremidad de la molécula, que presenta por este hecho una estructura practicamente plana, permitiendo interacciones específicas con ciertos componentes tisulares como el hígado principalmente.

3.- Algunas de ellas poseen una doble unión a la extremidad de los agrupamientos furánicos. Esta doble unión puede estar oxidada dando a la molécula la posibilidad de transformar en uniones covalentes las interacciones contraídas. Un cierto número de aflatoxinas, las del tipo - dos ( $B_2$ ,  $G_2$ ), no poseen esta doble unión. (17).

## METABOLISMO DE LAS AFLATOXINAS.

Introducidas en el organismo estas moléculas son objeto de numerosas transformaciones metabólicas, algunas de estas provocan la destrucción de la molécula, por la abertura de un ciclo donde la hidrólisis nos da la función lactona, y conducen a una detoxificación. Algunas de las aflatoxinas se fijan sobre moléculas, por lo que se hidroxilan y conduce a la formación de  $M_1$ , que puede ser fácilmente excretada en orina y heces. (10)

Otras transformaciones metabólicas son aquellas que afectan la doble ligadura 1,2 y que conducen a productos susceptibles de fijarse a las macromoléculas (ácidos nucleicos y proteínas) y pueden ser considerados como metabolitos activos. (29).

Muchos sistemas biológicos pueden ser usados para demostrar el alto grado de toxicidad de las aflatoxinas, y de todos estos sistemas probados, el cultivo de tejidos, embriones de pollo y huevos de molusco son los más sensibles.

En células embrionarias de pulmón pudo ser estudiado el mecanismo de acción de las aflatoxinas, encontrándose que inhibe la síntesis de DNA en la mitosis, incrementando la formación de células gigantes y vacuolización. (10).

Esta acción específica de las aflatoxinas sobre el - DNA merece una gran consideración como un peligro potencial al hombre, causando a grandes dosis inhibición total de biosíntesis y a dosis bajas progresivas afecta diferentes sistemas como:

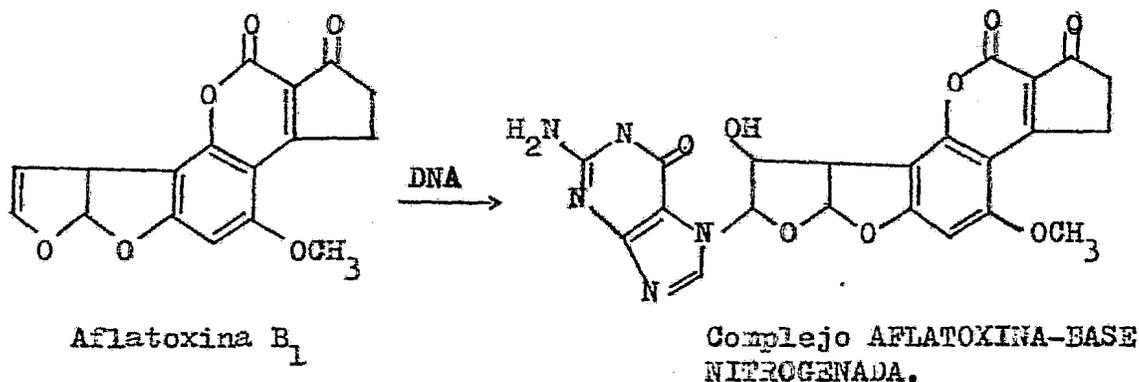
- 1.- Interacción con DNA e inhibición de las polimerasas, responsables de la síntesis de DNA y RNA.
- 2.- Supresión de la síntesis de DNA.
- 3.- Reducción de síntesis de RNA e inhibición del - RNA mensajero.
- 4.- Alteraciones morfológicas en el núcleo.
- 5.- Reducción de biosíntesis de proteínas.

#### INTERACCION CON DNA.

Ha sido demostrado que las aflatoxinas pueden unirse a DNA causando un cambio en su espectro característico.

La aflatoxina B<sub>1</sub>, biológicamente la más activa, se une más fuertemente que G<sub>1</sub> ó G<sub>2</sub>. Basado esto en la interacción de aflatoxinas con purinas y derivados de purinas detectadas espectroscópicamente. Se ha visto que existe una relación preferencial con el anillo de purina. (29).

El enlace de Aflatoxina-DNA es débil, ya que el simple paso a través de una columna de Sephadex disocia el complejo.



La inhibición de la biosíntesis de Ac. nucléicos puede ser por inactivación de la síntesis del sistema enzimático, o porque las moléculas de DNA presentes no actúan - mas como modelos adecuados para su duplicación. (29).

La enfermedad causada por la acción de estas toxinas es llamada Aflatoxicosis y fué reconocida y descrita en animales de granja, como pavos, pollos, patos, etc.

Los primeros signos clínicos de la aflatoxicosis son inapetencia y pérdida de peso, reducida eficiencia alimenticia, susceptibilidad al magullamiento, coagulación sanguínea desigual, respuesta inmune alterada; resultando fallas en la vacunación y aumenta la susceptibilidad a los agentes infecciosos y capacidad disminuída para resistir el stress. Pocos días antes de su muerte el animal parece torpe o paralizado, desarrolla ataxia y finalmente muere. (6, 49).

El más importante efecto patológico es el daño hepático; la lesión macroscópica consiste en una palidez o de coloración del hígado y microscópicamente en una proliferación de las células epiteliales de los conductos biliares. Se ha observado mayor sensibilidad a las aflatoxinas, en los animales de granja más jóvenes. La siguiente tabla ofrece una revisión de las concentraciones de aflatoxinas, que producen toxicosis. (Cuadro III).

## CUADRO III. (49).

CONCENTRACION DE AFLATOXINAS EN LA DIETA  
QUE CAUSA TOXICOSIS

Especie	Edad	Contenido de Aflatox (ppm)	Duración de la alimentación	Efectos
Berneros	Destete	0.2 a 2.2	16 semanas	Raquitismo, - muerte y daños en hígado
Novillas	2 años	0.2 a 0.7	20 semanas	Lesiones hepáticas.
Vacas	2 años	2.4	7 meses	Lesiones hepáticas.
Cerdos	Recién nacidos	0.23	4 días	Raquitismo.
Cerdos	2 semanas	0.17	23 días	Anorexia, raquitismo, ictericia.
Cerdos	4-6 semanas	0.4 a 0.7	3-6 meses	Raquitismo, lesiones hepáticas.
Pollas	1 ó más semanas	0,8	10 semanas	Raquitismo, lesiones hepáticas.
Patas	Desconocida.	0.3	6 semanas	L. hepáticas, muerte.

En el siguiente cuadro se muestra la clasificación de diversas toxinas, y sus efectos sobre los mamíferos. Puede notarse el gran potencial perjudicial que tienen.

Toxina o síndrome	Hongo productor	Alimento afectado	Efectos después de la ingestión
Grupo ASPERGILLUS			
Aflatoxinas	<u>A. flavus</u> <u>A. parasiticus</u>	Granos, Oleaginosas, frijoles, nueces.	Cáncer hepático en ciertos animales y posiblemente en humanos. Toxicidad.
Sterigmatocistina.	<u>A. nidulans</u> <u>A. versicolor</u>	Cereales.	Toxicidad, cáncer hepático en ratas.
Ochratoxinas	<u>A. ochraceus</u>	Cereales, café verde.	Toxicidad renal en ratas.
Grupo PENICILLIUM			
Buteoskirina	<u>P. islandicum</u>	Arroz.	Toxicidad, posible carcinógeno en ratas.
Patulina	<u>P. articeae</u> <u>P. claviformis</u>	Manzanas y sus productos.	Dieta, toxicidad renal en ratas.

Toxina o síndrome	Hongo productor	Alimento afectado	Efectos después de la ingestión
<p data-bbox="161 548 400 578">Grupo FUSARIUM</p> <p data-bbox="161 612 347 642">Zearalenona</p> <p data-bbox="161 817 400 942">Aleuquia tóxica alimentaria (ATA)</p> <p data-bbox="161 1135 379 1208">Epoxi-tricotecanos 12, 13.</p>	<p data-bbox="445 612 617 642"><u>Gibberella</u></p> <p data-bbox="445 817 631 942"><u>F. sporotrichoides.</u> <u>F. poae.</u></p> <p data-bbox="445 1135 680 1357"><u>Fusarium sp</u> <u>Trichoderma sp</u> <u>Gliocladium sp</u> <u>Tricotehecium sp.</u></p>	<p data-bbox="711 612 781 642">Maíz</p> <p data-bbox="711 817 845 942">Sorgo y otros cereales</p> <p data-bbox="711 1135 845 1260">maíz y otros cereales</p>	<p data-bbox="907 612 1177 783">Exceso de estrógenos en cerdas y animales de laboratorio.</p> <p data-bbox="907 817 1177 1081">Leucopenia debida al daño a médula ósea, hasta 60% mortandad en epidemias en humanos.</p> <p data-bbox="907 1135 1187 1447">Colapso cardiovascular, retardo en coagulación sanguínea, leucopenia. Puede relacionarse con ATA en humanos.</p>

## 2.6 Aspergillus flavus.

Es uno de los hongos que atacan a las gramíneas y - oleaginosas durante su almacenamiento, invadiéndolas frecuentemente. (1, 44).

Las siguientes especies del género Aspergillus productoras de aflatoxinas, fueron descritas por Raper y - Fennell en 1965.

Aspergillus parasiticus

Aspergillus tamaris

Aspergillus oryzae

Aspergillus flavus var. columnaris

Aspergillus parasiticus var. globosus

Aspergillus flavus

Son productoras de aflatoxinas en sustratos naturales (granos, semillas, alimentos o pasturas de origen biológico).

Aspergillus flavus se encuentra clasificado de la siguiente manera:

Phylum	Eumycetes u Hongos verdaderos.
Clase	Deuteromicetos.
Orden	Moniliales.
Familia	Moniliaceae.
Género	Aspergillus. Existen según Raper y Fennell 14 grupos.

Características distintivas de Aspergillus (29) :

- Mohos septados.
- No poseen esporas sexuales.
- Conidióforos libres que surgen del micelio irregularmente.
- Micelio claro o sin coloración.
- Son muy abundantes.
- Micelio ramificado, sin colorear generalmente.
- Las hifas aéreas son fértiles.
- Las hifas sumergidas son vegetativas.
- Colonias a menudo circulares.
- El conidióforo o pedículo puede ser septado o no y surge de la célula basal.
- El conidióforo en la porción distal se hincha formando una vesícula que sirve de soporte a los esterignas de los que se desprenden los conidios.
- Conidios generalmente en cadenas, de color verde, marrón o negro.

Entre las características más importantes que distinguen a Aspergillus flavus, se encuentran las siguientes:

- El esterigma es típicamente biseriado.

- Conidios altamente ramificados.
- Conidióforos con paredes fuertes.
- Conidióforos muy ásperos y rugosos.
- Presencia de esclerocia.

### III.- MATERIALES Y METODOS

#### 3.1 MUESTREO

-Materiales:

Galador de mano.

Bolsas de polietileno.

Separador cónico.

-Método:

De un lote de 200 sacos, se toman granos al azar de una tercera parte del lote (66 sacos), ayudados de un galador de mano, el cual se inserta primero por la parte superior, central e inferior.

Se combina esta muestra de aproximadamente 10 Kg. y se mezclan cuidadosamente. Para obtener una muestra final del lote, se reduce por cuarteo con un separador cónico, hasta tener aproximadamente 1 Kg. (32).

#### 3.2 PRUEBA DE CORTE AL GRANO.

-Materiales:

Tabla de madera.

Guantes de plástico.

Navajas cutter.

Lámpara de luz de 60 w.

-Método:

Reducir la muestra de laboratorio de 1 Kg, por cuarteo o por medio de un separador adecuado a 300 granos, y desechar los granos restantes de la muestra.

Cortar longitudinalmente esos 300 granos por el centro, con objeto de que se exponga al máximo la superficie de los cotiledones.

Una vez abierto el grano se analiza bajo una lámpara de luz de 60 w, examinando visualmente las mitades de cada grano.

Se cuantifican visualmente los siguientes defectos:

- 1.- Granos con moho.
- 2.- Granos dañados por insectos.
- 3.- Granos germinados.
- 4.- Granos aplastados o pachas.
- 5.- Granos rotos.

Este orden de gravedad se toma en cuenta cuando un grano esta defectuoso en más de un aspecto. Tomándose en cuenta solo el defecto más grave. (34).

### 3.3 DETERMINACION DE HUMEDAD.

#### -Materiales:

Mortero que permite el molido de los granos sin calentamiento.

Horno ventilado (Marca Transite Oven Blue M single Wall), temperatura  $103 \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

Cajas con tapadera de vidrio con una superficie efectiva mínima de  $35 \text{ cm}^2$ .

Desecador.

Balanza analítica (Marca Sauter K G D7470) con precisión de 0.0001 gr.

#### -Método:

Mezclar cuidadosamente el lote de muestra, y obtener por cuarteo aproximadamente 10 gramos de granos de cacao. Moler estos granos en un mortero durante un minuto, de tal manera que las dimensiones de las partículas mayores no excedan de 5 mm, evitando la formación de una pasta.

Es conveniente moler los granos individualmente, colocándolos en el mortero uno a uno y pasarlos una vez molidos, a un recipiente hermético.

Pesar la caja vacía y su tapadera, estando perfectamente limpias y secas, se colocan rápidamente dentro de ella la porción de prueba que debe abarcar toda la super-

ficie. Cubrir la caja con su tapadera y pesar con aproximación de 0.0001 gramo.

La caja conteniendo la muestra se coloca en el horno a  $103 \pm 2^{\circ}\text{C}$  junto con la tapadera, manteniéndola durante  $16 \pm 1$  hora, procurando no abrir el horno.

Después de este tiempo, sacar la caja y cubrirla inmediatamente con su tapadera y colocarla en un desecador. Pesarla aún cubierta con aproximación de 0.0001 gr cuando haya enfriado a temperatura ambiente.

El contenido de humedad de la muestra expresada como porcentaje es igual a :

$$( P_1 - P_2 ) \times \frac{100}{P_1 - P_0}$$

Donde:

$P_0$  = peso en gramos de la caja vacía con su tapadera.

$P_1$  = peso en gramos de la caja, tapadera y porción de prueba antes del secado en el horno.

$P_2$  = peso en gramos de la caja, tapadera y porción de prueba después del secado en el horno.

Se efectúan dos determinaciones y se toma como resultado la media aritmética de las dos. (33).

También se empleó una determinación rápida, por lo cual tiene ciertas limitantes en cuanto a precisión. Es una balanza de humedad, conocida como GENCO, la cual funciona a base de una lámpara de rayos infra-rojos, contiene un platillo interior, donde se coloca el cacao previamente molido, dejando a exposición la muestra ante los rayos infra-rojos durante 8 minutos a una intensidad de 120 en la escala del GENCO. Tiempo después del cual se registra la lectura directamente como porcentaje de humedad. La precisión del aparato es de  $\pm 0.2\%$ .

#### 3.4 PREPARACION DE LA MUESTRA Y OBTENCION DEL EXTRACTO.

-Reactivos:

n-hexano.

Solución de  $\text{AgNO}_3$  al 25%.

Cloroformo ( $\text{CHCl}_3$ ).

-Materiales:

Espátula.

Probetas de 25 y 250 ml.

Vasos de precipitados de 400 ml.

Cartuchos de papel filtro para extracción.

Matraces Erlenmeyer de 250 y 500 ml con tapón esmerilado.

Embudos para polvo y estriados.

Embudos de separación de 125 y de 250 ml con llave de teflón.

Papel filtro de filtración rápida.

Pipetas de 10 ml graduadas.

**-Aparatos e instrumentos:**

Refrigerador congelador.

Licuadaora a prueba de explosiones.

Balanza.

Aparato extractor Soxhlet.

Agitadora mecánica.

**-Método:**

Se pulverizan 100 gramos de grano en licuadaora a prueba de explosiones, mezclando bien para homogeneizar el polvo y tomar una muestra para el análisis.

Para efectuar la extracción se toma una muestra de 50 gramos de cacao pulverizado, y se coloca dentro de un cartucho para extracción, desengrasando con n-hexano durante 3 horas en el aparato Soxhlet, con una velocidad de sifón de 4 a 5 por hora.

El contenido del cartucho se invierte a un matraz de 500 ml con tapón de vidrio esmerilado raspando el residuo con una espátula, y se deja secar durante una noche.

Se adicionan 25 ml de solución de  $\text{Ag NO}_3$  al 25% mezclando hasta quedar uniforme y se agregan 250 ml de cloroformo. Se coloca el tapon al matraz y se agita durante 30 minutos en una agitadora mecánica a velocidad baja.

En seguida se filtra la capa de cloroformo a través de un papel filtro plegado y recolectar los primeros 25 ml del extracto clorofórmico.

Este extracto se agita en un matraz Erlenmeyer de 250 ml conteniendo 7.5 ml de  $\text{Ag NO}_3$  al 25% durante 15 minutos en una agitadora mecánica.

Verter la mezcla a través de un embudo de separación de 250 ml dejando que las dos capas se formen bien y se recolectan 50 ml de la fase clorofórmica.(2).

### 3.5 PURIFICACION DEL EXTRACTO DE AFLATOXINAS POR CROMATOGRAFIA EN COLUMNA.

-Reactivos:

Sulfato de sodio anhidro.

Cloroformo.

Gel de sílice para cromatografía en columna.

n-hexano.

Eter anhidro.

Mezcla metanol-cloroformo (3 : 97).

-Materiales:

Lana de vidrio.

Columna para cromatografía de 2.2 cm de diámetro por 30 cm de longitud con llave de teflón y reservorio - de 250 ml.

Cuerpos de ebullición.

Soporte universal.

Anillo.

Frascos viales de 10 ml con tapon de hule.

-Aparatos e instrumentos:

Balanza con 0.1 gramos de sensibilidad.

-Método:

Se prepara la columna para cromatografía colocando - en el fondo una capa de lana de vidrio con 1 cm de espesor aproximadamente, no muy compacta. Se adicionan 5 gr de sulfato de sodio anhidro y se agrega cloroformo hasta la mitad de la columna. Se añaden en seguida 10 gramos - de gel de sílice para cromatografía en columna, se deja a que asiente drenando algo de cloroformo.

Se adicionan lentamente 15 gramos de sulfato de sodio anhidro y se drena el cloroformo hasta este nivel.

Una vez preparada así la columna se agregan los 50 ml del extracto clorofórmico obtenidos anteriormente, y se procede a eluir a velocidades de 10 a 20 ml por minu-

to con 150 ml de n-hexano, después con 150 ml de éter anhidro desechando ambos.

Se eluye finalmente las aflatoxinas con 150 ml de la mezcla metanol-cloroformo (3 : 97). Esta fracción se recoge en un matraz y se agregan cuerpos de ebullición para evaporar casi hasta sequedad en un baño de vapor y una corriente suave de nitrógeno.

Este residuo se transfiere cuantitativamente a un frasco vial con pipeta Pasteur adicionando cloroformo. Se evapora a sequedad cuidadosamente bajo una corriente de nitrógeno suave, dejando en seguida a que esté a temperatura ambiente para sellar el frasco vial con tapon de hule y debe conservarse en congelación y protegido de la luz, para la cromatografía en capa fina. (2).

### 3.6 PREPARACION DE PATRONES.

#### -Reactivos:

Aflatoxin Qualitative Kit (4X 10 µG), La Jolla Scientific Company.

Mezcla benceno-acetonitrilo  $\text{CH}_3\text{CN}$  (98 : 2).

Cloroformo ( $\text{CHCl}_3$ ).

Metanol ( $\text{MeOH}$ ).

#### -Aparatos e instrumentos:

Vortex.

Refrigerador.

**-Método:**

Se usa como guía la declaración de la etiqueta del - Kit de aflatoxinas, sobre la masa de estas. Agregar al re- cipiente de aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> secas el volumen de mezcla benceno-CH<sub>3</sub>CN (98 : 2), calculado para dar una - concentración de 10 microgramos por mililitro.

Agitar vigorosamente la solución durante un minuto en el vortex.

Diluir para la aplicación, una alícuota de cada una - de las soluciones de aflatoxinas de 10 microgramos por mi- lilitro, hasta la concentración de 1.0 microgramos de afla- toxinas B<sub>1</sub>, G<sub>1</sub> por mililitro y 0.5 microgramos de aflatoxi- nas B<sub>2</sub>, G<sub>2</sub> por mililitro.

Para preparar la solución patrón de trabajo, mezclar soluciones de los patrones de aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> de 10 microgramos por mililitro, diluyendo con mezcla ben- ceno-CH<sub>3</sub>CN (98 : 2) hasta dar la concentración de 1.0 y - 0.5 microgramos de aflatoxinas B<sub>1</sub>, G<sub>1</sub>, y B<sub>2</sub> y G<sub>2</sub> por mili- litro respectivamente.

Utilizar esta solución para la aplicación en placa.

### 3.7 CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA.

#### -Reactivos:

Mezcla benceno-acetonitrilo (98 : 2).

Mezcla acetona-clorofórmo (1 : 9).

Soluciones patrón de aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>

Aflatoxin Qualitative Kit (4X 10.1G). La Jolla Scientific Company.

#### -Materiales:

Pipetas de 200 microlitros.

Jeringas de 10 microlitros.

Probetas de 50 ml.

Tanque para cromatografía en capa fina de 23x23x9 cm con tapa.

Cromatofolios AL para cromatografía en capa fina de 20x20 cm. con espesor de 0.1 mm activada durante una hora a 110°C.

#### -Aparatos e instrumentos:

Lámpara de luz UV de 15 w de onda larga.

Cámara oscura.

Horno para temperatura de 80 a 110°C.

Solde marcador para facilitar la aplicación.

Vortex.

-Método:

Al frasco vial que contiene el extracto de aflatoxinas purificado por cromatografía en columna de la muestra problema se le adicionan 200 microlitros de mezcla benceno cloroformo (98 : 2) y se agita bien para disolver el contenido en el vortex.

Se toma con una jeringa de 10 microlitros de muestra, se colocan alícuotas de 2, 5 y 10 microlitros sobre una línea que diste 4 cm del borde inferior de la placa para cromatografía.

En la misma placa se aplican alícuotas de un patrón de trabajo de aflatoxinas ( $B_1$ ,  $B_2$ ,  $G_1$ ,  $G_2$ ) de 2, 5 y 10 microlitros.

En la cubeta de la cámara para cromatografía se colocan 50 ml de mezcla acetona cloroformo (1 : 9), saturando alrededor con agua de modo que provea 2 cm de profundidad a la cámara, como se indica en la figura siguiente:

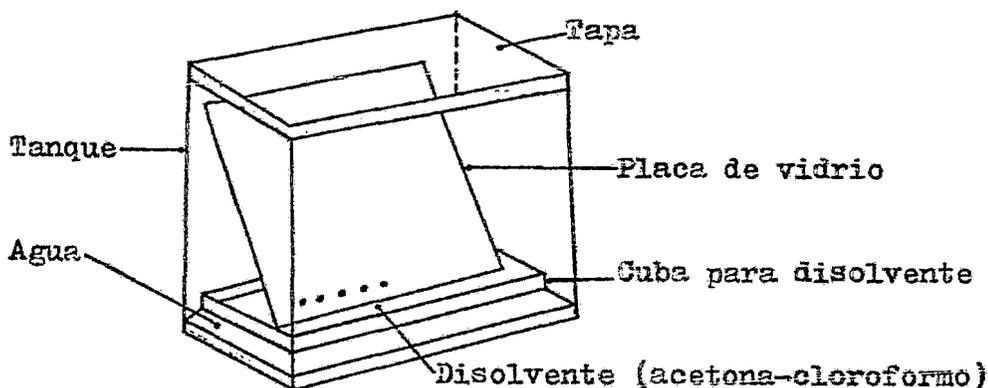


Fig. 1

Después de hacer las aplicaciones en la placa se introduce inmediatamente a la cámara y sellarla, manteniéndola protegida de la luz.

El cromatograma se deja correr durante 40 minutos a temperatura de 23 a 25°C, debe desplazarse el disolvente 14 cm aproximadamente por encima del origen. Después de este tiempo se saca la placa dejando evaporar el disolvente a temperatura ambiente.

Se coloca la placa dentro de una cámara oscura y se ilumina por la parte superior con una lámpara de luz UV - de onda larga.

Se observan las manchas fluorescentes de los patrones de aflatoxinas. El orden de Rf es decreciente y va de B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, y G<sub>2</sub> (0.7, 0.6, 0.5, 0.4, respectivamente).

La fluorescencia que presentan estas manchas, es azul para las que corresponden a B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> y un verde pálido las de G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>.

Una vez identificadas las cuatro manchas del patrón - de aflatoxinas, en base a su Rf y a la fluorescencia, se comparan directamente con las manchas de los extractos de las muestras problemas, en la misma placa. (2).

Expresión de resultados:

El contenido de la aflatoxina  $B_1$ , expresado en microgramos por kilogramos, se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$C = \frac{(S) \times (Y) \times (V)}{(X) \times (W)}$$

Donde:

- C = Microgramos por kilogramos de la aflatoxina  $B_1$ .
- S = Microlitros del patrón de aflatoxina  $B_1$ , de intensidad de fluorescencia igual a la mancha de la muestra problema.
- Y = Concentración de la aflatoxina  $B_1$  en el citado patrón en microgramos por mililitro.
- V = Volúmen en microlitros de la dilución final del extracto de aflatoxinas de la muestra.
- X = Microlitros aplicados del extracto de la muestra de aflatoxinas, que proporcionan una intensidad de fluorescencia igual a la S (patrón de aflatoxinas  $B_1$ ).
- W = Masa de la muestra, expresada en gramos, aplicada a la columna (10 gramos si se utilizaron 50 ml de extracto de cloroformo). (2)

#### IV.- PARTE EXPERIMENTAL

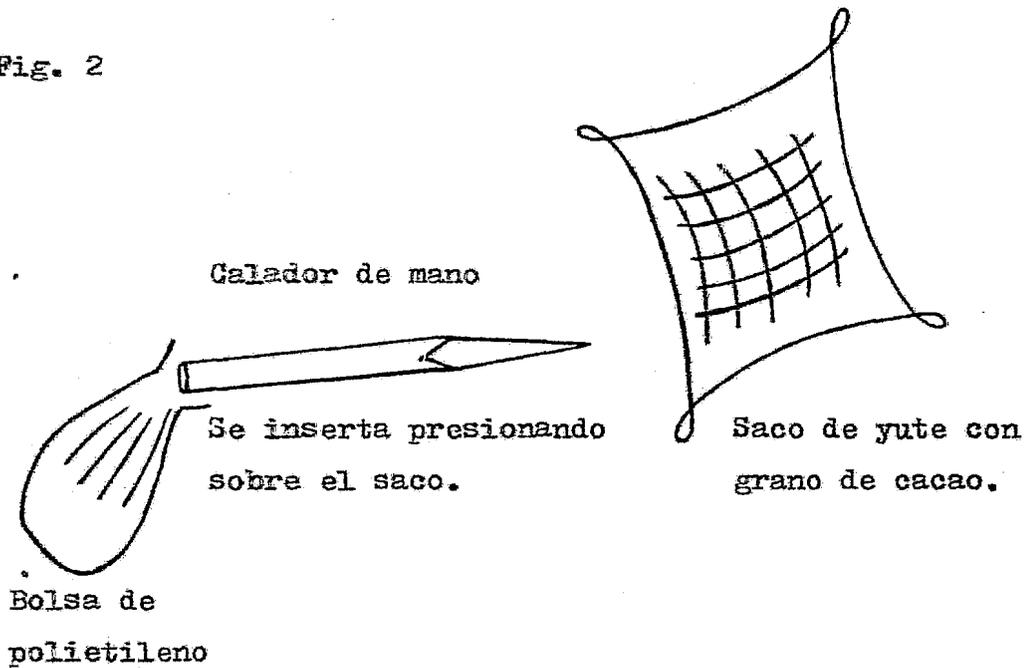
##### 4.1 DETERMINACION DE AFLATOXINAS A GRANO DE CACAO ALMACENADO.

El cacao que llega a la bodega de la Comisión Nacional del Cacao, proviene del Estado de Chiapas (Región Norte y Sur). Este cacao y el producido por el Estado de Tabasco, son los que proveen de materia prima a toda la Industria chocolatera en México. De ahí la importancia de realizar un análisis de aflatoxinas a este grano.

A) Muestreo. Se muestrearon 10 lotes (un lote consta de aproximadamente 200 sacos). De cada lote, se muestrea la tercera parte de los sacos, según sea el número de sacos que forme dicho lote. El muestreo se realizó en la bodega México Pantitlán de la Comisión Nacional del Cacao de la Ciudad de México.

Se revisa de cuantos sacos consta el lote (esta anotado en cada lote y en la orden de muestreo). Con ayuda del calador se va recogiendo el grano de cada uno de los sacos en una misma bolsa de polietileno (Fig. 2), que contendrá por lo tanto la muestra representativa de dicho lote.

Fig. 2



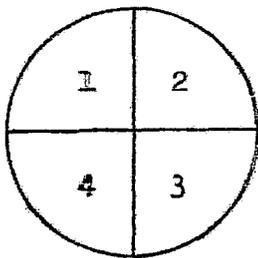
Se tomaron muestras de 10 lotes, a continuación se da una tabla de el número de sacos de cada lote y los sacos muestreados.

Lote	Número de sacos	Sacos muestreados.
1	225	67
2	185	55
3	197	59
4	210	63
5	206	61
6	192	57
7	218	65
8	212	63
9	204	61
10	195	59

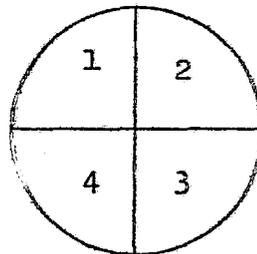
Cada bolsa contiene aproximadamente 1 Kg. de grano - de cacao, y son llevadas al laboratorio para hacer la - prueba de corte al grano.

B) Prueba de corte. Se reduce la muestra por cuarteo, hasta llegar a tener aproximadamente 300 granos. La reducción por cuarteo se efectúa formando círculos, Fig. 3

Fig. 3



1 y 3 se  
cuartean  
de nuevo



1 y 3 se  
cuartean de  
nuevo, etc.

2 y 4 se desechan

2 y 4 se desechan

Se cuarteo la muestra hasta obtener 300 granos, y - los que sobran se desechan.

Sobre una tabla de madera y bajo una lámpara de luz, se cortan los granos longitudinalmente por la mitad, con ayuda de la navaja cutter, se observan visualmente los defectos de cada uno de los granos.

C) Determinación de aflatoxinas. A cada una de las muestras se le determinó la presencia de aflatoxinas como se indica en la parte 3.4, aquí mencionaremos los pasos principales:

- 1.- Preparación de la muestra y obtención del extracto.
- 2.- Purificación del extracto por cromatografía en columna.
- 3.- Cromatografía en capa fina.

#### 4.2 DETERMINACION DE AFLATOXINAS EN GRANO DE CACAO INCUBADO A 27°C Y 85% DE HR.

A) Muestreo. Se muestreo la tercera parte de un lote de 200 sacos, de la manera que se indicó en la parte 3.1 pero la muestra obtenida de este lote fué de aproximadamente 18 Kg.

B) Inducción a la formación de moho. Para tener granos con diferentes porcentajes de moho se indujo su formación saturando 5 cámaras de plástico con humedad relativa de 85%, a temperatura de 27°C. Cada cámara contenía 3 Kg de grano de cacao perfectamente homogeneizado.

Se tomaron muestras cada tercer día durante 60 días, a las cuales se les hizo prueba de corte y determinación de humedad.

C) Análisis Microbiológico. Al hacer la prueba de - corte, se observó detenidamente el desarrollo de hongos, en particular colonias características de Aspergillus flavus.

Cuando comenzó el desarrollo de dichas colonias, se aislaron sembrando el grano en un medio Czapek con 2% de sacarosa, específico para el desarrollo de Aspergillus flavus incubando a 27°C durante una semana.

Después de este tiempo se hizo la observación microscópica, usando como colorante Azul de algodón.

Entre las características más importantes que distinguen a este grupo se encontraron las siguientes:

Los tallos relativamente largos, conidias redondas o en forma de pera, se forman aisladas o en cadena en la extremidad del esterigma, altamente ramificadas. Presencia de esterigmas primarios y secundarios.

#### 4.3 DETERMINACION DE AFLATOXINAS EN GRANO INOCULADO CON UNA CEPA DE Aspergillus flavus Link.

Para esta determinación se tomaron cuatro muestras - del mismo lote, de 100 gramos cada una, que se inocularon con una cepa conocida de Aspergillus flavus Link, productora de aflatoxinas, donada por el Departamento de Fitopa

tología del Instituto de Biología de la U.N.A.M., con el fin de ver si el cacao es un sustrato que el hongo pueda utilizar para la producción de aflatoxinas. Se colocan los granos de cacao en un frasco de 3 litros Fernbach con 75 ml de agua. Se esteriliza todo a 120 lb de presión durante 15 minutos y a una temperatura de 110°C. Después de este tiempo se agitan bien los granos procurando que no queden pegados para que cada uno absorba toda el agua.

Aparte se prepara una suspensión de esporas, haciendo una inoculación masiva de 100,000 esporas/ml de Aspergillus flavus. (42).

Se inoculan aproximadamente 30 ml en el frasco manteniendo una agitación suave pero continua. Se incuban durante 30, 45, 60 y 75 días a 27°C.

Cada muestra se preparó para llevar a cabo la extracción y purificación de aflatoxinas de acuerdo a los métodos mencionados anteriormente, determinando las aflatoxinas por cromatografía en capa fina.

Este trabajo se llevo a cabo bajo condiciones de asepsia muy estrictas, desinfectando y eliminando las toxinas en el material utilizado con hipoclorito de sodio al 5%.

## V.- RESULTADOS Y DISCUSION.

### 5.1 DETERMINACION DE AFLATOXINAS EN GRANO DE CACAO ALMACENADO.

En la prueba de corte y en la determinación de aflatoxinas se obtuvieron los resultados siguientes, como se indica en la Tabla I.

Lote	Moho %	Dañados por insectos %	Germinados %	Pachas %	Rotos %	Aflatox. (ppb)
1	2.3	0.33	2.0	6.6	1.3	-
2	1.6	0	4.3	4.6	1.6	-
3	3.6	0	3.3	6.3	3.6	-
4	1.6	1.0	2.3	7.6	3.3	-
5	4.0	0.66	3.0	5.3	1.3	-
6	4.0	0.33	1.6	6.6	2.3	-
7	3.0	0	4.0	5.0	2.6	-
8	2.6	0.66	1.3	4.3	1.0	-
9	4.3	0	2.6	6.6	2.3	-
10	3.3	0.33	2.0	7.0	3.6	-
Promedio	3.0	0.33	2.66	6.0	2.3	

(-) no detectable.

Tabla I.

5.2 DETERMINACION DE AFLÁTOXINAS A GRANO DE CACAO INCUBADO A 27°C Y 85% DE HR. Los resultados obtenidos se indican - en la Tabla II.

Tiempo de incubación en días	% de Moho	Contenido de humedad %	Colonias de <u>A. flavus</u>	Produce. Aflatox.
1	3	6.0	-	No detect.
3	5	6.2	-	" "
6	7	6.6	-	" "
9	8	6.6	-	" "
12	9	7.2	-	" "
15	10	7.4	-	" "
18	12	7.8	-	" "
21	13	8.0	Poco desarrollo.	+
24	15	8.0	lle."	+
27	16	8.2	+	+
30	19	8.4	+	+
33	21	8.5	+	+
36	28	8.8	+	+
39	36	9.0	+	+
41	45	9.4	-	No detect.
44	52	9.7	-	" "
47	64	10.2	-	" "
50	79	10.5	-	" "
53	83	10.5	-	" "
56	91	10.8	-	" "
59	97	11.5	-	" "
60	100	12.0	-	" "

Tabla II .

Como se puede observar en la Tabla II, las muestras positivas corresponden a un porcentaje de grano mohoso entre 13 y 36%, por lo cual estas muestras fueron sometidas a un análisis cuantitativo para conocer el contenido de aflatoxinas. Tabla III.

Grano mohoso %	Aflatoxinas (ppb) ug/kg.
13	8
15	20
16	33
19	40
21	32
28	25
36	20

Tabla III.

5.3 DETERMINACION DE AFLATOXINAS A GRANO INOCULADO CON -  
 UNA CEPA DE Aspergillus flavus Link a 27°C. Tabla IV

Número de muestra	Tiempo de incubación	Producción de aflatoxinas.	Aflatoxinas (ppb) ug/Kg.
1	30 días	-	100
2	45 días	-	130
3	60 días	-	100
4	75 días	-	-

Tabla IV.

**DISCUSION:**

Como se puede observar en la Tabla I, la prueba de corte que se realizó en el grano de cacao almacenado en las Bodegas de la Comisión Nacional del Cacao, se considera dentro de los límites aceptables con respecto al % de moho (21). La determinación de aflatoxinas fué negativo para todas las muestras analizadas.

En la Tabla II, se encontró que hasta un determinado porcentaje de moho (13%) el hongo desarrolla y produce aflatoxinas, pero cuando los niveles de moho son más elevados,

la producción desaparece. Esto nos indica que puede existir una posible competencia por nutrientes con las otras especies de hongos que tienen una velocidad de metabolismo y de crecimiento mayores. .

Respecto a la cuantificación de aflatoxinas (Tabla III) se observa que las cantidades producidas son bajas con respecto a las encontradas en otros productos como maíz y caca huate.

En lo que corresponde a los granos inoculados con esporas de una cepa de Aspergillus flavus (Tabla IV), se observa que el nivel de aflatoxinas fué mayor que el obtenido en los granos con crecimiento natural de hongos. A los 75 días la producción de aflatoxinas fué negativa. Estas determinaciones se realizaron por triplicado en todos los casos.

## VI.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

De acuerdo a los resultados obtenidos se puede decir lo siguiente:

- 1.- El cacao que almacena la CONADECA, puede considerarse aceptable para su consumo ya que las condiciones de almacenaje son las adecuadas para que el grano no sea atacado por hongos productores de aflatoxinas.
- 2.- En el experimento que se llevó a cabo para comprobar si existía alguna relación entre el porcentaje de moho y la producción de aflatoxinas se pudo observar como el desarrollo avanzado de mohos redujo en vez de incrementar los niveles de aflatoxinas presentes en el grano. Esto puede deberse a la presencia de otros hongos como Penicillium sp ó Aspergillus niger que crecen en competencia con A. flavus aunque, aún no se determina si es por la competencia del sustrato o por que destruye las aflatoxinas. (23).
- 3.- Asimismo pudimos percatarnos que inoculando grano de cacao con una cepa de A. flavus (cultivo puro), - la producción de aflatoxinas es más elevado que en mezclas de hongos.

Es recomendable que la temperatura y el grado de humedad de almacenaje sean siempre las adecuadas, ya que - las condiciones ambientales tanto como la naturaleza del sustrato son factores muy importantes para el crecimiento de hongos.

Para combatir los hongos de almacén, deben tomarse - medidas desde que el grano se encuentra listo para cosechar. Una cosecha sana y vigorosa es el primer paso para evitar la formación eventual de micotoxinas. Deberá reducirse el maltrato al grano y dar un máximo de limpieza, - así como la aplicación periódica de micotocidas como el - Tiabendazol.

Es importante señalar que un grano contaminado no de be ser utilizado como materia prima en la elaboración de productos derivados del cacao.

En base a la importancia industrial y económica que representa esta materia prima, es indispensable llevar a cabo un análisis rutinario para la determinación de afla toxinas.

## VII.- BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Alexopoulos C. J., Mims C. W. Introductory Micology Editor John Wiley and Sons, Third Edition, New York, 1979.
- 2.- Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis (A.O.A.C.). Editor William Horwitz. Washington, D. C. 1975. Chapter 26, Natural Poisons, Aflatoxins Parts 26.028, 26.029, 26.018
- 3.- Barnett L. H. Hunter B. B., Illustrated Genera of Imperfect Fungi, Burgess Publishing Company Minneapolis, 3a. Edición. Minnesota, 1972.
- 4.- Bartley, B.G.A. Short History of Cacao and Chocolate 2 Producing New Varieties. F. Agric. Soc. Trinidad. 1967.
- 5.- Braudeau, J. El Cacao, Editorial Blume. La Habana. 1970.
- 6.- Buck, W. B. and G. B. Osweiler. Mycotoxycosis, in - Clinical Diagnostic in Veterinary Toxicology. Editor Gary A., Van Gelder. 2a. Edición. 1976.
- 7.- Carnaghan R. B. Toxicity and Fluorescence Properties of the Aflatoxins. Nature. 20: 1101. 1963.
- 8.- Christensen J. L., Kaufmann H. H., Contaminación - por hongos en semillas y granos almacenados, Editorial Pax-México, México. 1976.
- 9.- Ciepler A., Lillenoj E. B. Mycotoxins Advances in Applied Microbiology 10 155-210. 1968.

- 10.- Cole R. J., Kirksey J. W., Schroeder H. W., Aflatoxins: Improved Method of Dosage in Food, J. of Microbiol., 19 (4), 125-132. 1974.
- 11.- Cook L. R., Chocolate Production and Use. Books - for Industry, Inc., p. 27-44. New York. 1972.
- 12.- Cuatrecasas, J. Cacao and its Allies, A taxonomic División of the Genus Theobroma. U.S. National Museum. 35: parte 6. 1964.
- 13.- Doyle, M. P. and E. H. Barth. Aflatoxin is degraded by mycelia from toxigenic and nontoxigenic strains of Aspergilli grown on different substrates. Mycopathology. 63 (3). 145-153.
- 14.- Edds, T. G. Acute Aflatoxicosis: A Review Journal of American Veterinary Research, 122 (4) 304-309. 1973.
- 15.- Frazier, W. J. Food Microbiology, Mc Graw-Hill. New York. 1972.
- 16.- Gallagher, R. C. Aflatren, A tremorgenic toxin from Aspergillus flavus. Tetrahedron Letters. 21: 233-242. 1980.
- 17.- Goldblatt L. A., Aflatoxin Scientific Background, Control, and Implications. Academic Press New York 1969.
- 18.- Hamilton, P. E., Effect of Aflatoxin on Animals - and the Interrelationship with Nutrition. Deestuffs May 3: 22-23. 1970.

- 19.- Hartley R. D., B. F. Nesbitt and J. O. O'Kelly. Toxíc metabolites of Aspergillus flavus. Nature, 98: 1056-1058. 1963.
- 20.- Indicadores Económicos del Cacao. CONADECA. México. 1970-1979.
- 21.- International Standar Organization ISO R 114, Cut - Test Cocoa Beans. Printed Sxitzerland, Primera Edición. 1969.
- 22.- James M. J., Modern Food Microbiology. Second Edition, Wayne State University. Pág. 401-402. New York. 1978.
- 23.- Jemali M., Poisson J. et Guilleot A. Production - d'aflatoxines dans les Produits céréaliers. Influence de différentes conditions Ann Nutr. Aliment., t. 23, p. 151-166. 1969.
- 24.- Jones, B. D. Methods of Aflatoxin Analysis. Tropical Products Institute. Foreign and Commonwealth - Office. Pág. 63. Londres. 1972.
- 25.- Kadis S. A., Ciegler., S. J. A y L. Microbial Toxins. Academic Press. New York and London. 1971.
- 26.- Laycock, T. An Investigation of the Causes of Mouldiness of Cured Cacao. Annu. Bull. Dep. Agric. Nigeria, 7: 5-19. 1958.
- 27.- Lina L. I., Aflatoxin and other Mycotoxins. Department of Plant Pathology College of Agriculture U. P. L. B., Manila Philipines. 1973.

- 28.- López, A. y Quesnel, V. V. Cacao Biochemistry Research: II) Compounds Important in Chocolate Flavour. Annual Report on Cacao Research, IITA, Trinidad. 1970.
- 29.- Moreau G. Moulds, Toxins and Food. A Wiley - Interscience Publication. 2a. Edición. New York. 1979.
- 30.- Natural Poisons. Aflatoxins. Official Methods of the AOAC, 53 (26) 426-438. 1970.
- 31.- Newborne, M. P. Chronic Aflatoxicosis. Journal of the American Veterinary Medical Association, 163 - (11) 1262-1267. 1973.
- 32.- Norma Oficial Mexicana. Cacao en grano lavado, secado y no fermentado. NOM-F- 129-S. 1979.
- 33.- Norma Oficial Mexicana. Determinación del contenido de humedad en granos de cacao. NOM-F- 268. 1979.
- 34.- Norma Oficial Mexicana. Prueba de corte para granos de cacao. NOM-F- 272. 1979.
- 35.- Nosti N. J., Cacao y Café. Instituto del Libro. La Habana. 1970.
- 36.- Pero, R. W. Simultaneous Detection of Metabolites from Several Toxigenic Fungi. Journal of Chromatography. Netherlands. 80: 255-258.
- 37.- Phillis, E., Temperature during Cocoa Fermentation. Agric. Soc. of Trinidad and Tobago, Proceedings. 45 (3) : 223-226.

- 38.- Pier, A. G., An Overview of the Mycotoxicoses of Domestic Animals. J. Am. Vet. Med. Assoc. 163: 1259-1261. 1973.
- 39.- Pieter S. S., The Biosynthesis of Mycotoxins. Academic Press: New York, 159-179. 1980.
- 40.- Pixton S., Warburton S., Moisture Content Relative Humidity Equilibrium of Some Cereal Grains at Different Temperatures: J. Stored Prod. Res., 6: 283.
- 41.- Porras, E. Micotoxinas. Agricultura de la Américas. p. 20. México. 1979.
- 42.- Prescott S. G., Cecil G. D., Industrial Microbiology. Third Edition. Editorial Mc Graw-Hill Book Company, Inc. New York. 1959.
- 43.- Ramírez G. M., Almacenamiento y Conservación de Granos y Semillas, Compañía Editorial Continental. Primera Edición. México. 1979.
- 44.- Raper, K. B., and D. I. Fennell. The Genus Aspergillus. 9 : 686. The Williams and Wilkins Co., Baltimore. 1965.
- 45.- Roelofsen, P. A. Fermentation, Drying and Fermentation Tropical. Agric. 34(4) 249-261. Trinidad. - 1960.
- 46.- Sandoval, A. H. T., Aislamiento de cepas de Aspergillus sp., productoras de aflatoxinas en alimentos de consumo humano en México. Rev. Inv. Salud Pública. 36: 161-166. México. 1976.

- 47.- Schuller, P. L., Review of Aflatoxin Methodology. J. of the AOAC., 59 (6), 1315-1343. 1976.
- 48.- Scott, P. M. Food and Drug Directorate, Department of National Health and Welfare Ottawa, Ontario, Canada. Journal of the AOAC 52 (1). 1969.
- 49.- Sharby, T. F., Hongos y Micotoxinas. Progresos - en Nutrición. Suplemento Dawe's. 297: 1160-1164. México. 1977.
- 50.- Shreeve, B. J., and Patterson, D. S. P.: Mycotoxicosis. The Vet. Rec., 11: 279-280. 1975.
- 51.- Urquhart, D. H. Cacao. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas, OEA. 1963.
- 52.- Vaqueiro, G. y Morales, J. G. Aflatoxinas. Rev. Tecnología de Alimentos. 10 (2) 50-58. 1975.
- 53.- Wilson B. J. Mycotoxins in Food: Reviews of Methods. Nutr. Rev., 31 (6). Pág. 1112-1115. 1973.
- 54.- Winston P. W., Bates D. H., Saturated Solutions for the Control of Humidity in Biological Research, - Ecology 41: 232-237. 1960.
- 55.- Wong, J. J., and D. P. H. Hsieh. Mutagenicity of aflatoxins related to their Metabolism and Carcinogenic Potencial. Biochemistry. Proc. Natl. - Acad. USA. 73: 2211-2214. 1976.