

870127

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE GUADALAJARA

INCORPORADA A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS



DETERMINACION DE AFLATOXINA B, EN ALIMENTOS
BALANCEADOS PARA CERDOS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A

JULIETA AGUIRRE MARISCAL

ASESOR: PH. DR. ROSA MARIA MUÑOZ SAUCEDA

GUADALAJARA, JALISCO. 1988

FALLA DE ORIGEN



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.

CONTENIDO

Página

CAPITULO I

INTRODUCCION	1
--------------------	---

CAPITULO II

GENERALIDADES	3
---------------------	---

2.1 Alimentos Balanceados para animales (cerdos) ..	4
2.2 Cromatografía	18
2.3 Aflatoxinas	20
A) Aspectos generales	20
B) Química de las Aflatoxinas	24
C) Metabolismo y efectos bioquímicos de las -- Aflatoxinas	31
D) Efectos Patofisiológicos de Aflatoxinas ...	35
E) Características generales del problema de - Micotoxinas en alimentos	40
F) Contaminación por Micotoxinas	41
G) Detección de Aflatoxinas	47
H) Control de Aflatoxinas	48

CAPITULO III

PARTE EXPERIMENTAL	51
--------------------------	----

3.1 Introducción práctica	52
3.2 Método	53
3.3 Resultados y Discusión	56

CAPITULO IV

CONCLUSIONES	59
--------------------	----

RESUMEN	61
---------------	----

CAPITULO V

BIBLIOGRAFIA	62
--------------------	----

CAPITULO I
INTRODUCCION

CAPITULO I

INTRODUCCION

La palabra "Micotoxina" proviene del vocablo griego "Miques" que significa hongos, y del latín "Toxicum" veneno. Las micotoxinas por definición son compuestos tóxicos producidos por la contaminación de hongos en los alimentos y productos alimenticios.

A partir de 1960, en que la llamada "enfermedad X - de los pavos" en Inglaterra, causó una elevada mortandad de los mismos y se descubrió que era originada por la ingestión de alimentos contaminados por hongos del género Aspergillus, ha sido mayor cada día el interés por el estudio de los agentes micotóxicos, especialmente por las aflatoxinas.

Las aflatoxinas son productos metabólicos de algunos hongos, principalmente del Aspergillus flavus. Químicamente son compuestos furfuranos con un anillo de cumarina - sustituido y presentan fluorescencia con luz ultravioleta. Se han aislado 9 compuestos distintos, los cuales se nombran con las iniciales: B1, G1, G2, M1, M2, B2G, G2A y P. Los cuatro primeros son los que se determinan con mayor frecuencia, ya que pueden encontrarse en gran variedad de alimentos. Las M1 y M2 se han encontrado en leche de animales alimentados con productos contaminados. La B1 es la más tóxica, seguida por la G1, B2 y G2.

La aflatoxina B1 es carcinogénica, teratogénica y mutagénica, y debido a estas propiedades, es considerada de primera importancia en la salud pública y animal.

Intoxicaciones o infecciones de origen alimenticio son frecuentes aún en nuestros días, debido principalmente a un manejo inadecuado de los alimentos o a un almacenamiento deficiente de los mismos, que permiten el crecimiento de microorganismos patógenos y la producción de metabolitos tóxicos. Entre las intoxicaciones producidas por hongos y/o sus metabolitos las debidas a Aspergillus han despertado gran interés en los últimos años.

Las aflatoxinas ingeridas con los alimentos se absorben por la mucosa intestinal, pasan por el torrente circulatorio hasta el hígado, riñones, canales biliares y sistema nervioso, donde se localizan. El resultado son lesiones necróticas, tumores y hemorragias, son potentes carcinógenos (Goldblatt, 1969).

Se han aislado aflatoxinas de una gran cantidad de productos alimenticios entre los que se encuentran semillas de oleaginosas, frijol de soya, maíz, granos, cereales, etc.

El hombre utiliza como principal componente de su alimentación a los granos y sus derivados. En términos generales se considera que la dieta del hombre consiste en 70% de productos vegetales, principalmente granos y en 30% de productos de origen animal. Además, hay que tener en cuenta que los productos pecuarios se obtienen alimentando a los animales con grano y concentrados proteinados que provienen de aceites de semillas como las de soya, girasol, ajonjolí, cártamo y algodón. Por consiguiente, los granos, en forma directa o indirecta, constituyen la fuente principal de alimentación del hombre.

Las cosechas de granos y semillas sufren pérdidas o deterioro en su calidad nutritiva y sanitaria por la acción de factores físicos y bióticos, que son favorecidos por la carencia de la infraestructura adecuada para el almacenamiento y conservación de las mismas, así como la falta de organización técnica y administrativa en dichas actividades. Entre las causas de las pérdidas cuantitativas y cualitativas que sufren los granos y las semillas en los almacenes se encuentran los insectos, roedores, pájaros y hongos.

El *Aspergillus flavus* es un miembro de un grupo conocido como "hongos de almacén", los cuales no invaden los granos y semillas en el campo, sino solamente después que han sido cosechados y almacenados, por lo tanto la fuente principal de contaminación se encuentra en los graneros o silos.

Los alimentos para animales contaminados con micotoxinas, constituyen un importante problema para las explotaciones pecuarias o fábricas de alimentos para animales debido al efecto tóxico de estos compuestos en los organismos animales y el empobrecimiento nutricional de los alimentos contaminados.

El presente trabajo tiene como objetivo el de evaluar cualitativa y cuantitativamente por medio de cromatografía de capa fina, la existencia de aflatoxina B1 en alimentos balanceados para cerdos, dado que la presencia de esta micotoxina es de suma importancia por las razones antes mencionadas, además de proporcionar una idea de la realidad a este respecto.

CAPITULO II

GENERALIDADES

2.1 Alimentos balanceados para animales (cerdos).

2.2 Cromatografía.

2.3 Aflatoxinas

- A) Aspectos generales.
- B) Química de las Aflatoxinas.
- C) Metabolismo y Efectos Bioquímicos de las Aflatoxinas.
- D) Efectos Patofisiológicos de Aflatoxinas.
- E) Características generales del problema - de Micotoxinas en alimentos.
- F) Contaminación por Micotoxinas.
- G) Detección de Aflatoxinas.
- H) Control de Aflatoxinas.

CAPITULO II

GENERALIDADES

2.1 Alimentos Balanceados para animales (cerdos)

Los productos pecuarios o de origen animal, constituyen una parte importante en la dieta del hombre, como se mencionó anteriormente. Estos productos se obtienen alimentando a los animales con grano y concentrados proteinados. Entre las principales materias primas utilizadas en la elaboración de alimentos balanceados para animales se encuentran: pastas de oleaginosas como son las de soya, girasol, ajonjolí, cártamo y algodón; harinas de pescado, carne, sangre, pluma y flor de zempazuchitl; vitaminas, minerales, metionina, lisina, roca fosfórica, caldo, avena, maíz, sorgo, cebada, harinolina, salvado de trigo y de maíz, mieles incristalizables, sal y azúcar; lo que da una idea de la miscelánea de productos utilizados.

El material de análisis utilizado en el presente -- trabajo proviene de muestras de alimento balanceado terminado para uso porcícola, específicamente de tres tipos de alimento que son: Alimento de "Destete", Alimento para la etapa de "Crecimiento" y Alimento para cerdos en etapa de "Engorda". En su elaboración se utilizaron concentrados constituidos por: pasta de soya proveniente de aceiteras de Guadalupe y del Estado de Sonora; harina de pescado de diversas pesquerías del Golfo de California; pasta de girasol también de distintas aceiteras; granos molidos (sorgo, maíz, avena, cebada); subproductos de granos y azúcar. Para reforzar el -- alimento se adicionan vitaminas A, D3, E, K y B12, riboflavina, pantotenato de calcio, niacina colina; sal común, fosfato de calcio, sales de hierro, zinc, yodo, cobre, manganeso y antioxidante BHT (50g/ton), furazolidona (Preventivo 110g/ton), sulfametazina (Preventivo 110 g/ton), selenio (no más de .05 g/ton), aureomicina (Preventivo 110 g/ton) y Penicilina (Preventivo 54 g/ton). Como alimento energético en la -- preparación del alimento terminado se ha adicionado harina de sorgo producido en el Estado de Guanajuato, esto se hace mezclando varias partes de sorgo por una de alimento concentrado y esto es lo que se da como alimento terminado a los animales (cerdos). La proporción de esta mezcla varía de -- acuerdo al tipo de alimento concentrado y la etapa de crecimiento, ya que según la edad del animal varían los requerimientos en cuanto a proteínas, vitaminas, carbohidratos, etc. La proporción exacta para los tres tipos de alimentos tratados en este trabajo se proporciona a continuación:

- Alimento para la etapa de "Destete"
Por cada 300 Kg de concentrado se añaden 700 Kg de sorgo molido.
- Alimento para la etapa de "Crecimiento"
Por cada 250 Kg de concentrado se añaden 750 Kg de sorgo molido.
- Alimento para la etapa de "Engorda"
Por cada 150 Kg de concentrado se añaden 850 Kg de sorgo molido.

En la página siguiente se muestra el diagrama de flujo del proceso de elaboración de este tipo de productos.

A continuación se presenta el análisis de composición de los alimentos concentrados:

	Destete	Crecimiento	Engorda
. Proteína, no menos de	20%	38%	36%
. Grasa, no menos de	3%	1%	1%
. E.L.N., no menos de	56%	30%	28%
. Cenizas, no menos de	6%	11%	15%
. Fibra, no más de	4%	6%	8%
. Humedad, no más de	11%	12%	12%

+ Características generales de las principales materias primas:

SORGO

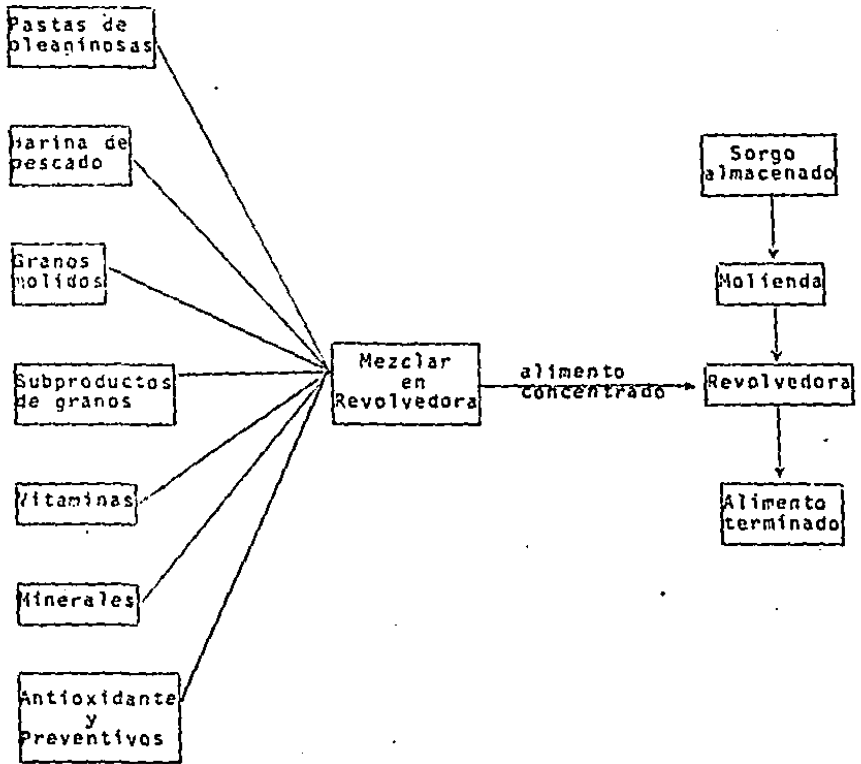
. Generalidades

En el viejo continente el cultivo de sorgo estaba bastante extendido antes de la introducción y difusión del maíz.

Todavía representa, el grano de este cereal, el principal alimento en poblaciones enteras de Africa y de Asia. Se cultiva como cereal de grano, como planta forrajera, para la confección de escobas y también para la extracción de azúcar.

El sorgo de grano ocupa en el mundo una superficie de unos 50 millones de hectáreas, con una producción de casi 700 millones de quintales de grano.

DIAGRAMA DE FLUJO DEL PROCESO DE ELABORACION DE ALIMENTOS BALANCEADOS PARA CERDOS



Estados Unidos es el primer productor mundial de -- sorgo, con una cantidad algo superior a los 220 millones de quintales. El segundo productor es la China con una cosecha cercana a los 120 millones de quintales. Le siguen Argentina con 75 millones de quintales y México con una producción próxima a los 65 millones de quintales.

En México los principales estados productores de -- sorgo son: Tamaulipas, Guanajuato, Jalisco, Sinaloa, Michoacán, Morelos, Chihuahua, Sonora, Coahuila y Nayarit. La época de cosecha es en Primavera, Verano los meses de junio, julio y agosto, y en Invierno los meses de octubre, noviembre y diciembre.

La principal ventaja del sorgo es que se logra su cultivo con éxito en regiones que presentan una precipitación lluviosa anual que oscila entre los 360 y 600 mm. En sitios cálidos, donde el maíz no puede prosperar en seco por falta de agua, probablemente se podrá cultivar el sorgo.

Su principal desventaja es una alta sensibilidad al frío y su contenido en ácido prúsico (cianhídrico), un tóxico que se manifiesta en determinadas estaciones de su ciclo vegetativo.

. Características Botánicas y Biológicas

El sorgo pertenece a la familia de las gramíneas y comprende las siguientes especies cultivadas: *Sorghum vulgare*, *Sorghum saccharatum* (sorgo azucarado), *Sorghum doura* y el *Andropogon sorghum sudanensis*.

Es considerable la afinidad agronómica del sorgo -- con el maíz; por ello es muy frecuente tomar a este último -- como tipo de comparación.

Hasta el instante de aparición de la panoja, la -- planta de sorgo es tan parecida a la del maíz que se le confunde frecuentemente con ésta. En todo caso, el color de la planta de sorgo es ligeramente más pálido.

Los tallos son de altura y fortaleza variables, dependiendo de las variedades; pueden alcanzar desde los 50 cm hasta los 2 y 3 m de altura, dependiendo ésta del tamaño de los entrenudos.

Las hojas son lanceoladas, insertas de forma alterna y opuesta en cada nudo de la caña; el limbo es glabro y -- ceroso, bordeado por dientecillos perceptibles al tacto y -- que constituyen un factor distintivo con el maíz. El número de hojas es tanto mayor cuanto más tardía sea la variedad. -- Como media, las variedades precoces suelen tener 6 hojas y -- las tardías 15.

El aparato radical es semejante al del maíz, o sea fasciculado, pero más potente, pues el número de raíces secundarias es doble que en aquella planta por unidad de superficie foliar. También es más profundo.

Las hojas tienen menos superficie que las del maíz y sus estomas son más pequeños.

Todos estos caracteres hacen que el sorgo sea mucho más resistente que el maíz a la falta de agua y además, que la planta muestre una gran capacidad de reacción ante las condiciones más favorables.

Las flores del sorgo son hermafroditas y tienen estambres y pistilos; aunque se han encontrado en Sudán sorgos dioicos que han servido para obtener variedades híbridas.

La inflorescencia es una panoja terminal que surge y se desarrolla del mismo modo que el penón o inflorescencia masculina del maíz. La fecundación es autógama, pero con un cierto porcentaje de cruzamientos naturales.

La cariósida puede ser vestida o desnuda. Las glumas varían de color, desde rojizas hasta pardovioláceas. El grano puede ser blanco, amarillo, rojo, pardo, pardorrojizo, pardovioláceo, debido a la presencia de pigmentos en las células del pericarpo o del endospermo.

. Genética y Variedades

Tras algunos años de ensayos, los agricultores de todo el mundo pudieron plantar sorgos híbridos. A partir de este momento, el cultivo de este cereal experimentó una expansión rápida y eficaz. Al ser las flores hermafroditas, no puede ser utilizada para producir los híbridos; la hibridación se hace utilizando como "hembra" líneas genéticamente androestériles, es decir, líneas en que los órganos sexuales masculinos (anteras) han abortado antes de poder emitir polen.

Son conocidas las variedades de sorgo Kafir y Day, originarias de Africa Central, utilizadas en la hibridación por ser plantas que tienen solamente flores con pistilos.

Las ventajas que ofrece el sorgo híbrido son fundamentalmente de tres clases: mayor producción unitaria a igualdad de ciclo y condiciones de cultivo; posibilidad de disponer de un surtido de variedades adaptadas a las más variadas condiciones, especialmente en tipos precoces; las características especiales de las nuevas variedades, cuya baja talla y recias cañas permiten la total mecanización de este cultivo.

En el sorgo es muy interesante su resistencia a los pájaros que provocan muchos daños no sólo por lo que se comen sino por lo que desgranan. De esto también se ha preocupado la genética y así se han obtenido variedades resistentes a este daño.

Los sorgos forrajeros tienen como características básicas una gran altura, tallos jugosos y azucarados y muchas hojas.

Por último, el grano obtenido no puede ser utilizado por el agricultor como semilla para la siguiente campaña cuando se trata de una variedad híbrida, pues ésta degenera.

. Clima y Terreno

El sorgo es una planta muy rústica que aguanta muchas inclemencias. Para germinar necesita una temperatura de 12 a 13° C. El crecimiento de la planta no empieza a ser verdaderamente activo hasta que se sobrepasan los 15° C, situándose el óptimo hacia los 32° C. Los descensos de temperatura en el momento de la floración pueden reducir al rendimiento en grano.

Resiste la sequía y se desarrolla bien en terrenos alcalinos. Prefiere suelos sanos, profundos y no demasiado pesados. Soporta algo la sal.

. Recolección, Rendimiento y Aprovechamientos

Los sorgos en grano alcanzan la madurez de muerte después de los 90 a 105 días de la siembra. Es el momento de recogerlo mediante la cosechadora de cereales.

El grano no puede ser almacenado con más del 15% de humedad y cuando se quiere hacer un almacenaje de larga duración la humedad del grano no puede pasar del 12 por 100. Es difícil cosechar el grano de sorgo en condiciones de ser almacenado. Lo más frecuente es proceder al secado artificial.

Los rendimientos en grano pueden variar entre 14,30 Qm/ha en secano y los 41,3 Qm/ha en regadío. En Europa se ha llegado a cosechar de 40 a 80 Qm/ha en secano como valores extremos.

El grano de sorgo es sobre todo cultivado como alimento para el ganado, particularmente de los rumiantes. Su composición química es bastante elevada, traduciendo la riqueza de principios nutritivos que contiene: materia seca 88.5%, substancias grasas 3.8%, substancias nitrogenadas 9%, y las substancias amiláceas 70.1%.

Se administra de la misma forma que la avena, siendo preferible suministrarlo en harina a causa de la dureza de la cáscara, por cuyo motivo escapan a la acción de los jugos digestivos cuando no son bien triturados.

Puede ser también, una fuente de materias primas para las industrias productoras de almidón, dextrinas, dextrosa, aceite, etc.

Plagas y enfermedades: Existen una serie de insectos que atacan al sorgo en el suelo e impiden la densidad ideal de plantas. El enemigo más temible en el suelo son las larvas de los gusanos de alambre (*Agriotes lineatus*). Dos lepidópteros son especialmente dañinos al tallo del sorgo: *Sesamia nonagrioides* y *Pyrausta nubilalis*. Por último, un pequeño ácaro, la araña roja o arañuela (*Tetranychus*), produce daños de importancia, sobre todo al final del verano.

Parásitos vegetales: Dos son las enfermedades criptogámicas que afectan de manera importante a la planta de sorgo: la *helminthosporosis* y el carbón, la *helminthosporosis* provoca en el verano la aparición sobre las hojas de manchas ovales, terminando por marchitarse, y el carbón es una enfermedad que por su acción depresiva sobre las plantas provoca la destrucción más o menos parcial de las mazorcas.

SOYA

Generalidades

La soya o soja se cultiva en gran extensión en EE.UU. (más de 16 millones de hectáreas), ocupando uno de los primeros lugares entre los cultivos de este país. Se produce allí el 67% de la cosecha mundial de soya. Le siguen en importancia China, con más de 14 millones de hectáreas y el 25% de la producción mundial; Rusia, Indonesia, Japón, Brasil, Corea del Sur y Canadá.

El aceite de soya es el de mayor producción mundial de todos los aceites líquidos, con 6.5 millones de toneladas.

En EE.UU. prácticamente toda la soya cultivada se industrializa y se destina a la alimentación del ganado y a la avicultura, por una parte, y a la alimentación humana en forma de margarina y de manteca por la otra.

En los países de Oriente la soya ha constituido, desde hace siglos, un importante factor alimenticio para el hombre, en forma de diversos platos, quesos, leche, salsas, etc.

En la Europa occidental la introducción de la soya ha sido más lenta y se ha producido de una forma más irregular. Sin embargo, hoy en día, se puede considerar que ya es un cultivo bastante extendido que, aunque de manera lenta, se ha ido impulsando y desarrollando sistemáticamente en estos países.

En México los principales estados productores de soya son: Sinaloa, Sonora, Tamaulipas y Chihuahua, y la época de cosecha son los meses de septiembre, octubre y noviembre. En 1982 la producción nacional de soya fue de 700,000 ton, - se importaron 537,444 ton, lo que dió un total de 1,237,444 ton. de frijol de soya, equivalente a 891,000 ton. de pasta, importándose además 38,558 ton. de pasta, lo que dió un consumo aparente de 929,558 ton. de pasta de soya.

. Características Botánicas y Biológicas

La soya (*Glicine max*) es una leguminosa anual de -- consistencia herbácea, tallos rígidos, fuertes y erectos. La altura, según variedades y condiciones de cultivo, está comprendida entre los 40 cm. y 1.5 m. Las hojas son compuestas, excepto las primeras que se forman, que son simples, y tienen un color verde característico. Las flores, amariposadas, se encuentran formando racimos en las axilas de las hojas y su color es normalmente blanco o púrpura. El fruto es una legumbre o vaina que contiene de una a cuatro semillas. La semilla es generalmente esférica. La fecundación es autógena. El aparato radical es extenso y rico en nódulos.

Es una planta sensible a la duración del día; de -- las llamadas de día corto. La floración depende del período crítico de duración del día, pero cuando la temperatura se mantiene por debajo de los 25° C, la floración se retrasa. - La maduración requiere temperaturas que no sean ni demasiado elevadas ni demasiado bajas.

. Genética y Variedades

Las variedades de esta planta son numerosísimas; -- existe en el mundo una gran gama de variedades comerciales - de ciclos vegetativos muy diversos (desde 90 días hasta cerca de 200 días) y que pueden adaptarse a cualquier zona.

La adaptación de una variedad a una zona determinada viene influida por la duración del día, además de otros factores como la temperatura ambiental o el suelo.

. Clima y Suelo

La soya se cultiva principalmente en regadío o en -- aquellas zonas de secano húmedo. En regadío, se adapta bien a la mayor parte de los climas templados, donde se siembran cultivos como el maíz, judías, algodón, etc.

En la primera fase de su ciclo vegetativo es sensible a heladas. En su siembra la temperatura del suelo debe ser, como mínimo de 15 a 85° C. No es muy exigente en cuanto a fertilidad, pero es particularmente sensible a los encharcamientos. Se ha observado que la soya presenta una cierta resistencia a la salinidad del terreno.

Recolección y Rendimientos

La maduración se manifiesta por el cambio de color de las vainas y el desprendimiento progresivo de las hojas. Cuando la semilla va madurando, su humedad decrece del 60% - al 15% en un período de una a dos semanas. Por tanto, el plazo de tiempo para poder cosechar con las menores pérdidas queda reducido a pocos días.

La soya se recoge con una cosechadora de cereales, regulada convenientemente. A falta de esta máquina, la recolección se efectúa con una segadora, trillando después con una trilladora de cereales convenientemente regulada.

Para el almacenamiento, la humedad del grano no puede ser superior al 13%. Si este factor no se da, se procede al secado previo.

El rendimiento de este cultivo está entre los 2000 y los 4000 Kg. por hectárea.

Aprovechamiento

Son muchos los aprovechamientos de esta planta. Cultivada para forraje, produce alrededor de cinco toneladas de producto verde rico en proteínas. En la rotación de cultivos, se cuenta con un mejoramiento del terreno después del cultivo de soya.

Pero el objetivo primordial de este cultivo es la producción de semillas y la transformación de éstas en harina protéica con un 44 a un 50% de proteína digestible, y de 30 a 40% de materias albuminoideas, con destino a la elaboración de piensos para el ganado.

La obtención de esta harina implica la extracción del aceite de la semilla, que lo contiene en un 17 a 19%, y que se utiliza, una vez desgomado, para alimentación humana y para usos industriales. La torta de esta semilla oleaginosa es de gran riqueza nutritiva, particularmente en materia nitrogenada y albuminoidea, pero posee otros elementos nutritivos como son: grasa 5.2%, hidrocarbonados 26% y celulosa 6.5%. Es un residuo apropiado para toda clase de explotaciones lecheras, de cría, de crecimiento y producción de huevos. Esta torta no comunica mal gusto a la carne, ni a la leche.

. Plagas y Enfermedades

En general, en los países productores de soya no se han observado plagas específicas, sino más bien ataques de especies polífagas procedentes de otras plantaciones. Normalmente los daños no son graves, exceptuando los producidos por la arañuela y la rosquilla negra.

En cuanto a enfermedades, en ciertos cultivos de soya han aparecido algunas manchitoses causadas por hongos --- (Fusarium, Verticillium, Rhizoctonia) y ciertos síntomas en las hojas causados por virus.

GIRASOL

. Generalidades

El girasol se encuentra entre las plantas productoras de semillas oleaginosas que han adquirido importancia industrial. En muchos países el olivo había sido la fuente básica de producción del aceite de mesa; sin embargo, el girasol junto con el cártamo, el maíz y el cacahuete, entre otros, resultan más económicas y están en auge.

. Características

La planta de girasol parece ser que procede de América del Norte, especialmente de México, y que fue difundida fuera del continente americano por los españoles. En Europa, durante doscientos cincuenta años se cultivó solamente como planta ornamental, pero a mediados del siglo XIX se extendió rápidamente como producto oleaginoso. Sin embargo, sufrió una fuerte regresión a finales del mismo siglo a consecuencia de los ataques masivos del "jopo" y de la polilla. En América Latina, sobresale Argentina como país productor, situado además en el tercer lugar de la escala mundial.

Gracias a las variedades resistentes obtenidas por selección, volvió a difundirse más tarde con suma rapidez, y desde entonces su cultivo ha sido siempre en aumento.

El girasol (*Helianthus annuus*) es una planta anual de la familia de las compuestas. Su raíz principal crece -- más rápidamente que la parte aérea y llega a sobrepasar en longitud la altura del tallo. Las hojas son de gran tamaño, largamente pecioladas, insertas en un tallo vigoroso y alto. En la madurez el tallo se inclina en su parte terminal, debajo de la inflorescencia.

La inflorescencia es un capítulo o cabezuela en cuya periferia hay flores liguladas, amarillas en forma de len

güeta, que son estériles. Las flores verdaderas, de estructura tubular y color marrón, son las que dan lugar a los granos y florecen desde el exterior del receptáculo hacia el interior en círculos concéntricos sucesivos. La floración total del capítulo dura de cinco a diez días.

El tamaño y forma de los frutos, que son aquenios, es variable. Los girasoles con grandes aquenios, en los que la almendra no llena completamente la cáscara, son los que se utilizan para comer la semilla directamente. Por el contrario, en las variedades oleaginosas se procura que la proporción de almendra sea lo más grande posible y la cáscara muy fina. La riqueza en aceite de los granos es una característica hereditaria.

El subproducto de la extracción del aceite, las tortas, es muy apreciado para la alimentación del ganado. También se cultiva el girasol para la producción exclusiva de forraje.

La influencia de los factores ambientales y de las condiciones de cultivo sobre la acumulación del aceite en las semillas es grande. Es una planta aficionada al calor y a la luz; consume importantes cantidades de agua, pero es muy resistente a la sequía gracias a la profundidad que alcanza su potente sistema radicular. Prefiere suelos arcillosos-arenosos, ricos en materia orgánica y permeables. El girasol, salvo en terrenos muy pobres, no responde tan bien al abonado como otras plantas.

La humedad óptima de las semillas para efectuar la recolección es la comprendida entre un 10 y un 12%. Las cosechadoras de cereales se adaptan fácilmente a la recolección del girasol, para ello es de capital importancia que exista una uniformidad de madurez de las plantas. Además, las condiciones ideales son que éstas tengan los tallos finos y de poca altura, para poderse cortar fácilmente por debajo de las cabezuelas y entre así en la cosechadora la mayor cantidad posible de tallos.

Los enemigos animales del girasol son los gusanos de alambre y la polilla del girasol.

Entre las enfermedades más comunes o importantes de esta planta están el mildiu del girasol, la podredumbre blanca del girasol, la podredumbre gris del girasol, el moho del girasol, todas ellas producidas por hongos.

Entre las virosis, la más conocida es el mosaico del girasol.

HARINA DE PESCADO

La harina de pescado es muy utilizada en la elaboración de alimentos para animales debido a sus cualidades nutritivas entre las que destacan su alto contenido proteico, vitaminas y minerales.

La harina de pescado es preparada en las pesqueras por la deshidratación y pulverización del material de desecho, esqueletos y residuos sobrantes de los diferentes procesamiento que se dan al pescado.

En México los principales Estados productores son: Baja California Sur, Baja California Norte, Sonora, Sinaloa, Campeche y Yucatán. Las importaciones de harina de pescado se hacen de Perú, Chile, Ecuador y Estados Unidos de Norteamérica.

En 1982 el consumo aparente de harina de pescado en México fue de 160,000 toneladas, de las cuales 95,000 fueron de producción nacional y las otras 65,000 fueron de importación.

+ Características generales de granos y semillas en México

La producción agrícola en México en especial la de granos básicos, se ve limitada por factores diversos: escasez de tierras y agua, mala organización de las pequeñas unidades de producción, deficiente capacitación de campesinos y técnicos, carencia de asistencia técnica efectiva a las unidades de producción, insuficiencia de insumos agrícolas, entre ellos de semillas mejoradas, y daños provocados por plagas y enfermedades. Pero peor aún son las graves pérdidas o deterioro que sufren las cosechas en su calidad nutritiva y sanitaria por la acción de factores físicos y bióticos, -- que son favorecidos por la carencia de la infraestructura adecuada para el almacenamiento y conservación de los granos y semillas, así como por la falta de organización técnica y administrativa en dichas actividades.

Entre las causas de las pérdidas cuantitativas y cualitativas que sufren los granos y las semillas en los almacenes, se encuentran los insectos, roedores, pájaros y hongos.

En el caso de los insectos y de los hongos, el principal factor que favorece su desarrollo es la humedad y en segundo término la temperatura. En algunas zonas agrícolas los granos se cosechan con alto contenido de humedad y si no se toman medidas adecuadas para su secado, éstos sufren rápido deterioro por causa de insectos y hongos de almacén. Los hongos de almacén causan pérdida de vigor y viabilidad de las semillas.

En el cuadro que se presenta en la página siguiente, se muestran los contenidos mínimos de humedad que los hongos de granos almacenados requieren para su desarrollo.

Todos estos problemas están íntimamente relacionados con las infraestructuras de poscosecha, el equipo de secado, de aereación y su operación, así como las estructuras de almacenamiento, que deben reunir las características técnicas adecuadas para protegerlos al máximo de los factores físicos y bióticos que los perjudican.

Desde la cosecha, los granos y semillas están expuestos a sufrir daños que ocasionan fuertes pérdidas. En nuestro país el transporte de granos es deficiente, por lo que grandes volúmenes permanecen largo tiempo en las zonas de producción, en los puertos marítimos o bien en furgones, con alto riesgo de deterioro. Tampoco hay suficiente personal capaz de manejarlos con riesgos mínimos, pues no existe un buen sistema de capacitación y prácticamente no hay investigadores en esta área.

El almacenamiento y conservación de granos y semillas lo realizan en el país tres sectores: el sector oficial, a través de Bodegas Rurales Conasupo y Almacenes Nacionales de Depósito, que manejan los granos para el consumo humano y animal, y la Productora Nacional de Semillas; los comerciantes y, por último el sector rural, formado por los campesinos que producen en gran medida el maíz que el país requiere y guardan para su subsistencia parte de esa producción en trojes y habitaciones inadecuadas.

En 1983 el Programa Nacional de Alimentación señaló que en México por deficiencias en la infraestructura y en los servicios para la recepción, acondicionamiento, almacenamiento, transporte, distribución y comercialización de los granos, se generan mermas del orden del 10% de las cosechas. Esto exige la necesidad de formar investigadores y capacitar personal, cuyas actividades organizadas con el apoyo adecuado repercutirán en una mayor disponibilidad de alimentos.

Contenidos de humedad*, de diferentes granos y semillas, en equilibrio con humedades relativas de 65-90% y hongos que comunmente crecen bajo esas condiciones de humedad. (13)

Humedad relativa	Avena, arroz, cebada, centeno, maíz, mijo, sorgo, trigo, triticale.	Soya	Cártamo, cacahuete, girasol.	Hongos
65-70	13.0-14.0	12.0-13.0	5.0-6.0	Aspergillus halophilicus
70-75	14.0-15.0	13.0-14.0	6.0-7.0	A. restrictus, A. glaucus
75-80	14.5-16.0	14.0-15.0	7.0-8.0	A. candidus, A. ochraceus, más los de arriba.
80-85	16.0-18.0	15.0-17.0	8.0-10.0	A. flavus, Penicillium, más los de arriba.
85-90	18.0-20.0	17.0-19.0	10.0-12.0	Penicillium, más los de arriba.

(*) - Porcentajes de humedad con base en el peso húmedo. Las cifras son aproximadas, en la práctica se pueden esperar variaciones de $\pm 1.0\%$.

2.2 CROMATOGRAFIA

La cromatografía es la base de los principales métodos para la extracción, separación y cuantificación de aflatoxinas.

La base común para todas las técnicas cromatográficas es la migración diferencial de un soluto, debida a una fase estacionaria que propicia una atracción, con la de una fase en movimiento. Aproximadamente desde 1930, las separaciones fundadas en la adsorción preferencial han cobrado importancia en la metodología analítica.

Existen varias etapas en un análisis cromatográfico:

1. Adsorción de las sustancias a separar, normalmente disueltas en disolventes no polares.
2. Desarrollo, en que los materiales adsorbidos se extienden por la acción de un flujo continuo de la disolución o de un disolvente puro.
3. Recuperación de los componentes separados, realizada normalmente por elución del material adsorbido mediante un disolvente más polar, o varios disolventes sucesivamente empleados, que van separando los materiales deseados.
4. Identificación y medida de las sustancias individuales por distintos medios, como reacciones coloreadas, fluorescencia ultravioleta, espectrofotometría de absorción, etc.

La eficacia de la separación depende de factores como la naturaleza química de los componentes a separar, del disolvente y del absorbente, la geometría de la columna; la velocidad y el flujo de la disolución y del disolvente utilizado en el desarrollo del cromatograma.

Existen varios tipos de cromatografía como son: la cromatografía de columna, cromatografía en papel y en capa fina, cromatografía de gases y la cromatografía de intercambio iónico, siendo las dos primeras las que nos interesan para este tema.

Cromatografía en columna (adsorción): el adsorbente se coloca dentro de un tubo largo y estrecho, provisto en el fondo de una llave de paso, cuya salida está colocada a un matraz de succión. Pueden usarse distintos adsorbentes, como carbonato cálcico, óxido magnésico, óxido de aluminio, almidón y gel de sílice, dependiendo esto de la naturaleza

de las sustancias a separar. La disolución de la muestra se vierte en la parte de arriba de la columna y se deja pasar lentamente a su través. El último componente adsorbido aparece el primero en el eluente (fase de movimiento), seguido por los demás componentes en el orden en que va disminuyendo su capacidad de retención en la columna (partición), en lugar del adsorbente, se utiliza una fase inerte, recubierta con una fase líquida estacionaria. Las moléculas del soluto deben partirse entre la fase líquida en movimiento y la fase líquida estacionaria. Con excepción de este cambio los resultados que se obtienen son casi idénticos a los que se encuentran en la cromatografía en columna de adsorción.

Cromatografía en papel y en capa fina (CCF): En la Cromatografía en papel, la fase estacionaria es una pieza de papel cromatográfico especial o papel filtro. La mezcla por separarse se coloca en un extremo del papel en forma de una mancha pequeña, a medida que el solvente eluente se mueve a lo largo del papel, usualmente sólo por acción capilar, el soluto se mueve con velocidades diferentes. Este tipo de cromatografía es más rápida y requiere mucho menos muestra que la de columna. Los componentes separados pueden identificarse sobre el papel mediante reactivos capaces de originar productos coloreados con los componentes de la muestra, por la absorción ultravioleta o infrarroja, la fluorescencia, la radiactividad o la extracción combinada con otro método analítico.

Para la identificación de una especie en una mezcla se usa el valor R_f . Se define como sigue:

$$R_f = \frac{\text{distancia recorrida por el soluto (mancha)}}{\text{distancia recorrida por el frente del solvente}}$$

La cromatografía de capa fina (CCF) se ha convertido en uno de los medios más útiles para la separación, identificación y ensayo de muchas sustancias, y comparada con la del papel, ésta proporciona separaciones más rápidas y más completas, y necesita una cantidad de muestra en disolución mucho más pequeña. Sobre una placa de vidrio se extiende una pasta del adsorbente juntamente con un soporte de almidón o de yeso, formando una capa de espesor uniforme. Los adsorbentes más utilizados son el de sílice, óxido de aluminio y celulosa. Se aplica una pequeña muestra y los solutos se eluyen mediante un solvente apropiado o una mezcla de solventes. Para la identificación cualitativa del soluto se usan las mismas técnicas que la de papel. Para los análisis cuantitativos este tipo de cromatografía presenta una mayor ventaja, ya que la "mancha" puede rasparse de la placa y ponerse en un solvente. La solución resultante, que contenga sólo un soluto, puede ser analizada por cualquiera de las técnicas analíticas estándares.

2.3 AFLATOXINAS

A) Aspectos generales.

+ Hongos productores de aflatoxinas.

Las aflatoxinas son metabolitos fúngicos altamente tóxicos que son producidos por los hongos Aspergillus flavus y Aspergillus parasiticus principalmente.

Estudios (5) que se han seguido realizando desde el descubrimiento de las aflatoxinas han reportados otros hongos productores de aflatoxinas, entre los que se incluyen -- además del A. flavus y A. parasiticus otras especies del grupo Asp. flavus, así como también especies de otros grupos. -- En la Figura 1 se muestran los hongos productores de aflatoxinas.

+ Ocurrencia de Aspergillus flavus y aflatoxina.

El grupo Asp. flavus es un constituyente de la microflora en aire y suelo, y se encuentra en plantas y animales vivos o muertos por todo el mundo. La presencia de este hongo en el almacenamiento contribuye al deterioro de los productos agrícolas. Además es considerado patógeno al hombre, animales y especialmente para los insectos, así como también para todas las plantas.

Las aflatoxinas han sido encontradas en la mayoría de los principales productos para consumo, tales como cereales (maíz, trigo, avena, centeno, arroz, sorgo y el millet), cacahuate, mantequilla de cacahuate, frijol mungo, nuez de Brazil, pistache, almendra, copra, nuez, harina y semilla de algodón, avellana y polvo de chile indio. Esta no es una lista exhaustiva, pero ilustra la gran variedad de ingredientes sujetos a contaminación.

En general, la mayoría de los ingredientes, excepto el maíz, las nueces y el algodón están libres de aflatoxinas al momento de la cosecha.

+ Factores que influyen en la producción de aflatoxina en sustratos naturales.

Se ha encontrado que las tierras donde no se varía la cosecha tienen una mayor contaminación con el hongo, conteniendo más aflatoxinas que las cosechas cultivadas en campos con rotación de cultivos. A raíz de esto se ha concluido que los agentes tóxicos puros son componentes del suelo, aire, semillas y forrajes de la microflora en todo el mundo.

Figura 1. "Hongos productores de Aflatoxinas" (5)

Hongos	Investigador	Aflatoxinas			
		B ₁	B ₂	G ₁	G ₂
Grupo Aspergillus flavus					
A. flavus		X	X	X	X
A. flavus var. columnaris	Van Walbeek et al. (1968)		X		
A. oryzae	Basappa et al. (1967)	X	X		
A. parasiticus	Codner et al. (1963)	X	X	X	X
A. parasiticus var. globosus	Murakami et al. (1966)	X	X	X	X
Otras especies de Aspergillus, Penicilliu, etc.					
A. niger	Kulik y Holaday (1967)	X			
A. wentii	Kulik y Holaday (1967)	X			
A. ruber	Kulik y Holaday (1967)	X			
A. ostianus	Scott et al. (1967)	X		X	
A. ochraceus	Van Walbeek et al. (1968)	X			
Penicillium puberulum	Hodges et al. (1964)	X		X	
	Kulik y Holaday (1967)	X	X	X	X
P. variable	Kulik y Holaday (1967)	X			
P. frequentans	Kulik y Holaday (1967)	X			
P. citrinum	Kulik y Holaday (1967)	X			
Rhizopus sp.	Van Walbeek et al. (1968)	X		X	

. Los hongos: La cantidad de aflatoxina producida tanto en sustratos naturales como in vitro depende de la especie de hongo de que se trate.

. El sustrato: Para cualquier cepa de hongo el sustrato influye en la cantidad de aflatoxina producida. Se encontró que el efecto del sustrato era el resultado de la proporción relativa entre el material de la vaina o cáscara y el endospermo nutritivo de los granos. Los sustratos con alto contenido de carbohidratos (trigo, arroz) generalmente sustentan mayor producción de aflatoxina que las semillas oleaginosas (cacaahuates, soya), esto es debido probablemente al alto % de aceite contenido, que no es inmediatamente metabolizado por el A. flavus.

. Contenido de Humedad y Humedad Relativa: Es ampliamente reconocido que el factor más importante en el crecimiento del A. flavus y en su producción de aflatoxinas es la humedad contenida en granos y semillas en equilibrio con la Humedad Relativa (HR) en los sustratos naturales. El A. flavus es clasificado como mesófito, ya que requiere para su crecimiento entre 80 y 90% de HR y el mínimo para su esporulación es de 85% HR.

. Temperatura: A. flavus está clasificado como un hongo mesofílico que requiere de las siguientes temperaturas para su desarrollo: mínima 6 - 8°C, óptima 36 - 38°C y máxima 44 - 46°C. Las temperaturas mínima y máxima de crecimiento son afectadas por la humedad, concentración de oxígeno, disponibilidad de nutrientes y otros factores. A. flavus tiene temperaturas máximas de crecimiento más altas en sustratos naturales que en sustratos sintéticos.

. Tiempo: Teniendo las condiciones óptimas para la producción de aflatoxina —humedad, temperatura, sustrato, etc.— algo de aflatoxina puede ser producido dentro de 24 horas. Un máximo se alcanzará en 10 días o 2 semanas, después de lo cual la cantidad presente puede disminuir rápidamente.

. Madurez: Se ha demostrado que el A. flavus invade con mayor facilidad las semillas almacenadas, en relación a su tiempo de envejecimiento.

. Daño: El daño que pudieran tener las cascari-llas o granos proporcionan un incremento de la oportunidad para una invasión rápida y directa del grano por A. flavus. El daño también incrementa la disponibilidad de nutrientes.

. Oxígeno y Dióxido de Carbono: El crecimiento del hongo durante el almacenamiento en sustratos naturales, también depende de las condiciones atmosféricas en el microclima que rodea al sustrato. El hongo es altamente aeróbico

y requiere de una cierta cantidad de oxígeno para la forma -
ción y germinación de esporas, y crecimiento vegetativo.

. Interacción microbiana: A. flavus frecuentemen-
te se encuentra asociado con otros microorganismos en granos,
semillas y frutos almacenados, por lo que debido a la compe-
tición microbiana por el sustrato, bajo condiciones favora-
bles para su desarrollo, se reduce la concentración de afla-
toxinas formadas. Aproximadamente 1000 microorganismos in-
cluyendo bacterias, actinomicetos, levaduras, algas, mohos y
esporas de hongos, tienen la habilidad de degradar las afla-
toxinas, y si se encuentran creciendo en el mismo sustrato -
que el A. flavus, disminuirá la concentración de las mismas.

+ Factores que influyen en la producción de aflatoxina en -
cultivos sintéticos.

En la producción de aflatoxina en medios sintéticos
comparables a los sustratos naturales, las concentraciones -
obtenidas son mucho menores que las producidas naturalmente.
Esto es probablemente debido a la amplia superficie total ex-
puesta al aire, el amplio radio de nutrientes y la humedad.

La aereación y el pH son dos factores muy importan-
tes para el buen crecimiento del hongo, siendo el pH óptimo
de 8. Los tipos y cantidades de aflatoxinas producidas por
el A. flavus dependen de la temperatura y del tiempo de incu-
bación, siendo la temperatura óptima de 24°C para B₁, y 30°C
para G₁, con un período de incubación de 12 días. Si el pe-
ríodo de incubación se extiende, la cantidad de aflatoxina -
disminuye debido a que es degradada en el medio o absorbida
por el hongo. La esterilización con vapor bajo presión pue-
de causar cambios indeseables en las soluciones de nutrien-
tes y se pueden producir materiales tóxicos, particularmente
cuando altas concentraciones de carbonohidratos son autoclavea-
dos junto con componentes orgánicos nitrogenados, es por eso
que es mejor esterilizar en autoclave los componentes en for-
ma separada y después combinarlos antes de la inoculación. -
La disponibilidad de los nutrientes como las fuentes de carbo-
no y de nitrógeno que se tengan, la presencia de elementos
menores como el zinc, de vitaminas y otros, son factores im-
portantes en la producción de aflatoxina.

. Principales factores relacionados con los granos,
que afectan la producción de micotoxinas:

- Daño por insectos
- Semillas dañadas
- Problemas de pre y almacenamiento
- Variedades de grano
- Contenido de humedad
- Temperatura
- Microelementos (Zn, Co)

B) Química de las Aflatoxinas.

El término aflatoxinas se refiere a un grupo de metabolitos de bis-furanocumarina aislados de cenizas de hongos de Aspergillus flavus; siendo los miembros principales designados como B₁, B₂, G₁ y G₂. Cuando son resueltos por cromatografía de capa fina (CCF), se separan dentro de componentes individuales, en el orden antes mencionado. Las aflatoxinas B₁ y B₂ tienen una fluorescencia azul cuando se ven en ondas largas de luz ultravioleta (365nm); en la G₁ y G₂ la fluorescencia es verde, y debido a esto es la designación B (blue) para azul y G (green) para verde. Esta propiedad hace muy convenientes para juzgar con procedimientos de purificación y formar las bases para un análisis químico. Otras cuatro aflatoxinas, M₁, M₂, B_{2A} y G_{2A}, las cuales pueden ser producidas en cantidades menores, fueron aisladas de cultivos de A. flavus y A. parasiticus. Otros compuestos muy relacionados son parasítico, aflatoxicol y aflatoxina GM₁, -- que también son producidos por hongos del grupo A. flavus.

En algunas especies animales, por ej. el ganado lechero, las aflatoxinas B₁ y B₂ son parcialmente metabolizadas para dar los derivados hidroxilados: aflatoxinas M₁ y M₂ respectivamente, las cuales fueron descubiertas por primera vez en la leche, de donde proviene la designación M (milk); pero también se forman en la orina de la mayoría de los animales incluyendo al hombre.

La aflatoxina P₁ es el mayor producto de conversión de B₁ por los hígados de las ratas, ratones, monos y el hombre, y no ha sido aislada en cultivos. La aflatoxina Q ha sido identificada como otro metabolito importante de la aflatoxina B₁, y es un producto del metabolismo de las preparaciones microsomales del hígado de monos, humanos y ratas.

Las estructuras de las aflatoxinas y de los derivados se muestran en las Figuras 2, 3 y 4.

Las aflatoxinas B₂ y G₂ son dihidroderivados de las aflatoxinas B₁ y G₁. La síntesis en el Laboratorio de las aflatoxinas B₁ y B₂ confirmaron estas estructuras. Algunas de las propiedades químicas y físicas de las aflatoxinas y sus derivados más importantes están resumidas en la tabla de la Figura 5.

+ Aflatoxina B₁

La Aflatoxina B₁ (C₁₇H₁₂O₆) de nombre químico: 2, 3, 6 a 9 a α -tetrahydro-4-metoxyclopenta (C) furo (3',2':4,5) furo (2,3-h) (1) benzopiran-1, 11-diona, exhibe una fuerte fluorescencia azul cuando se expone a luz ultravioleta de onda larga. Forma cristales incoloros, con punto de fusión de 268 a 269°C (descomposición).

+ Reacciones químicas de las aflatoxinas.

Las reacciones de las aflatoxinas a varias condiciones físicas y reactivos, han sido estudiadas extensivamente por la posible aplicación para la detoxificación del material contaminado por aflatoxinas. Los siguientes párrafos resumen los resultados.

. **Calor:** Las aflatoxinas en estado seco son muy estables al calor hasta el punto de fusión. No obstante, en presencia de humedad y a temperaturas elevadas hay una destrucción de aflatoxinas en cierto tiempo. Tal destrucción puede ocurrir en harinas de oleaginosas y en cacahuates tostados.

. **Alcalis:** en solución alcalina ocurre la hidrólisis de la mitad de la lactona. Esta hidrólisis parece ser reversible, ya ha sido demostrado que la reciclización ocurre después de la acidificación de una solución básica conteniendo aflatoxina. A altas temperaturas (100°C) los anillos se rompen, pudiendo llegar hasta la pérdida del grupo metoxi del anillo aromático.

. **Acidos:** En presencia de ácidos minerales, las aflatoxinas B₁ y G₁ son convertidas en aflatoxinas B_{2A} y G_{2A} debido a una adición de agua catalizada por ácido. En presencia de anhídrido acético y ácido hidroclicórico la reacción procede más lejos para dar el acetoxi-derivado.

. **Agentes oxidantes:** Muchos agentes oxidantes como el hipoclorito de sodio, el permanganato de potasio, cloro, peróxido de hidrógeno, ozono y perborato sódico, reaccionan con la aflatoxina y cambian su molécula de varias formas, perdiendo fluorescencia. El mecanismo de estas reacciones es incierto y los productos reaccionantes permanecen sin identificar en la mayoría de los casos.

. **Reducción:** Una hidrogenación cuidadosa de las aflatoxinas B₁ y G₁ produce las aflatoxinas B₂ y G₂, respectivamente. La reducción de la aflatoxina B₁ por 3/2 moles de hidrógeno produce tetrahidroaflatoxina. La reducción de las aflatoxinas B₁ y B₂ con borohidruro sódico produce las aflatoxinas RB₁ y RB₂, respectivamente. Esto es resultado de la apertura del anillo de la lactona seguida por una reducción del grupo ácido y una reducción del grupo ceto en el anillo del ciclopentano.

. **Radiación:** La irradiación de la aflatoxina B₁ y G₁ en placas de sílica gel con luz ultravioleta a 365 nm de longitud de onda, convierte ambos compuestos a dos nuevos fotoproductos fluorescentes, el producto de la aflatoxina B₁ es significativamente menos tóxico que el compuesto original.

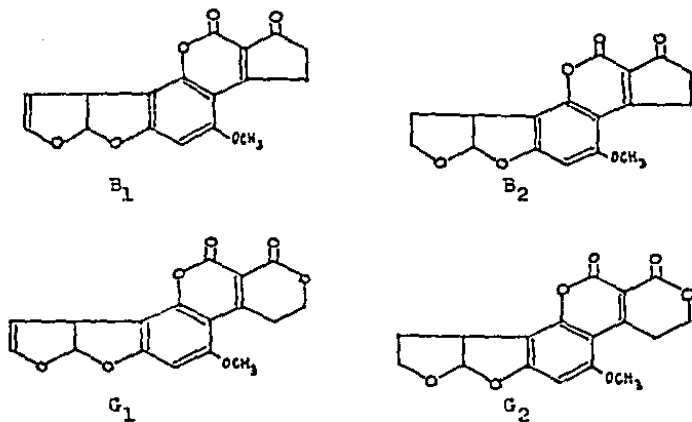


Figura 2. Estructuras de las aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂

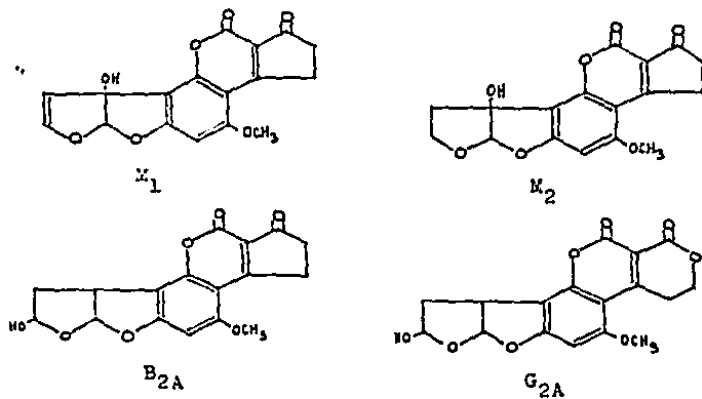
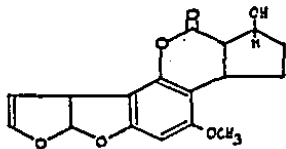
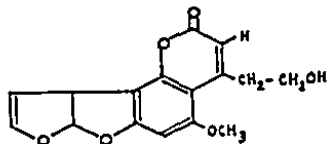


Figura 3. Estructuras de las aflatoxinas M₁, M₂, B_{2A} y G_{2A}

R₀

AFIATOXICOL

B₃

PARASITICOL

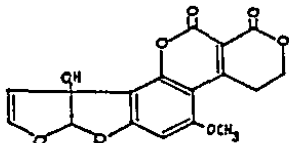
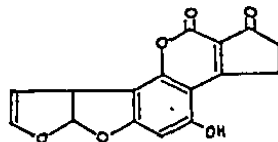
GM₁P₁

Figura 4. Estructuras del aflatoxicol, parasiticol, y las aflatoxinas GM₁ y P₁.

Figura 5. Propiedades Químicas y Físicas de Aflatoxinas y Derivados. (3)

Aflatoxina	Formula Molecular	Peso Molecular	Punto de Fusión	Absorción ultravioleta (362-363nm)	Emisión de Fluorescencia
B ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	312	268-269	21,800	425
B ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314	286-289	23,400	425
G ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328	244-246	16,100	450
G ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330	237-240	21,100	450
M ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328	299	19,000 (357nm)	425
M ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330	293	-	-
B _{2A}	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330	240	20,400	-
G _{2A}	C ₁₇ H ₁₄ O ₈	346	190	18,000	-
R _O	C ₁₇ H ₁₆ O ₆	314	230-234	14,100	425
B ₃	C ₁₆ H ₁₄ O ₆	302	233-234	9,700	-
GM ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₈	344	276	12,000 (358nm)	-

Otras propiedades físicas de las Aflatoxinas (3)

- + Resistencia al calor.
- + Cocimiento no las destruye.
- + Retorteamiento no destruye a todas.
- + La luz solar degrada algunas.
- + Detoxificación con amonía.
- + Prevención del crecimiento de hongos con propionatos y sorbatos no afecta a las aflatoxinas.

También se observan cambios en el espectro de absorción ultravioleta e infrarrojo en soluciones de B₁ y G₂ en buffer de fosfato (PH 7) expuestas a la luz ultravioleta de baja longitud de onda, produciéndose toxinas menos tóxicas.

El anillo de la lactona de las aflatoxinas no se abre por la exposición a la luz ultravioleta, y el motivo de la disminución de la toxicidad puede ser debida a la falta del doble enlace en el anillo de furano o a la pérdida del anillo. La radiación ultravioleta de aflatoxina B₁ en metanol produce una adición de metanol a través del doble enlace del anillo furánico obteniendo dos isómeros.

Las aflatoxinas secas son muy resistentes a las radiaciones gamma; sin embargo, en solución se destruyen.

+ Biosíntesis.

La biosíntesis de la aflatoxina es probablemente, según los estudios, un proceso genéticamente determinado, el cual depende de la disposición de ciertos nutrientes específicos y algunas veces de otros factores ambientales.

Las aflatoxinas son probablemente sintetizadas de unidades de acetatos y moléculas similares pequeñas. A partir de algunos estudios de biosíntesis de micotoxinas (3) se ha demostrado la participación de malonato y coenzima A (CoA), y también que fracciones de acetado 1-¹⁴C)metionina son incorporados a la aflatoxina B₁. Así el acetato es el precursor básico de una o más hidroxilaciones de hidrocarbonos policíclicos, y éstos a su vez de aflatoxinas y compuestos relacionados.

Biollaz et. al (5) fueron los primeros en formar hipotéticamente un esquema de la conversión biológica de hidrocarbonos polihidroxipolicíclicos en aflatoxinas y compuestos relacionados. Todo esto se compone de una secuencia interrelacionada. Cualquiera de las dos, una polihidroxi-naftacena o una polihidroxi-benzantraceno podrían teóricamente ser el punto de inicio para la biosíntesis de aflatoxinas. Alternativamente, un polihidroxi-benzantraceno isomérico puede servir como un precursor de aflatoxinas. En la Figura 6 se muestra una probable secuencia de la biosíntesis de aflatoxinas y compuestos relacionados.

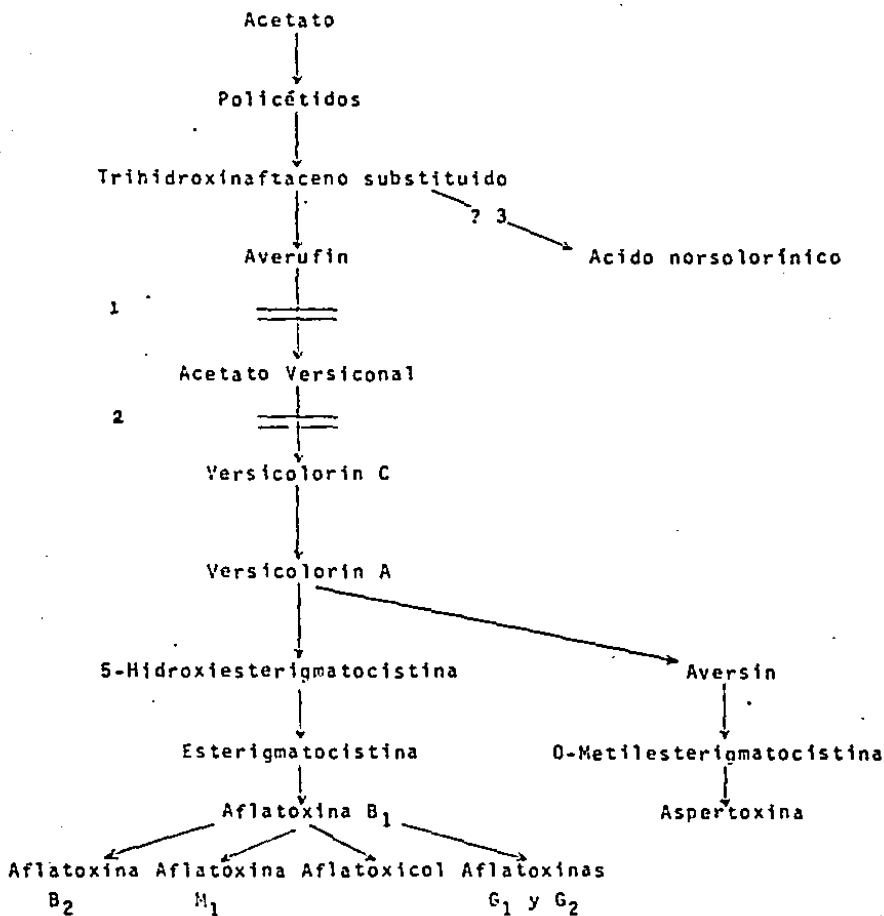


Figura 6. Probable secuencia biosintética para aflatoxinas y compuestos relacionados. 1. Averufin mutante; 2. El resultado de la inhibición por dicloruros; 3. Mutación nitrosoguanidina-inducida.

C) Metabolismo y Efectos Bioquímicos de las Aflatoxinas.

El metabolismo de las aflatoxinas y compuestos relacionados, así como sus efectos sobre el ácido nucleico, metabolismo de proteínas y los consecuentes efectos patofisiológicos han sido materia de estudio de numerosas investigaciones.

. Metabolismo de Aflatoxinas

La molécula de aflatoxina puede ser biodegradada en - por lo menos seis formas:

- (a) Ataque por moléculas de hidrógeno o agua sobre el aislado vinil éter ó 2,3 doble enlace.
- (b) Apertura o degradación de la estructura bisfuranoide.
- (c) Dimetilación de la estructura metoxicumarina.
- (d) Fisión hidrolítica del enlace 7,8 C-O en el anillo de - cumarina.
- (e) Reducción de la ciclopentanona.
- (f) Hidroxilación de uno o más puntos de la molécula previa a la conjugación.

Todo esto se muestra esquemáticamente en la Fig. 7.

Los metabolitos de las aflatoxinas que se han estudiado han sido recuperados de la orina, leche y varios sistemas de incubación in vitro. Los derivados hidroxilados de las aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ son: M₁, M₂, GM₁ y GM₂ respectivamente.

Se ha puesto gran interés en la formación de estos metabolitos hidroxilados de aflatoxina por dos razones: primero, los derivados de las altamente tóxicas aflatoxinas B₁ y G₁ son también muy tóxicos, y segundo, la aflatoxina M₁, siendo el metabolito de aflatoxina B₁ más común, es algunas veces un contaminante accidental de la leche de vaca y así - se introduce en los alimentos del humano.

Se ha establecido una relación lineal entre la ingestión total diaria de aflatoxina B₁ y la concentración de aflatoxina M₁ en la leche. Esta concentración puede ser calculada (en microgramos por litro) utilizando la fórmula $0.637X - 0.044$, donde X es la cantidad diaria de aflatoxina (mg) ingerida por la vaca. De esto se puede concluir que a dosis -

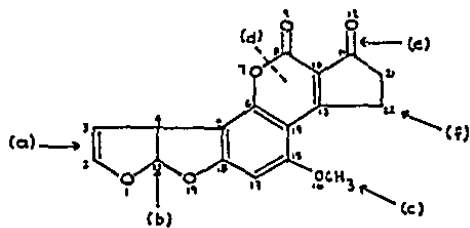


Figura 7. Biodegradación de la aflatoxina B₁

diarias menores de 0.07 mg, no se detectará aflatoxina M₁ en la leche; sin embargo, en la práctica este límite sube a 0.6 mg.

Los estudios reportados por Nabney et al. (3) determinaron que solamente el 8.1% de una dosis oral de una mezcla de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ (1 mg/Kg) fue recuperado en sus formas identificables en la leche, orina y heces de la oveja lechera. Posteriormente Allcroft obtuvo una conclusión similar en las vacas lecheras solamente un 4.5% de una dosis oral de 300 mg de una mezcla de aflatoxinas fueron encontradas como aflatoxinas no metabolizadas. Todo esto sugiere la existencia, hasta ahora desconocida, de varias rutas metabólicas de las aflatoxinas y compuestos relacionados.

En resumen la aflatoxina es convertida en uno o más metabolitos activos biológicamente en el hígado. Antes de ingresar la toxina a las células hepáticas debe pasar la membrana del plasma, un proceso que difiere de especie a especie. Después de esto, la susceptibilidad animal a los efectos agudos y crónicos, por envenenamiento con la aflatoxina está relacionada al destino de la toxina; así, la manifestación toxicológica de ingestión de aflatoxinas depende: del balance entre acción hepatocelular; la ruta y tipo de metabolismo hepático y de la rapidez y forma de eliminación del cuerpo. Se ha considerado que las rutas de exposición peligrosas son la inhalación, absorción o ingestión de aflatoxinas.

Una representación esquemática del metabolismo y mecanismo de acción tóxica de la aflatoxina B₁ por medio de células hepáticas, su conversión a 6 metabolitos y las probables vías de B_{2A} y el epóxido, como toxinas de efectos agudos y crónicos, respectivamente, puede ser observada en la Figura 8.

La toxicidad aguda de las aflatoxinas puede ser aumentada o reducida (3), por ej. la toxicidad se ve aumentada por la ingestión de una dieta baja en proteína o por hipofisectomía, en ambos casos es posible que el grado de metabolismo de la toxina sea reducido, y el caso contrario se proporciona con una dieta colina-deficiente.

• Efectos Bioquímicos de las Aflatoxinas

Muchas investigaciones han tratado de definir los efectos bioquímicos críticos, resultado de la interacción de las aflatoxinas con constituyentes celulares, que tienen varias manifestaciones según la actividad de la aflatoxina, demostrando su toxicidad y cancerogenicidad en animales y cultivos de células, entre otros.

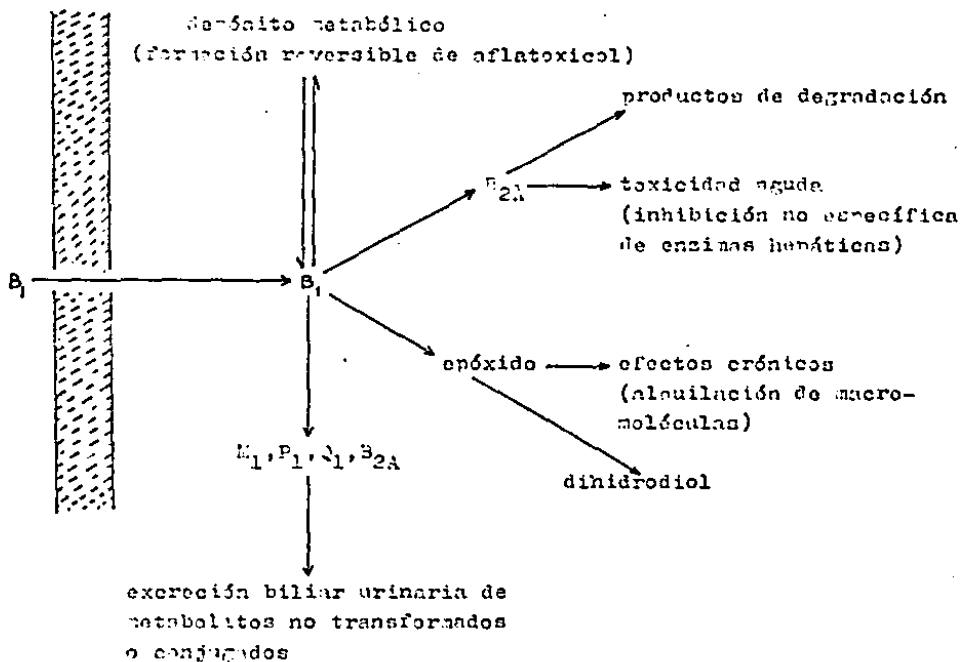


Figura 8. Representación esquemática del metabolismo y mecanismo de acción tóxica de la aflatoxina B_1 (3)

No existe información para definir la secuencia completa de los efectos bioquímicos, ya que los cambios bioquímicos ocurren inmediatamente después de la exposición de animales y cultivos de células a las aflatoxinas.

Según estudios (5) realizados en ratas, se ha comprobado que una gran proporción de una dosis única de aflatoxina B₁ es rápidamente excretada, pero el daño histológico y las alteraciones bioquímicas en el hígado persisten por mucho tiempo, lo que implica que una pequeña cantidad del compuesto y/o de sus derivados indetectables por métodos actuales, permanecen en el tejido por tiempo prolongado después de la ingestión.

La evidencia disponible indica que la aflatoxina B₁ causa alteraciones dramáticas en el ácido nucleico y la síntesis proteica en hígado al administrar dosis agudas. Las inhibiciones de la síntesis de DNA, de la síntesis de RNA nuclear y la alteración de la transcripción de genes aparecen rápidamente después de administrado el compuesto. La interacción con el DNA ocurre en la transcripción, pudiendo resultar una comunicación imparcial en la síntesis de DNA y RNA, por virtud de la inhibición de las polimerasas responsables de sus respectivas síntesis.

No ha sido posible identificar el sitio de acción que funge como primer blanco y que conduce a la muerte celular. Aparentemente la aflatoxina tiene muchos sitios de acción, tanto en el citoplasma como en el núcleo.

En los animales tratados con aflatoxinas, los efectos son virtualmente específicos a un tejido, afectando solamente al hígado, con raras excepciones. Esta generalización es aplicable a la toxicidad debida a las dosis y a la cancerogenicidad resultante de una exposición crónica.

D) Efectos Patofisiológicos de las Aflatoxinas.

Algunas de las interacciones entre la toxina y varios sistemas metabólicos y fisiológicos incluyen efectos sobre las proteínas, lípidos y metabolismo de carbohidratos; interacción con ácidos nucleicos y enzimas; interrupción del transporte de electrones en la cadena respiratoria terminal; acción en membranas celulares y subcelulares; y muchos otros efectos biológicos que hacen muy notables las actividades -- carcinogénicas, mutagénicas y teratogénicas de las aflatoxinas.

. Efectos de las Aflatoxinas en Cultivos Celulares

Se ha comprobado que las aflatoxinas causan efectos citotóxicos en células cultivadas in vitro, entre las que se

incluyen células de hígado humano. En general, el nivel de aflatoxinas requerido para causar destrucción en este tipo - de células cae en el rango de 0.5 a 5 ppm ($\mu\text{g/ml}$) en el medio de cultivo. Niveles menores producen supresión del crecimiento y otros efectos tóxicos.

. Efectos en Membranas Celulares

La liberación de las enzimas lisosomales y la tendencia de contusión del músculo postmortem reflejan la inestabilidad inducida en la membrana.

En las primeras investigaciones realizadas se encontraron concentraciones de aflatoxina de 4×10^{-6} M o mayores en membranas aisladas de organelos in vitro. Más adelante, Bababunmi y Bassi (3), estudiaron los efectos de aflatoxinas en mitocondrias y demostraron un significativo grado de expansión en las del hígado cuando fueron expuestas a la toxina en concentraciones similares a 3×10^{-6} M. Las mitocondrias susceptibles a los efectos de la aflatoxina son las del hígado y del riñón, y no así las del corazón.

Las aflatoxinas también reaccionan con el retículo endoplásmico, causando rápidamente alteraciones en su apariencia granular. La desgranulación del retículo endoplásmico ocurre en la zona peritoneal del hígado, área en la cual se presenta la necrosis. La interacción entre aflatoxinas y varios organelos puede ser explicada sencillamente, de este modo las estructuras similares pueden existir entre las aflatoxinas y los ocupantes normales de los sitios de enlace, incluyendo moléculas relacionadas con la aflatoxina B₁ y la esterigmatocistina. Es posible que haya interacciones similares entre la cumarina y la mitocondria del hígado debido a la relación estructural con la aflatoxina.

. Efectos Generales sobre el Metabolismo Hepático

Uno de los efectos primarios en el metabolismo de la rata es la inhibición del DNA dependiente del RNA en los núcleos celulares del hígado. Las aflatoxinas primero son metabolizadas antes de ejercer su efecto en el RNA polimerasa y la síntesis de proteínas, este efecto no es sensitivo a esteroides. En contraste, la inhibición de la síntesis mitocondrial ("proteínas para exportar") es un efecto tardío. John y Miller (3) demostraron que los efectos citotóxicos procedían de la inhibición de la albúmina, fibrinógeno, y síntesis del α_1 -ácido glicoprotéico en el hígado de ratas.

La aflatoxina B₁ tiene un efecto diferente en el metabolismo de los carbohidratos: la administración intraperi-

toneal de la toxina en pollos reduce, en el hígado, la actividad de glucosa-glucógeno transglucosidasa, y aumenta la actividad de la hexosa monofosfato deshidrogenasa. La reducción de la enzima puede ser el resultado de una inhibición no específica por aflatoxina.

Se encontró que ocurren cambios en las grasas en hígados de varias especies animales envenenadas con aflatoxina. Kato et al. (3) observó que una simple dosis intraperitoneal de la toxina inhibía marcadamente la biosíntesis del colesterol en el hígado. Por otro lado, Clifford y Rees observaron una inhibición similar de la síntesis de fosfolípidos. La síntesis de ácidos grasos hepáticos es afectada en los pollos que consumen alimentos contaminados con aflatoxinas. La inhibición de la síntesis de ácidos grasos resulta de la reducción de la formación de enzimas.

. Otros efectos agudos de las Aflatoxinas

Muchos de los efectos de las aflatoxinas son conocidos desde sus bases bioquímicas, pero otros todavía no pueden ser explicados.

Asociado con su efecto inhibitorio en la síntesis de proteínas, las aflatoxinas han demostrado tener propiedades inmunosupresoras. En bajas concentraciones en alimentos de aves de corral (0.25-0.5 gr/gr) la aflatoxina reduce la resistencia a la infección con *Pasteurella multocida*, *Salmonella* sp., virus, *Coccidia* (*Eimeria tenella*) y *Candida albicans*. Reduce la resistencia a la enfermedad por virus Newcastle y *Asp. fumigatus*, lo que no ha sido demostrado. Sea o no sea reducida la síntesis de anticuerpos por aflatoxinas, la función del sistema reticuloendotelial, es marcadamente afectada en cuanto a su habilidad de limpiar la circulación del carbón coloidal.

Las aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ son capaces de retardar la hipersensibilidad de los cerdos de guinea. Los compuestos estructuralmente relacionados, tales como la esterigmatocistina, cumarina, D-metoxifuraleno y cloruro de fura-zolio son igualmente o más activos que las aflatoxinas y exhiben una reactividad cruzada en las pruebas a alergia de piel.

Otro efecto de las aflatoxinas y sus compuestos relacionados es su acción anticoagulante. La forma de acción todavía no ha sido determinada completamente.

. Efectos Crónicos de las Aflatoxinas

En los efectos crónicos de aflatoxinas en animales, se ha observado desarrollo de hígados grasos, anemia, su -

presión de la inmunidad a enfermedades infecciosas, alteración de crecimiento, reducción del tiempo de vida en aves. - En el caso del ganado, hay pérdidas por reducción en la producción de leche y alteración del crecimiento de animales jóvenes. Los efectos mutagénicos se pueden desarrollar en grandes lapsos de tiempo, presumiblemente por la alquilación del DNA nuclear por un metabolito de la aflatoxina. De este modo, la aflatoxina ha sido identificada como un potente teratógeno y un extremadamente potente cancerígeno.

Aspectos metabólicos de la cancerogenicidad de las aflatoxinas:

- 1) El 2,3-epóxido puede ser el metabolito activo, un cancerígeno proximal derivado de la aflatoxina B₁.
- 2) El mismo agente mutagénico es producido metabólicamente en los hígados de muchas especies de diversos animales, incluyendo el hombre. El 2,3-epóxido de la aflatoxina - B₁ parece ser extremadamente reactivo e igualmente formado por el hígado como un metabolito.
- 3) En común con otros cancerígenos, la aflatoxina y compuestos relacionados inducen la síntesis de reparación del DNA necesario para reemplazar el DNA destruido por cancerígeno.

. Aflatoxicosis

Aflatoxicosis es el síndrome de toxicidad resultante del consumo de material contaminado por los animales y el hombre, usualmente por ingestión. La aflatoxicosis puede ser aguda o crónica, dependiendo de la cantidad o cantidades de toxina ingeridas y del tiempo empleado en ello. Hay una considerable variación en los efectos tóxicos producidos por las aflatoxinas. Entre los factores que influyen en la toxicidad de las micotoxinas se encuentran:

1. Edad.
2. Especie.
3. Bajos niveles de proteína.
4. Bajos niveles de vitaminas como la A, K, etc.
5. Enfermedades concurrentes como la fasciola hepática.
6. Sexo.
7. Stress

Aflatoxicosis Humana

El grado de sensibilidad de daño por aflatoxinas en humanos no es conocido dado que no se han realizado pruebas

para ello. Sin embargo, hay bastante evidencia circunstancial que corrobora además que el tipo de daño sufrido por el hombre es el mismo que sufren otros animales.

En estudios realizados en varios países, principalmente en Africa y el Sureste de Asia, se ha demostrado que una ingestión frecuente de alimentos contaminados con aflatoxinas, provoca cirrosis, hepatocarcinomas -cáncer originado en el hígado-, e incluso la muerte, presentándose principalmente en hombres con edades entre 35 y 45 años. Se determinó que las fuentes de aflatoxinas más comunes fueron: arroz, ajo, chile, pimiento seco y pescado seco.

Aflatoxicosis en cerdos

Los cerdos son una de las especies más susceptibles a la aflatoxicosis de todos los animales estudiados. En todas las especies de animales sometidas a estudio, los primeros signos clínicos de aflatoxicosis son inapetencia y pérdida de peso.

El efecto patológico más importante es el daño hepático. En la mayoría de los animales de granja, las lesiones macroscópicas consisten en la decoloración del hígado con cierto grado de ascitis y edema de las membranas viscerales.

En el siguiente cuadro se muestran los signos clínicos y lesiones en cerdos causadas por el consumo continuo de aflatoxinas. (10)

Especie	Nivel de aflatoxina		Signos clínicos y lesiones
	ppm*	ppb*	
Cerdos (25 Kg)	0.280	280	Baja eficiencia alimenticia
Cerdos (40 Kg)	0.450	450	Lesión hepática
	0.615	615	Crecimiento reducido
	0.810	810	Baja eficiencia alimenticia

(*) ppm es partes por millón y ppb es partes por billón.

Por lo general, niveles de aproximadamente 200 ppb no causan efectos adversos, pero niveles ligeramente superiores disminuyen la tasa de crecimiento, hay depresión, etc...

Conforme los niveles se incrementan se presentan hemorragias, hematuria y muerte. El siguiente cuadro puede ayudar a predecir los efectos adversos que se pueden presentar. (10)

	Desarrollo lento	Hemorragia y muerte
Cerdos (ppb)	200 - 400	400 +

Las cantidades tóxicas acumulativas varían de 0.3 - 15 ppm, la comparación se proporciona a continuación:

Especie	Edad	contenido de aflatoxina (ppm)	duración de la alimentación	Efectos
Porcinos	Recién nacido	0.234	4 días a adulta	Desarrollo lento
Porcinos	2 semanas	0.17	23 días	Anorexia, - depresión, ascitis

En general, aparte de depresión, no hay signos visuales de enfermedad hasta pocos días antes de la muerte.

La dosis letal media (LD 50) oral de aflatoxina B₁ para cerdos es de 0.62 ppm.

E) Características generales del problema de Micotoxinas en los alimentos.

A continuación se señalan las características principales del problema de micotoxinas:

- a) La contaminación de alimentos con micotoxinas puede ocurrir en plantas en crecimiento en el campo, pero las --- fuentes mayores son el secado y almacenamiento inadecuados.
- b) La presencia de hongos en un alimento no es una evidencia de que el producto tóxico esté presente. Por lo tanto los métodos para determinar micotoxinas en alimentos deben ser directamente aplicados a estas toxinas y no al hongo producto de las mismas.
- c) Con excepción de productos líquidos, la contaminación de alimentos con micotoxinas es altamente localizada dentro

- de un lote. El muestreo de un lote es generalmente la mayor fuente de error en el resultado del análisis obtenido.
- d) Las micotoxinas son relativamente estables a solventes orgánicos de diversos tipos de estructuras. La mayoría puede sobrevivir a las operaciones de procesamiento comunes de los alimentos.
 - e) Los niveles de micotoxina relacionados con efectos tóxicos agudos en humanos no son encontrados en alimentos, pero sí en aquellos para animales. De mayor interés son los posibles efectos a largo plazo y bajos niveles de ingestión (efectos de toxicidad subagudos y crónicos, tales como mutagénesis, teratogénesis, y carcinogénesis).
 - f) Las micotoxinas han sido encontradas en alimentos para animales en niveles que pueden producir efectos tóxicos agudos en animales de granja. Existiendo la posibilidad de encontrar residuos de sus metabolitos tóxicos en carne, leche y huevos (3).

En 1960, la FDA (Food and Drug Administration) comenzó a investigar sobre un hongo contaminante de cacahuates que podría contener un componente altamente tóxico; posteriormente se concluyó que estos tóxicos son las aflatoxinas, potentes hepatocarcinógenos en animales experimentales.

Ya que la presencia de un carcinógeno en cualquier alimento representa un peligro potencial, en 1965 la FDA publicó una norma de tolerancia de 30 ppb total de aflatoxinas, pero años más tarde ésta fue reducida al nivel de 20 ppb. Dicha norma está sujeta a cambios dependiendo de los nuevos descubrimientos e información, relacionando los efectos tóxicos de aflatoxinas y el grado en que su presencia en alimentos puede ser evitada.

F) Contaminación por Micotoxinas.

Las micotoxinas son sustancias tóxicas producidas por hongos que crecen en alimentos humanos y para animales. Dependiendo del producto la contaminación con micotoxinas es tanto un problema en el campo como en el almacenamiento, o una combinación de ambos. Es posible prevenir la producción de la toxina evitando el crecimiento de hongos. La prevención es el medio más efectivo y satisfactorio para este problema.

• Aspergillus flavus desarrollada en el campo

Asp. flavus, junto con otras especies Aspergillus y Penicillium, ha sido considerada como un problema solamente

en productos almacenados. Sin embargo, el Asp. flavus ha sido detectado en el maíz antes de la cosecha.

No se conocen exactamente qué factores determinan el desarrollo y crecimiento de Asp. flavus en el campo. Su distribución geográfica en maíz, algodón y cacahuate indica que están involucrados climas calientes y/o altas temperaturas. Marsh y Taylor (5) observaron que el A. flavus fue abundante en áreas con temperaturas extremadamente altas, en el botón del algodón apenas abriéndose.

En zonas de alta humedad relativa, se han observado un mayor número de casos de formación y crecimiento de A. flavus, que en las zonas de baja humedad.

Son muchos los factores físicos y biológicos que afectan la epidemiología de A. flavus en algodón, cacahuate, maíz y otros cultivos. El factor limitante específico varía probablemente de estación a estación y de lugar a lugar.

Según estudios (3), A. flavus se desarrolla primero en tejidos dañados o relativamente inactivos, en los cuales compete con muchos otros saprófitos no específicos. El A. flavus llega a establecerse o dominar cuando las condiciones son más favorables para él que para los otros hongos competidores o bacterias.

Contaminación por A. flavus durante el almacenamiento

Aunque las micotoxinas pueden encontrarse en productos antes del almacenamiento, muchos de los hongos toxigénicos son primariamente hongos de almacén. Especies de Aspergillus y Penicillium son capaces de crecer rápidamente en granos, nueces y otros productos almacenados, si el contenido de humedad es alto.

Son comunes bajos niveles de contaminación antes de la cosecha por A. flavus y otros hongos de almacenamiento, más la inoculación puede venir del aire, suelo, almacenamiento y equipo de manejo. Por lo tanto, los factores críticos en el crecimiento de los hongos en cosechas almacenadas son: el contenido de humedad y la temperatura. El A. flavus requiere de condiciones calientes y humedad relativa de 85% para el desarrollo y formación de la toxina. En el maíz, la humedad correspondiente es arriba de 16%. Los contenidos de humedad bajo los cuales el hongo no se puede desarrollar varían con las especies de granos, pero generalmente corresponden a una humedad relativa de 65 a 70%. En semillas de cereales como maíz, trigo y sorgo, humedades del 13 al 14% son las máximas para un almacenaje seguro; en semillas con alto contenido de aceites las humedades correspondientes son bajas. La soya debe ser almacenada debajo de 12.5% y las semillas de lino debajo del 9%. Aunque las micotoxinas no pue-

den ser producidas en bajos niveles de humedad, éstos sí permiten el crecimiento de hongos, lo cual hace riesgoso el almacenamiento.

Durante el almacenamiento la humedad puede incrementarse debido a goteras que permitan la entrada de lluvia y nieve, por la respiración de insectos, o por hongos en el grano. Los gradientes de temperatura son comunes en el almacén de granos y producen migración de humedad hacia el grano más frío. Esto provoca que tales humedades localizadas favorezcan el crecimiento de hongos y desarrollo de micotoxinas.

Actualmente es posible un almacenamiento seguro de granos a diferentes temperaturas. Distintos lotes de granos pueden ser almacenados en distinta forma a causa de la variabilidad en los daños mecánicos, en la humedad de equilibrio, poblaciones iniciales de hongos y almacenamiento previo.

Las siguientes sugerencias podrían ayudar a un almacenamiento seguro del grano manteniéndolo libre de hongos y micotoxinas:

- Asegurar la humedad exacta requerida.
- Inspeccionar el grano regularmente al menos una vez por semana.
- La inspección semanal debe incluir medición de temperaturas y buscar insectos, moho y manchas de humedad.
- Cualquier incremento de temperatura que no pueda ser explicado, por condiciones climáticas, debe ser considerado un indicador de que un problema está desarrollándose.

Una inspección regular puede eliminar problemas en los granos. Los remedios son más efectivos y las pérdidas son mínimas cuando los problemas son detectados a tiempo.

Un medio de mantener temperaturas bajas y eliminar los gradientes de temperaturas en el almacén es usar ventiladores para aereación. Mantener temperaturas uniformes previene la migración de humedad. Durante los meses de invierno, cuando no se usan los ventiladores, se debe inspeccionar el olor y la temperatura del grano.

• Secado de granos

En años recientes, los granos cosechados muy húmedos son secados para lograr un almacenamiento seguro. Se utilizan para ello secadores de aire caliente, los cuales trabajan a altas temperaturas. Tales secadores requieren grandes cantidades de combustible como gas natural o gas LP, lo cual hace muy caro el secado, y para muchos incosteable.

El secado de los granos también puede efectuarse de manera natural en el campo, pero ocupa más tiempo y las pérdidas de grano atribuidas a insectos, hongos, pájaros, etc., lo hacen tan caro como el secado artificial.

En vista de la alta humedad del grano cosechado y - las crecientes limitaciones del uso de combustibles en los - secadores, hace necesario la búsqueda de sistemas. Estas - alternativas incluyen el incremento de la eficiencia de los se - cadores de alta temperatura, secados a baja temperatura, y - almacenamiento con altas humedades.

El secado a bajas temperaturas se efectúa forzando aire caliente a pasar a través del grano. Este proceso de - secado requiere varios días o semanas, dependiendo principal - mente de la cantidad de grano y el volumen de aire que puede moverse a través de ellos. Uno de los problemas del secado a bajas temperaturas es que no todos los granos son secados simultáneamente; el aire forma un frente de secado que se -- mueve gradualmente a través del grano. El grano bajo la zona de secado se seca; el grano sobre esta zona aproximadamen - te mantiene su contenido de humedad original. Algunos gra - nos no se secan tan rápido para evitar ser invadidos por hongos de almacenamiento y contaminarse con micotoxinas, depen - diendo de la humedad inicial del grano, la cantidad del daño por el tratamiento mecánico, la uniformidad del flujo de aire, y las temperaturas promedio. El frente de secado puede ser eliminado por la mezcla periódica o la rotación del gra - no durante el período de secado.

El calor solar puede ser colectado de varias formas para ayudar en el secado de granos, pero en realidad la adición de calor suplementario no acorta el tiempo de secado. - La única forma de disminuir el tiempo total de secado es in - crementar el flujo de aire y disminuir la cantidad de grano a secar.

El secado a bajas temperaturas requiere atención -- cuidadosa y alerta por parte del operador.

. Almacenamiento de granos a alta humedad

Como una alternativa al secado, el grano puede ser almacenado a alta humedad (20-30% o más) y usado como alimento para ganado. El grano con alta humedad puede ser almacenado bajo condiciones herméticas tratado con químicos tales como ácido propiónico. Estos sistemas protegen el grano con tra los hongos y micotoxinas. Se ha visto que en alimentos para ganado, un grano con gran humedad es superior a un grano secado, en términos de eficiencia alimenticia y/o grado - de conversión.

Varios tipos de estructuras son usadas para el almacenaje o ensilamiento. Debido a que muchos hongos pueden desarrollarse a muy bajas concentraciones de oxígeno, pequeñas cantidades de aire en los silos de grano de alta humedad pueden provocar grandes problemas. Los silos más satisfactorios en términos del mínimo daño, son llamados unidades de acero cerradas. Representan una inversión de gran capital, pero generalmente produce una alta calidad de alimento con pérdidas mínimas por daños o fermentación.

El uso de preservativos químicos en granos es un eficiente desarrollo en almacenaje de los granos con alta humedad. El ácido propiónico y la violeta de genciana son los más efectivos. El ácido propiónico es un fungicida seco, no corrosivo, reconocido como el mejor fungicida disponible, aprobado para su uso en alimentos tanto por la FDA y la EPA. La violeta de genciana es una tintura básica de trifenilmetano intensamente coloreada, cuyo uso principal es el de un agente micostático efectivo en el alimento para aves y cerdos. El ácido propiónico es el material más usado, aplicado como ácido propiónico al 100% o en mezclas con ácido acético, ácido isobutírico y formaldehído. Stewart et al. (10) demostraron que el ácido propiónico fue superior a otros agentes químicos respecto a la inhibición en la producción de aflatoxinas, a una concentración de 4 ug/ml.

Propiamente tratado con ácido, el grano con cualquier contenido de humedad puede ser almacenado por lo menos un año sin daños por hongos. El grano tratado con ácido no es afectado por exposición al aire y no requiere de ningún tipo particular de estructura de almacén. Este tipo de grano sólo es adecuado para alimentación de ganado.

La cantidad de conservador requerida depende principalmente de la humedad del grano, y en menor cantidad de la temperatura y duración del almacenamiento.

El grano tratado con ácido debe ser inspeccionado regularmente durante el almacenaje. Como cualquier sistema de almacenamiento, el tratamiento por ácido tiene ventajas, desventajas y riesgos. Los daños pueden ocurrir si la tasa de la aplicación es baja o no uniforme, de tal manera que existen granos no tratados. La migración de humedad puede causar manchas donde el hongo crece. Al igual que el secado de grano, la aereación puede ser usada para eliminar los gradientes de temperatura que causan la migración de humedad. Los hongos también pueden desarrollarse en el grano ácido tratado que está en contacto con el concreto o acero no protegidos. Tales superficies deben ser cubiertas por plástico o con pintura resistente a ácidos.

La tabla de la Figura 9 muestra las cantidades de ácido propiónico requeridas para preservar los granos con va

rios contenidos de humedad. Un rango del tratamiento está dado para cada contenido de humedad.

Figura 9. Acido propiónico requerido para prevenir el crecimiento de mohos en granos de alta humedad. (3)

Contenido de humedad (%)	%	lb/ton	kg/ton
18	0.3-0.6	6-12	1.7-5.4
22	0.5-0.8	10-16	4.5-7.2
26	0.6-1.0	12-20	5.4-9.0
30	0.8-1.2	16-14	7.2-10.8

Importancia del problema de las Aflatoxinas

La importancia de las aflatoxinas desde el punto de vista de salud pública y protección del alimento se puede resumir de la siguiente manera:

1. De todas las sustancias conocidas hasta el momento, tanto naturales como artificialmente sintetizadas, las aflatoxinas poseen la más alta carcinogenicidad (vía oral en muchas especies animales).
2. Las aflatoxinas son productos metabólicos derivados de organismos vivos (hongos), las cuales existen en el sistema ecológico natural. Por lo tanto, resulta prácticamente imposible erradicar a los hongos productores de aflatoxinas.
3. Se sabe que los productos agrícolas, como el arroz, trigo, maíz, etc. son los mejores sustratos para la producción experimental de aflatoxinas.
4. Los hongos productores de aflatoxinas se encuentran ampliamente distribuidos en las áreas tropical y subtropical.
5. Diferentes reportes indican que las aflatoxinas no sólo presentan el más alto potencial carcinogénico como un efecto crónico; sino que también ejercen efectos agudos fatales en los niños.

6. Se ha reportado que la aflatoxina B₁ y su metabolito M₁ se encuentran presentes en la leche de las madres que han consumido alimentos contaminados con la aflatoxina.
7. Los resultados de experimentos practicados en animales domésticos sometidos a dietas conteniendo aflatoxinas, indican que la aflatoxina B₁ transmitida por el alimento y la aflatoxina M₁ metabolizada en el organismo animal pueden ser detectadas en los productos animales, tales como leche, huevos, carne. Tanto las aflatoxinas B₁ como la M₁ son termoestables, la temperatura de descomposición de la B₁ es de 268 ± 9°C y de la M₁ 299-300°C, siendo por tanto muy difíciles de destruir a las temperaturas usuales de cocción de los alimentos.
8. Las técnicas actuales de procesamiento de los alimentos (exceptuando la refinación del aceite) son inadecuadas para destruir o eliminar los productos agrícolas contaminados, sin alterar su valor nutritivo.

La OMS/FAO, en vista de que los productos agrícolas son distribuidos a través del mundo, recomendaron en 1968 -- que la cantidad total de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ en los productos agrícolas no deben exceder de 30 ppb.

Dado que en nuestro país la fijación de los niveles de tolerancia están en vías de establecerse, sería conveniente considerar las fijadas por la FDA quienes permiten niveles de 20 ppb para alimento de embarque interestatal, también permiten 20 ppb en granos que serán procesados para consumo humano.

G) Detección de Aflatoxinas

La fluorescencia que exhiben las aflatoxinas bajo la iluminación de luz ultravioleta de onda larga ha sido utilizada como base de métodos extremadamente sensibles para su detección y estimación. Aún bajo condiciones ideales la precisión de la estimación visual de las aflatoxinas está condicionada por las limitaciones de la agudeza del observador. Otra forma de cuantificar es la estimación objetiva, que se basa en la espectrofotometría ultravioleta, por medio de la cual son cuantificadas las bandas fluorescentes reveladas en la placa de sílica gel; mediante esta técnica tenemos una precisión razonable, superior a la estimación visual.

Las pruebas químicas para detectar la presencia de aflatoxinas primeramente la B₁, incluyen extracción con solventes orgánicos, separación y cuantificación por minicolumna, capa fina, alta precisión o cromatografía de rayo laser. Si la muestra contiene otros compuestos fluorescentes, se deben incorporar ciertas etapas de limpieza o purificación; p

ra asegurar la validez de la prueba, se recomienda incluir - pruebas adecuadas, para separar la aflatoxina de otros com - puestos fluorescentes con valores de R_f similares. Para es - tablecer la potencia relativa de un compuesto y como prueba confirmatoria para las aflatoxinas se utiliza el Bioensayo, donde los principales animales de laboratorio utilizados para ello son los patos, pollos y cuyos, en los que se observa si enferman o mueren, haciéndose además un examen microscópi - co de sus hígados para ver si existe el daño típico causado por aflatoxinas. Desde su descubrimiento, la aflatoxina ha sido evaluada en una gran variedad de sistemas biológicos, - en mayor proporción que cualquier otra micotoxina. Muchos - estudios han descrito los efectos de las aflatoxinas en los diversos sistemas estudiados como son: cultivos de células, microorganismos, casi todos los animales de laboratorio y de mésticos, y en adición a los sistemas comunes los efectos de las aflatoxinas han sido reportados en camarón, trucha, hu - rón, semillas germinadas y otros sistemas usados para eva - - luar la respuesta biológica.

Actualmente los métodos para aflatoxinas y otras -- micotoxinas están bajo estudio y revisión por la American Oil Chemists Society (AOCS), la American Association of Cereal Chemists (AACC), la Association of Official Analytical Chemists (AOAC), y la International Union for Pure and Applied Chemis - try (IUPAC).

La AOAC ha adoptado un número mayor de métodos de - análisis que las otras sociedades.

H) Control de Aflatoxinas

Desde el descubrimiento del problema de contamina - ción con aflatoxinas en cacahuates en los Estados Unidos, la FDA y el U.S. Department of Agriculture (USDA) empezaron a - investigar y a mantener programas de vigilancia establecien - do una lista de productos altamente susceptibles a este tipo de contaminación como son: además de los cacahuates, semi - llas de algodón, maíz, nueces de Brasil, copra, varios árbo - les de nueces domésticas y pistaches. Continuando los pro - gramas de vigilancia se encontró un amplio rango en cuanto a productos susceptibles a contaminación. Actualmente se si - gue investigando y llevando programas de vigilancia sobre es - tos productos, al mismo tiempo que se cuidan y vigilan mu - - chos otros productos que pudieran ser contaminados.

+ Detoxificación

Una vez que se han formado las aflatoxinas es proba - ble que persistan, ya que son estables al calor, no se des - truyen por un cocinado ordinario y aún en autoclave o bajo -

presión pierden poca potencia. Son resistentes a la destrucción o inactivación de un gran número de productos químicos que han sido probados con este propósito.

Los productos que se someten a detoxificación son - aquellos que sobrepasan el límite de contenido de aflatoxinas establecido por la FDA.

Numerosas técnicas se han intentado para detoxificar los materiales contaminados naturalmente con aflatoxinas, entre las que se incluyen:

- Separación física: Se basa en la separación de las porciones contaminadas, eliminando granos y semillas inmaduras, rotas o decoloradas. Es aplicable a granos, semillas y nueces, donde la contaminación alcanza proporciones relativamente pequeñas.
- Extracción por solventes orgánicos: Se han estudiado varios solventes, entre ellos el metoximetano (dimetil-éter) que se ha probado en alimentos para animales (10), pero se requiere de más estudios toxicológicos y evaluación de su seguridad.
- Inactivación microbiana: Se han probado microorganismos (3), que puedan convertir las toxinas en compuestos inofensivos. Miles de clases de hongos, bacterias, levaduras, actinomicetos y algas se han probado, y sólo una bacteria, *Flavobacterium auranticum* detoxificó la leche, --- aceite de maíz, mantequilla de cacahuete, cacahuates, --- maíz y frijol de soya, contaminados artificialmente con aflatoxina, lo que no garantiza que suceda lo mismo con el material contaminado en forma natural.
- Inactivación química: ha sido la más estudiada (5), se -- han hecho tratamientos de detoxificación con amoníaco, metilamina, hidróxido de sodio, peróxido de hidrógeno, ozono e irradiación ultravioleta, pero ninguno ofrece un tratamiento comercialmente viable; sin embargo, de todas las técnicas examinadas hasta hoy el método más económico para detoxificar granos y alimentos de animales es la amoníaco o adición de amoníaco al grano o alimento contaminado, pero todavía se encuentra en proceso de evaluación.

El remedio más efectivo para el problema de las --- aflatoxinas es la prevención, por lo que se debe cuidar el almacenamiento, manejo y proceso de productos susceptibles a contaminación, para evitar que sean invadidos por *Aspergillus flavus*. Además se deben establecer sistemas de vigilancia --- adecuados.

+ Control de las Micotoxinas en alimentos para animales.

Para el control de la contaminación por micotoxinas

en el alimento, se requiere seguir cuatro medidas básicas:

1. Prevención del crecimiento inicial de los hongos y la -- subsecuente contaminación por micotoxinas.
2. Detección de micotoxinas en alimentos y eliminación se - lectiva de las porciones contaminadas.
3. Inactividad o destrucción de todas las toxinas que pue - dan estar presentes por medios químicos, físicos y/o en - zimáticos.
4. Identificación avanzada de posibles amenazas por nuevas micotoxinas.

Para la utilización de semillas o granos que contie - nen aflatoxinas u otra toxina de hongos se debe considerar:

1. Los niveles permitidos o tolerables fijados por los orga - nismos competentes.
2. La posibilidad de residuos de aflatoxinas, o sus metabo - litos en la leche, carne, huevos, etc.
3. El nivel de aflatoxinas que pueden causar efectos adver - sos que van desde retraso del crecimiento hasta hemorra - gias y muerte.
4. Los efectos de los hongos o toxinas diferentes a las --- aflatoxinas.
5. Otras consideraciones.

C A P I T U L O I I I

P A R T E E X P E R I M E N T A L

- 3.1 Introducción práctica.
- 3.2 Método.
- 3.3 Resultados y Discusión.

CAPITULO III

PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Introducción práctica

La determinación de aflatoxinas en productos agrícolas presenta dificultades y problemas característicos asociados con el análisis de cada uno de ellos.

Es importante señalar que la cantidad de toxina en alimentos frecuentemente es pequeña y generalmente su distribución en una muestra no es homogénea por lo que el muestreo debe hacerse cuidadosamente. Debido a esto una de las principales dificultades en la detección de aflatoxina en materiales contaminados es la obtención de una muestra representativa, tanto de un solo lote como en cientos de toneladas. La muestra obtenida es dividida para alcanzar la máxima reducción práctica y por medio de un buen mezclado obtener una distribución efectiva de las porciones contaminadas.

Los métodos usados para el análisis cualitativo y cuantitativo de las aflatoxinas no son altamente específicos. En general, estos se basan en cromatografía de capa fina, -- usando muestras auténticas de toxinas como estándares de referencia, los cuales se comparan con los extractos obtenidos de las muestras analizadas.

Para llevar a cabo la identificación y cuantificación de la aflatoxina B₁ presente en alimentos balanceados -- terminados para uso porcícola, se tomaron 12 muestras en las que se incluyeron 3 clases de alimento, al azar, que son producidas en la Fábrica de Alimentos de la ciudad de Irapuato, -- propiedad de la Unión Ganadera Regional de Porcicultores del Estado de Guanajuato. Los tres tipos de alimentos que fueron muestreados son: alimento de "destete", alimento para la etapa de "crecimiento" y alimento para la etapa de "engorda".

Las muestras fueron recolectadas y trasladadas para su análisis en los meses de julio y agosto en la Escuela de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Guadalajara.

Para el análisis cualitativo y cuantitativo de la aflatoxina se seleccionó el método más adecuado de acuerdo a las características propias del producto (6).

Antes de analizar las muestras obtenidas se realizó

una prueba preliminar para verificar si el método era aplicable y satisfactorio al producto.

La preparación de estándares se debe realizar cuidadosamente, y observando precauciones particulares, ya que las aflatoxinas son altamente tóxicas, además de que cuando se encuentran en forma liofilizada, por su natural electrosférica tienden a dispersarse en áreas de trabajo.

3.2 Método

* Reactivos:

- a) Mezcla Benceno-Acetonitrilo (98+2)
- b) Solventes: Acetonitrilo, Acetona, Benceno, CHCl_3 , éter de petróleo, Acético glacial, Propanol.
- c) Acido sulfúrico: aprox. 0.018 N, disolver 1 ml H_2SO_4 en 2 lt H_2O
- d) Soluciones estándar de dicromato de potasio:
 - (1) Aprox. 0.25 milimolar (mM): pesar exactamente 78 mg $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (estándar primario) y disolver en 1.0 lt 0.018 N H_2SO_4 . Calcular molaridad a 3 cifras significativas - (MW $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$).
 - (2) Aprox. 0.125 mM: diluir 25 ml 0.25 mM $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ a 50 ml con 0.018 N H_2SO_4 en matraz aforado.
- e) Acetato de plomo neutro
- f) Tierras diatomáceas Hyflo Super-Cel.
- g) Sílica gel con revelador de fluorescencia (Merck Sílica gel 60 HF254).
- h) Alúmina ácida.

+ Equipo:

- Soxhlet
- Balanza analítica
- Placas cromatográficas 20 X 20 cm
- Micropipeta
- Viales
- Estufa
- Espectrofotómetro de Absorción UV

- Equipo usual de laboratorio: papel filtro, matraces, vasos de precipitados, matraces aforados, pipetas, buretas, etc.
- Lana de algodón absorbente.

- Estándar de Aflatoxina B₁
(Estándar de Micotoxina Aflatoxina B₁ = Calbiochem)

Al frasco que contiene la aflatoxina seca B₁ añadirle un volumen de benceno-CH₂CN, calculando dar una concentración de 8-10 µg/ml y usando el peso de la aflatoxina marcado en la etiqueta como guía, agitar y transferir a un matraz graduado, cuidadosamente. La determinación de la concentración exacta de aflatoxina se realiza en el espectrofotómetro (200-400 nm), el cual es calibrado primero con las soluciones estándar de dicromato de potasio para después hacer las mediciones adecuadas (6). Después de conocer la concentración se diluye una porción a 0.5 µg. Los frascos que contienen los estándares se envuelven en papel aluminio y se guardan a 0°C.

• Proceso Analítico General

El procedimiento para la determinación de aflatoxina en un producto dado, involucra algunas o todas de las siguientes etapas:

1. Preparación de la muestra para el análisis.
2. Desgrasado: Puede ser necesario si el material a ser analizado contiene más del 5% de aceite. Es también posible omitir esta etapa y extraer ambos, aceite y toxina en la etapa 3 y remover el aceite durante la etapa 4.
3. Extracción de la toxina usando un solvente adecuado.
4. Purificación del extracto: Tanto para remover materia les fluorescentes interferentes como para remover aceite.
5. Apreciación de la concentración de aflatoxina en el extracto.
6. Confirmación química: Se hace para diferenciar ambigüedades entre aflatoxinas y otros materiales fluorescentes que pudieran estar presentes.
7. Bioensayo: Si es requerido para propósitos confirmatorios.

En este trabajo el proceso analítico general fue desarrollado hasta la etapa 5.

1. Preparación de la muestra para el análisis: La muestra para análisis puede ser tomada usando procedimientos de cuarterización.
 2. Desgrasado: La muestra analítica (20-50 gr) es empacada en un dedal de extracción y sometida a extracción con éter de petróleo aromático-libre (rango de ebullición 40-60°C) o hexano en un Soxhlet. El solvente residual es eliminado del dedal que contiene el material desgrasado por calentamiento en horno. El residuo desgrasado es luego pesado.
- 3 y 4. Extracción de la toxina y procesos de purificación:

Método: Pesar 50 gr de muestra y ponerla en un frasco mezclador, añadir acetónitrilo-agua (120 ml, 4:1 vol/vol) y ayuda filtro (10 gr), y mezclar a alta velocidad por 3 min. Filtrar el extracto a través de un papel filtro acanalado (Whatman N° 4 o equivalente) y coleccionar los primeros 50 ml de filtrado. Añadir este filtrado (50 ml) a solución acetato de plomo (20 ml de acetato de plomo neutro (200 gr) y acético glacial (3 ml) preparados a 1 lt con agua destilada) y agua destilada (130 ml) en un vaso de precipitados de 250 ml. Agitar la solución y permitir reposar por 3 min. para que la floculación o precipitación ocurra. Añadir ayuda filtro (10 gr), agitar y filtrar a través de papel filtro es triado (Whatman N° 4 o equivalente). Si el filtrado es nebuloso, vaciar la primera porción (30 ml) de regreso sobre el papel filtro para asegurar un filtrado claro.

Medir 100 ml de este filtrado, meter a un embudo de separación de 125 ml, añadir benceno (3 ml), agitar vigorosamente por 1 min. A continuación siguiendo el método se debería de drenar la fase acuosa y lavar el extracto de benceno para posteriormente aplicar la minicolumna cromatográfica -- preparada previamente y desarrollar con solventes adecuados para observar más tarde, con luz UV de onda larga. Pero debido a que en la prueba preliminar la separación del extracto de benceno de la fase acuosa fue difícil de realizar a causa de la similitud de densidades de los componentes de la mezcla, se hizo la siguiente modificación: en lugar de tratar de separar completamente el extracto de benceno lo que se hizo fue drenar en el embudo de separación 90 ml de la fase acuosa (inferior) y colocar los 10 ml restantes en un vaso de precipitados de 25 ml, volver a colocar los 90 ml drenados en el embudo de separación y después de reposar 5 min drenar los 85 ml más bajos y los 5 ml restantes añadirlos a los 10 ml del vaso de precipitados, evaporar después los solventes (en campana) casi a sequedad, agregar si es necesario 0.5 ml de benceno acetónitrilo (98+2), guardar en un vial y cerrar hasta utilizarse para correr en CCF. Con esta modificación se obtuvieron resultados positivos en la prueba preli

minar, por lo que todas las determinaciones en las muestras analizadas se realizaron de esta forma.

IDENTIFICACION DE MICOTOXINAS POR CROMATOGRAFIA DE CAPA FINA (CCF)

Se realizó según método general descrito (6). La identificación y determinación de la concentración de aflatoxinas en el extracto por cromatografía de capa fina se hace utilizando sílica gel con indicador de fluorescencia, eluyen te acetona-cloroformo (1+9) y como disolvente del extracto, benceno-acetonitrilo (98+2).

3.3 Resultados y Discusión

En la tabla de la Figura 10 se señalan los resultados obtenidos de la determinación de aflatoxina B₁ en las muestras de alimento balanceado terminado para uso porcícola. En esta tabla se indican las muestras que presentaron en las placas cromatográficas fluorescencia bajo luz UV de onda larga, así como las que presentaron manchas azules de aflatoxina B₁ y las observaciones correspondientes. Para facilitar el manejo de datos, las muestras analizadas fueron numeradas de la siguiente forma: las muestras 1, 2, 3 y 4 corresponden a alimento de "Destete", las muestras 5, 6, 7 y 8 a alimento de "Crecimiento" y las muestras 9, 10, 11 y 12 a alimento de "Engorda".

De las 12 muestras totales analizadas, sólo 2 muestras contenían aflatoxina B₁ en cantidad suficiente para ser cuantificada, pero sólo por estimación visual, ya que dichas cantidades eran pequeñas para hacerlo por espectrofotometría UV; éstas fueron las muestras 8 y 11, que presentaron manchas fluorescentes similares a las del estándar de B₁ (azul) el cual tuvo un P_r de 0.6 y las muestras observaron un R_f de 0.57, aunque debido a la baja concentración las manchas de éstas eran tenues. Estas concentraciones encontradas son pequeñas si las comparamos con el límite dado por la FDA de 20 ppt. Esto es debido probablemente a que en la elaboración de estos productos se tiene especial cuidado en la calidad de las materias primas, ya que no se elaboran con fines comerciales sino para consumo interno. Aunque es común en este tipo de productos que un 60 a 75% de muestras analizadas contengan micotoxinas, según referencias de laboratorios especializados en ello.

Algunas muestras presentaron fluorescencia pero no formaron una mancha propia, sino una mancha fluorescente tenue corrida que llegó a la altura del estándar, por lo que es posible la existencia de trazas de aflatoxina B₁; tal es el caso de las muestras 3, 5 y 9.

Figura 10. Tabla de Resultados del Análisis de Aflatoxina B₁ en muestras de alimento balanceado terminado para uso porcícola.

Muestra	W(nr)	Mlt de std aplicados en placa	Fluorescencia Azul	AFB ₁ Mg/Kg	Observaciones
1	50	5	-	-	ninguna
2	50	5	+	-	tenue mancha fluorescente (R _f 0.2)
3	50	5	+	-	trazas mancha fluorescente corrida a altura de std.
4	50	5	-	-	ninguna
5	50	5	+	-	trazas mancha fluorescente corrida a altura de std.
6	50	5	+	-	tenue mancha fluorescente (R _f 0.2)
7	50	5	-	-	ninguna
8	50	5	+	0.22	mancha tenue debido a baja Conc.
9	50	5	+	-	trazas mancha fluorescente corrida a altura de std.
10	50	5	+	-	mancha tenue (R _f = 0.2)
11	50	5	+	2.18	mancha tenue debido a baja Conc.
12	50	5	+	-	tenue mancha fluorescente (R _f 0.2)

Otras muestras sí mostraron manchas fluorescentes, pero sus R_f eran pequeños, como las muestras 2, 6, 10 y 12 - cuyos valores de R_f fueron 0.1, 0.18, 0.2 y 0.15 respectivamente, lo que indica posiblemente la presencia de trazas de -- aflatoxina B_1 o derivados de la misma.

Hubo muestras como fueron la 1, 4 y 7 que no presentaron fluorescencia alguna, lo que indica la ausencia total de aflatoxina B_1 en dichas muestras. Esto puede ser indicativo de un control eficiente.

En los resultados se puede observar que la incidencia de aflatoxina B_1 fue mayor en el alimento de "Embarada", disminuyendo ésta en el alimento de "Crecimiento" y siendo aún menor en el alimento de "Destete", esto es debido probablemente a la composición de tales alimentos mencionada anteriormente.

ESTA TESTA NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

CAPITULO IV
CONCLUSIONES

CAPITULO IV

CONCLUSIONES

Los alimentos balanceados para animales son fuente común de micotoxinas y en especial de la aflatoxina B₁ (AFB₁) debido a la diversidad de origen y variedad de materias primas utilizadas en su elaboración.

De acuerdo a los resultados obtenidos se pudo comprobar la existencia de aflatoxina B₁ en alimentos balanceados terminados para uso porcícola, y aunque el nivel de contaminación es bajo, ya que se requieren niveles de 200 ng/g o más en el alimento para producir intoxicación, la sola presencia de esta toxina o derivados puede considerarse como índice de toxicidad.

De lo anterior se puede deducir que no existe un control higiénico eficiente en el almacenamiento y manejo de semillas, granos y cereales. Por lo tanto, es conveniente sugerir que para evitar el crecimiento de *A. flavus* y la producción de aflatoxinas es necesario intensificar y aumentar la eficiencia del manejo y de las prácticas de almacenamiento que vienen siendo utilizadas. Así como también se debe dar más apoyo a la investigación para el desarrollo de nuevas variedades de maíz, sorgo y otros granos resistentes al ataque de hongos toxigénicos. Los métodos analíticos actuales para micotoxinas deben ser perfeccionados para asegurar un control real de este problema. Por último, es adecuado sugerir como un parámetro de control de calidad la determinación de aflatoxinas en las empresas que procesan productos agrícolas.

R E S U M E N

Las Aflatoxinas son micotoxinas producidas por la contaminación natural de hongos en los alimentos y productos alimenticios. Los principales hongos productores de estas toxinas son: Aspergillus flavus y Aspergillus parasiticus, los cuales proliferan y producen niveles altos de aflatoxinas cuando se presentan las condiciones adecuadas.

El estudio de las micotoxinas y de las aflatoxinas principalmente se intensificó desde que en 1960 en Inglaterra se encontró a éstas como causantes de una gran mortandad de pavos. Las aflatoxinas son compuestos altamente tóxicos, y de las nueve que han sido aisladas, la aflatoxina B₁ es la más tóxica, carcinogénica, teratogénica y mutagénica, y debido a estas propiedades, es considerada de primera importancia en la salud pública y animal.

Las aflatoxinas se encuentran como contaminantes en un gran número de productos alimenticios, entre los que se encuentran semillas, granos y cereales principalmente; esto ocurre sobre todo cuando se tiene una técnica de almacenamiento inadecuada, con altos contenidos de humedad y temperaturas de almacenamiento elevadas. Los hongos contaminantes están presentes en el suelo, aire, semillas y microflora forrajera en todo el mundo.

Severos daños hepáticos y carcinogénicos son los principales efectos producidos por las aflatoxinas. Muchas especies de animales son afectadas por las aflatoxinas al ingerir alimentos contaminados. En general, los animales jóvenes son más susceptibles a los efectos tóxicos que los animales adultos de la misma especie. Los síntomas clínicos de aflatoxicosis aguda en la mayoría de las especies incluyen disminución del apetito, crecimiento lento, hemorragia, ictericia de membranas mucosas, convulsiones y muerte. Animales comerciales y de laboratorio alimentados con productos contaminados con niveles de aflatoxina B₁ de 200 ng/g o mayores, sufrieron intoxicación, la cual se ve favorecida por una deficiencia de proteínas, vitaminas o de ciertos elementos tra_za o esenciales.

Intoxicaciones o infecciones de origen alimenticio son frecuentes aún en nuestros días, debido principalmente a un manejo inadecuado de los alimentos o a un almacenamiento deficiente de los mismos, que permiten el crecimiento de microorganismos patógenos y la producción de metabolitos tóxicos. Debido a esto, y a que los granos y cereales constituyen una de las principales fuentes alimenticias tanto para humanos como para animales, es importante el control de calidad en los productos terminados listos para consumo.

CAPITULO V
BIBLIOGRAFIA

CAPITULO V

BIBLIOGRAFIA

- 1) Christensen Clyde M.; MOLD, MUSHROOMS AND MYCOTOXINS; - Printed in the United States of America; North Central - Publishing Company; 1975.
- 2) Purchase J.F.H. (Editor); MYCOTOXINS; Amsterdam, Printed in the Netherlands; Elsevier Scientific Publishing Company; - 1974.
- 3) Wylie Thomas D., Morehouse Lawrence G. (Editores); --- MYCOTOXIC FUNGI, MYCOTOXINS, MYCOTOXICOSES; New York, -- Printed in the United States of America; 1978; Vol. 1, 2 y 3.
- 4) Dreyer R.W., E.B. Lillehoj, and A. Ciegler; AFLATOXIN -- AND RELATED COMPOUNDS; 1972; pág. 44-49.
- 5) Goldblatt Leo A. (Edi-or); AFLATOXIN; 2nd ed.; New York, Printed in the United States of America; Academic Press; 1972.
- 6) Horwitz W.; OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS OF THE ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC); 12th ed.; --- Washington, D.C., U.S.A.; 1975.
- 7) John Wiley & Sons.; ENCYCLOPEDIA OF CHEMICAL TECHNOLOGY; 3rd ed.; U.S.A.; 1981; V. 16
- 8) Edds George T.; AFLATOXINS IN ANIMAL FEEDS AND GRAINS -- RELATED TO ANIMAL HEALTH; Rockville, Maryland; Conference on Mycotoxins; Food and Drug Administration; 1979; pág. - 110-153.
- 9) S.A.R.H.; ANUARIO ESTADISTICO DE LA PRODUCCION AGRICOLA - DE LOS ESTADOS UNIDOS MEXICANOS; México, 1982.
- 10) MANUAL DE FUNGICIDAS REKA; Edo. de México, Impreso en México; Corporación Industrial Reka, S.A. de C.V.; 1986.
- 11) López Matteo Carlos, Bayona Román (Editores); BIBLIOTECA PRACTICA AGRICOLA Y GANADERA; Barcelona, España; Océano - Difusión Editorial, S.A.; 1984; V. 2
- 12) Winn R.T. and Lane G.T.; AFLATOXIN PRODUCTION ON HIGH --- MOISTURE CORN AND SORGHUM WITH A LIMITED INCUBATION; J. - Dairy Sci. 61:762 (1978).

- 13) CIENCIA Y DESARROLLO: CONACYT; N° 58; Sept. - Oct.; --
año X; 1984; págs. 9-17.
- 14) Tejeda de H. Irma; MANUAL DE LABORATORIO PARA ANALISIS
DE INGREDIENTES UTILIZADOS EN LA ALIMENTACION ANIMAL; -
primera impresión, 1983; págs. 327-351.
- 15) Knake, Rao and Deyoe; A RAPID QUALITATIVE TEST FOR AFLA
TOXIN; Kansas State University Fedd Stuffs; November 27,
1972.