



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**MICOFLORA DE MAZAPAN Y MANTEQUILLA DE
CAHAUATE: ANALISIS DE RIESGOS POTENCIALES.**

T E S I S
PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G A
P R E S E N T A :
ROCIO ALVAREZ ROMERO

MEXICO, D. F.

FALLA DE ORIGEN

1990



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 está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

INDICE

	Pag.
INTRODUCCION -----	1
MATERIALES Y METODOS -----	9
RESULTADOS Y DISCUSION -----	14
CONCLUSIONES -----	32
LITERATURA CITADA -----	33

INTRODUCCIÓN

El cacahuete (Arachis hypogea) es un sustrato muy susceptible a la contaminación con aflatoxinas tanto cuando se está formando en el campo como durante su cosecha, transporte y almacenamiento (Zuber y Lillehoj, 1979). Debido a las implicaciones económicas y sanitarias que tienen las aflatoxinas para la población humana, tanto las autoridades gubernamentales en todo el mundo como agencias privadas han enfocado y en ocasiones unido sus esfuerzos para tratar de resolver el problema.

En México, a pesar de que el problema de contaminación ha causado preocupación desde la época del descubrimiento de las aflatoxinas, no ha habido estudios sistemáticos y continuos de monitoreo que conduzcan al establecimiento, con bases académicas sólidas, generadas en el país, de regulaciones sanitarias, por lo que se está intentando iniciar este tipo de estudios y de generar conocimientos que sienten las bases para investigaciones posteriores. Consideramos importante conocer las condiciones en que se encuentran algunos productos elaborados a base de cacahuete tales como mazapán y mantequilla de cacahuete, que son consumidos por la población humana del Distrito Federal, por medio de una inspección amplia con el siguiente objetivo:

Determinar la micobiota, identificando los hongos hasta especie y analizar el riesgo potencial en los productos de cacahuete (mazapán y mantequilla de cacahuete) tanto desde el punto de vista micotoxigéno como de biodeterioro.

ANTECEDENTES

El cultivo del cacahuete (Arachis hypogaea), es uno de los más importantes entre las oleaginosas (Guiller y Silvestre, 1970). Al igual que otras plantas como el cacao, es considerado originario de México. Esta planta está adaptada principalmente a climas tropicales y subtropicales, requiere de una temperatura promedio de 25 a 30°C, y se adapta desde el nivel del mar hasta una altitud ligeramente superior a 1,800 msn., por lo que se cultiva en climas templados cuando las heladas ya no representan un peligro (Robles, 1980).

Desde el punto de vista nutricional, el cacahuete es un fruto importante, ya que en 100 g de cacahuete tostado, la porción comestible equivale al 71 %; proporciona de energía 571 kcal, 27.6 g de proteínas, 46.7 g de grasas y 20.9 g de carbohidratos. El aceite extraído del cacahuete contiene cerca del 53 % de ácido oléico que proporciona energía, y el 25 % del ácido linoléico que es el más importante de los ácidos grasos esenciales para el cuerpo humano (Robles, 1980).

Debido a sus propiedades nutricionales, diversas instituciones internacionales como la Organización Mundial de la Salud FAO/UNICEF consideraron a principios de los sesenta, a la pasta de cacahuete como complemento proteico en alimentos para niños desnutridos (WHO/FAO/UNICEF, 1962), además de ser un excelente alimento para la industria pecuaria, principalmente aves de corral y ganado porcino.

A partir de este fruto, pueden ser procesados un gran número de productos comestibles: como aceite, mantquilla, harina de cacahuete y alimentos balanceados para diferentes tipos de ganado, además diversas golosinas como mazapán,

garapiñados, chocolates, palanquetas, etc., las cuales son consumidas en nuestro país principalmente por niños de edad escolar.

Sin embargo, se ha demostrado que el cacahuete es susceptible de ser invadido por Aspergillus flavus, tanto durante su formación en el campo (Zuber y Lillehoj, 1979) como durante su almacenamiento (Hesseltine et al., 1976), y este hongo es capaz de producir aflatoxinas en diversos alimentos, granos y semillas en condiciones naturales.

Las aflatoxinas fueron descubiertas a principios de los años sesenta en cacahuete, como resultado del brote de una enfermedad desconocida en esa época, que causó la muerte a 100 mil pavitos; estas aves habían sido alimentadas con harina de cacahuete que provenían de lotes contaminados con Aspergillus flavus (Lancaster et al., 1961; Sargeant et al., 1961; Spensley, 1963; Stoluff, 1976).

A partir de esta década se realizaron estudios epidemiológicos en diferentes partes del mundo, como en regiones de Africa y Sureste de Asia en donde es frecuente el consumo de alimentos enmohecidos y donde se corrobora la existencia de una relación entre la ingestión de aflatoxinas y la incidencia de cáncer primario de hígado (FAO, 1978).

En Zwavilandia, Uganda y Tailandia se han realizado estudios sobre la distribución regional de productos alimenticios para el consumo humano contaminados con aflatoxinas y la distribución geográfica de cáncer en hígado, y se ha evidenciado que existe relación, ya que en áreas en donde la contaminación de estos alimentos es alta existe también mayor número de casos reportados de cáncer primario de hígado; esto no descarta la posibilidad de que existan otros

factores que contribuyan al padecimiento de esta enfermedad (Shank, 1979).

Como se ha visto a través de estos reportes las aflatoxinas son metabolitos secundarios producidos por algunos mohos (Bu'Lock, 1975; 1980; Patterson, 1980) que pueden ser encontrados en alimentos para el consumo humano y animal, actuando como mutágenos, teratógenos y cancerígenos, causando en los animales experimentales daños hepáticos y lesiones renales (Butler, 1965; 1969).

Estudios experimentales demuestran que los efectos tóxicos son más dramáticos en animales jóvenes que en adultos y en los machos que en las hembras, y son intensificados por alguna forma de desnutrición (Wogan, 1968).

Debido a que las micotoxinas representan problemas tanto sanitarios como económicos, muchos países han incluido regulaciones en sus legislaciones sanitarias para controlar este tipo de contaminación en productos básicos; tal es el caso de la Legislación Oficial del Mercado Común Europeo (Anónimo, 1969; 1974).

Otra legislación similar existe en la República Federal de Alemania en donde se mencionan al cacahuete y al maíz entre otros productos básicos de importancia controlada. En este país el Ministerio para la Juventud, la Familia y la Salud en 1978 establece por ley un máximo de 10 μ g/kg de toxinas destinadas al consumo humano (FAO, 1978).

Investigaciones preliminares en condiciones de laboratorio fueron realizadas con el fin de determinar las condiciones necesarias para la producción de aflatoxinas, encontrándose que se requiere de la influencia de un sustrato

adecuado y de cepas de A. flavus productoras de aflatoxinas, debido a que no todas las cepas de este hongo son capaces de producirlas

Los factores físicos más importantes en la producción de toxinas son la temperatura y la humedad, ya que puede estar presente la cepa productora pero si no se encuentra en las condiciones favorables no habrá producción de toxinas; sin embargo, el hongo puede ser indicador de biodeterioro del producto (Hesseltine, 1976).

La temperatura, es un factor que influye para la producción y acumulación de aflatoxinas (Rabie et al., 1965; Schindler et al., 1967; Schroeder y Hein, 1967; Lillehoj, 1983), dándose la formación de toxinas dentro de una extensa gama de temperaturas que van de los 11 a los 36°C, con una producción óptima en los 28°C. Estos límites dependen del sustrato y de las condiciones físico ambientales en los cuales se encuentre la cepa productora; sin embargo, cabe señalar que en condiciones naturales la temperatura varía considerablemente (Sorenson et al., 1967 en Hesseltine, 1976).

En un estudio realizado sobre los efectos de la temperatura para la producción de aflatoxinas en cacahuate, Diener y Davis 1969 y 1970 demostraron que los límites de la temperatura para el crecimiento y producción de aflatoxinas fue de 14 a 41°C, siendo la óptima de 25 a 35°C para que A. flavus invada a la semilla (Pettit et al., 1971).

La mayoría de los hongos reportados como contaminantes de cacahuate son mesófilos ya que crecen de 10 a 40°C a excepción del género Penicillium que crece desde 5°C hasta 50°C y algunas de sus especies han sido reportadas como productoras de toxinas y como indicadores de biodeterioro (Schindler,1977;

Schroeder y Hein, 1967).

Otro factor importante para la producción de aflatoxinas es el contenido de humedad y depende directamente de la humedad relativa de la atmósfera donde se encuentren. En atmósferas con humedades relativas menores de 75 % no habrá desarrollo de hongos en los granos almacenados. La humedad en equilibrio de un producto a una humedad relativa determinada depende de su composición química, por lo tanto, en diversos productos es diferente la humedad relativa que determina el nivel de humedad para el desarrollo de los hongos. La clase de hongos que crecen en un producto dependen también de la actividad fisiológica del sustrato. Si el sustrato es activo, se limita el desarrollo de los hongos saprobios tales como los géneros Aspergillus y Penicillium; si es fisiológicamente inactivo como en el caso de productos viejos sometidos a tratamientos térmicos, los miembros de estos géneros crecen en el producto y pueden producir metabolitos tóxicos (FAO, 1978). Sin embargo, la humedad óptima del grano de cacahuete para ser invadido por el género Aspergillus va del 20 al 30 % de humedad relativa (Pettit et al., 1971).

El deterioro del cacahuete puede ser aumentado por las malas condiciones de almacenamiento, transporte, secado y envasado con altos niveles de humedad. La calidad del cacahuete puede ser degradada por la invasión de hongos y acumulación de aflatoxinas (Pettit y Taber, 1968).

La contaminación de alimentos por hongos implica problemas de baja calidad y menor valor nutritivo; esto ha sido un problema para los agricultores y distribuidores de productos agrícolas. Debido a que la invasión por hongos es muy frecuente, se han realizado diversos estudios sobre la micobiota presente en diversos alimentos, entre ellos, cacahuete y productos derivados.

Durante la década de los sesenta se reportaron estudios de la micobiota de cacahuete donde se observó que estos frutos son infectados por hongos durante su desarrollo, cosecha o en el almacenamiento (Zuber y Lillehoj, 1973). Entre los mohos más comunes encontrados invadiendo al cacahuete están algunas especies de Aspergillus, Penicillium y Fusarium reportados en la literatura como productores de toxinas. Rhizopus y Alternaria también son identificados como causantes de pudrición pre-emergente de cacahuete. Otros trabajos han listado grupos similares de hongos invadiendo a este fruto (Austwick y Ayerst, 1963; Pettit y Taber, 1968).

En Japón y Tailandia se elaboraron estudios sobre la micobiota más frecuente en alimentos comercializados de estas regiones. Uno de los hongos que se presentó con mayor frecuencia fue A. flavus, pero también Penicillium, Fusarium, Rhizopus y otros Mucorales. Con relación a los alimentos invadidos por estos hongos, el cacahuete y sus derivados fueron de los productos que presentaron mayor incidencia de contaminación, en particular con A. flavus. La presencia de estos mohos sugiere riesgos de toxicidad para las poblaciones consumidoras (Hitokoto et al., 1983; Anudarahanonta et al., 1983).

Sobre la posible contaminación con mohos y aflatoxinas, de la golosina elaborada a base de cacahuete conocida como mazapán, Martínez y García (1989) en un estudio preliminar no detectaron aflatoxinas, pero sugieren que la presencia de Aspergillus y Penicillium en las cantidades encontradas, además de representar un riesgo sanitario potencial, también puede manifestar uno de biodeterioro.

Dada la naturaleza microscópica de los hongos, la mayoría de las veces su invasión en los alimentos pasa inadvertida, y su presencia solo puede ser

determinada mediante el cultivo en el laboratorio de estos alimentos, para aislar a los hongos que los invaden; sin embargo, frecuentemente los hongos tóxicos desaparecen de los granos o productos en los que han crecido al verse limitados por las condiciones desfavorables para su crecimiento, quedando solamente las micotoxinas, lo que particularmente es difícil verificar en un determinado producto, sea esta materia prima o transformada, teniendo por tanto que recurrir a técnicas químicas y especializadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

MUESTRAS

Mazapán.

(Contiene: azúcar, cacahuete, saborizante artificial)

Se analizaron 11 marcas comerciales diferentes, que por su amplia distribución fueron de fácil acceso en diversos comercios del Distrito Federal, principalmente de la zona sur, siendo un total de 33 muestras.

Mantequilla de cacahuete.

Fueron analizadas 43 muestras (de 100 g c/u), adquiridas en 14 establecimientos localizados en San Pedro Atocpan Delegación Milpa Alta. Se llevaron a cabo 4 muestreos en intervalos de 15 días por muestreo.

MICROBIOTA

Para determinar la cantidad de hongos presentes en los productos analizados, fue adaptada la técnica descrita por Warcup (1950) para suelo, la cual consiste en pesar 0.1 g de la muestra, transferirla a una caja de Petri estéril y mezclar las partículas con una gota de agua también estéril. Añadir posteriormente 10 ml de medio de cultivo a una temperatura de 45°C. El medio de cultivo utilizado fue, papa dextrosa agar tergitol y aureomicina (PDTA).

Trozos de papas peladas	200 g
Dextrosa	5 g
Agar	15 g
Tergitol	200 ppm
Aureomicina	30 ppm
Agua destilada	1 000 ml

Los trozos de papas fueron hervidos en 1 000 ml de agua destilada durante 15 minutos para hacer una infusión esta fue filtrada en cuatro capas de manta de cielo; posteriormente le fueron agregados la dextrosa y el agar y se esterilizó en un autoclave a 120°C y 15 lb de presión por 15 minutos. Cuan

do la temperatura del medio de cultivo bajó a 45°C le fue agregado el tergl
tol y la aureomicina.

Las muestras fueron incubadas a 26°C durante ocho días, transcurrido
este tiempo se procedió al conteo, purificación e identificación de colonias
de hongos que aparecieron (Tulte, 1969).

PURIFICACIÓN.

Para la purificación de los géneros Aspergillus y Penicillium se uti
lizó una solución de czapek agar.

Sacarosa	30 g
Nitrato de Sodio	2 g
Fosfato Dibásico	1 g
Sulfato de Magnesio	0.5 g
Cloruro de Potasio	0.5 g
Sulfato Ferroso	0.01 g
Agar	15 g
Agua destilada	1 000 ml

Todos los ingredientes fueron disueltos perfectamente y esteriliza-
dos en un autoclave a 120°C y 15 lb de presión durante 15 minutos, posterio
mente las colonias fueron sembradas en 3 puntos e incubadas durante 7 días a
26°C.

Para Fusarium, Alternaria, Rhizopus y Mucor fue preparado el medio
de cultivo, papa dextrosa agar (PDA).

Trozos de papa	200 g
Dextrosa	20 g
Agar	15 g
Agua destilada	1 000 ml

Se realizó una infusión de papa en 1 000 ml de agua destilada. Poste
riormente se agregó la dextrosa y el agar y se esterilizó a 120°C y 15 lb de
presión durante 15 minutos; después las colonias fueron sembradas en 3 puntos
e incubadas durante siete días a una temperatura de \pm 26°C.

IDENTIFICACIÓN

El medio de cultivo solución czapek agar también fue usado para la identificación del género Aspergillus; fueron hechas preparaciones microscópicas, para lo cual se tomó una pequeña porción del cultivo colocándolo sobre el portaobjeto y lavando la preparación con alcohol al 70 %, para que por fenómeno de tensión superficial fuesen separados los conidios de las fiálides y de esta manera poder observar estas últimas estructuras con mayor facilidad; después le fue adicionado una gota de medio de montaje (lactofenol) cubriéndose posteriormente con un cubreobjeto. La identificación se llevó a cabo mediante el uso de las claves de Raper y Fennell (1965).

Para la identificación del género Penicillium fueron utilizados tres medios de cultivo diferentes sugeridos por Pitt (1979).

Extracto de levadura agar (CYA)

K_2HPO_4	1.0 g
Czapek concentrado	10 ml
Extracto de levadura	5 g
Sacarosa	30 g
Agar	15 g
Agua destilada	1 000 ml

Extracto de malta agar (EMA)

Extracto de malta	20 g
Peptona	1 g
Glucosa	15 g
Agar	15 g
Agua destilada	1 000 ml

Glicerol 25 N (G 25)

H_2HPO_4	0.75 g
Czapek concentrado	7.5 ml
Extracto de levadura	3.7 g
Glicerol	250 ml
Agar	12 g
Agua destilada	750 ml

Todos los Ingredientes de cada medio fueron disueltos y esterilizados en un autoclave a 120°C y 15 lb de presión durante 15 minutos.

Para la identificación de las especies de este género se utilizó la técnica propuesta por Pitt (1979). Por cada dos aislamientos se utilizaron 7 cajas de Petri estériles; en dos cajas con CYA se sembraron en tres puntos y por separado la cepa 1 y la 2 y de la misma manera se realizó en EMA, incubando las cuatro cajas a 26°C. En otra caja de CYA sembraron las dos cepas en dos puntos, incubándose a 5°C; se repitió el mismo procedimiento en otra caja de CYA y se incubó a 37°C. Por último en una caja de G 25N se sembraron ambas cepas en dos puntos cada una, incubándose a 26°C. Todas las cajas permanecieron durante siete días en sus respectivas temperaturas. Cabe señalar que para sembrar las cepas de este género se prepara una dilución de esporas de cada aislamiento, en viales preparados de la siguiente manera: en cada vial se agrega 0.2 - 0.4 ml de agar fundido (0.2 %) y detergente sigma (.05 %) esterilizándolos posteriormente, ya que las esporas del género Penicillium son secas y debido a esto se expanden con rapidez y facilidad realizándose de esta manera cultivos monospóricos.

Posteriormente se tomaron características macroscópicas de las colonias necesarias para la identificación; una vez tomadas éstas, se realizaron preparaciones microscópicas, las cuales fueron hechas de la misma manera que para el género Aspergillus, tomando pequeñas porciones del medio de cultivo, colocándolas en el portaobjeto y lavando la preparación con alcohol al 70 % para que por fenómeno de tensión superficial se separen los conidios de las filídes y así se pueden ver estas con mayor facilidad; adicionándoles por último una gota de medio de montaje (lactofenol con un colorante, fucina) y se cubre con un cubreobjeto.

Con los datos obtenidos de las características macroscópicas y microscópicas se llevó a cabo la identificación mediante el uso de las claves de Pitt (1979).

Para identificar las especies del género Fusarium se utilizó el medio de cultivo papa sucrosa agar.

Extracto de papa	500 ml
Sucrosa	20 g
Agar	20 g
Agua destilada	500 ml

Se disuelven perfectamente todos los ingredientes y se esterilizan en un autoclave a 120°C y 15 lb de presión durante 15 minutos.

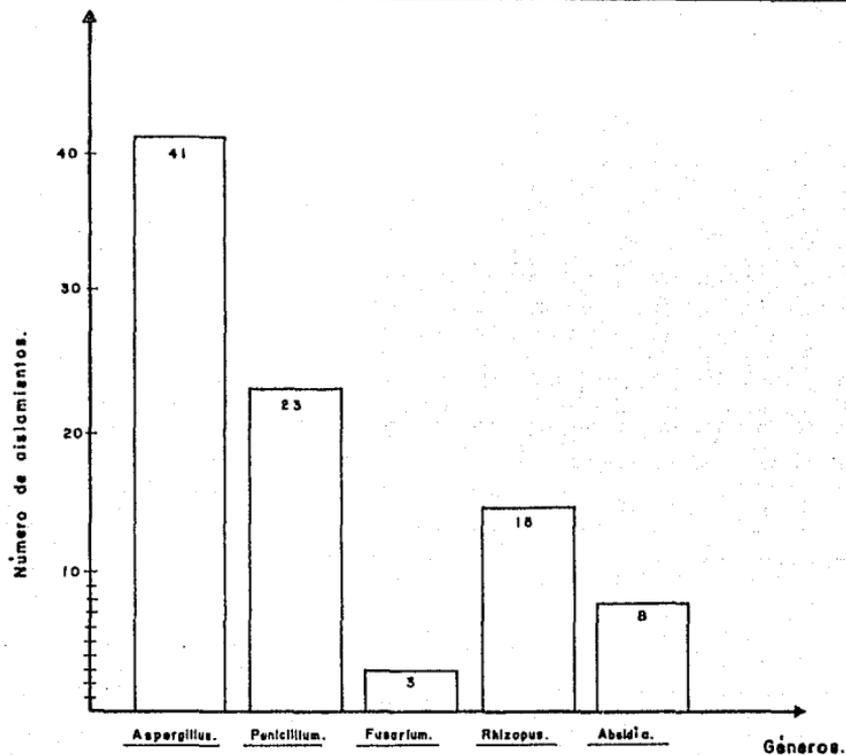
Los aislamientos de este género se incuban a temperatura ambiente con un fotoperíodo de 12 hrs. luz y 12 hrs. oscuridad durante 7 días; a partir del 4o. día fue medido el tamaño de la colonia. Se realizaron preparaciones microscópicas (igual que en el género Penicillium) y se procedió a la utilización de claves propuestas por Booth (1971).

Finalmente para la identificación de los géneros Alternaria, Absidia y Rhizopus se utilizó el medio de cultivo Papa Dextrosa Agar mismo que se utilizó anteriormente para su purificación. Es importante mencionar que estos hongos se identificaron hasta nivel género, para lo cual se utilizaron las claves de Barnett y Hunter, (1972).

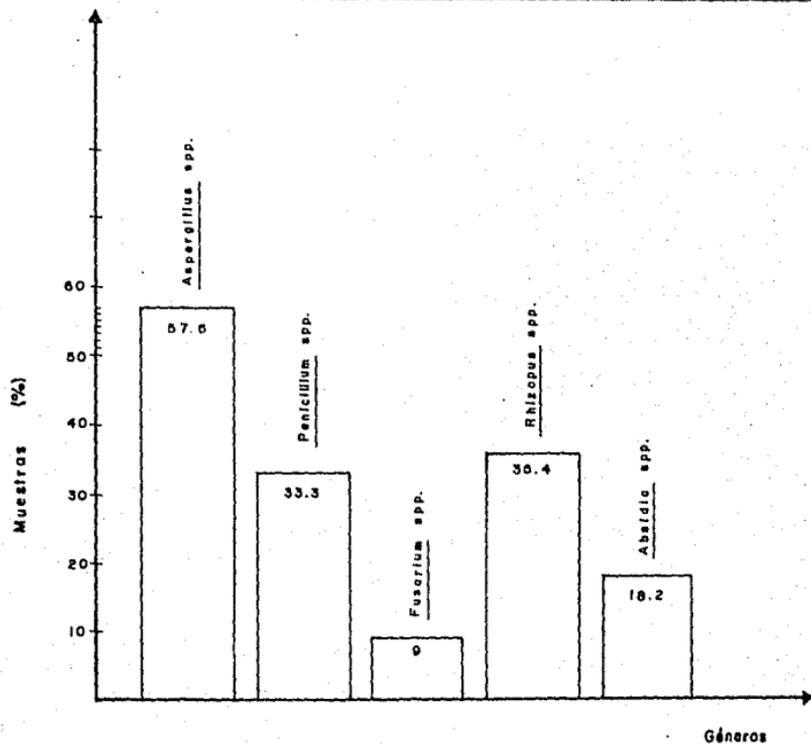
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las 33 muestras de mazapán estudiadas, fueron obtenidos 41 aislamientos de Aspergillus, 23 de Penicillium, 3 de Fusarium, 15 de Rhizopus y 8 de Absidia (Gráfica 1) siendo un total de 90 aislamientos. Considerando el número de muestras contaminadas con los diferentes géneros de hongos podemos notar que de 33 muestras analizadas, 19 estuvieron contaminadas con Aspergillus, lo que representa 57.6 % del total de las muestras; con Penicillium 11/33 (33.3 %), Fusarium 3/33 (9 %), Rhizopus 12/33 (36.4 %) y Absidia 6/33 (18.2 %) (Gráfica 2). Aspergillus, Penicillium y Fusarium son géneros conocidos como productores importantes de micotoxinas en condiciones naturales, en diversos productos agrícolas y alimentos en general. En el caso de fruto del cacahuete, Aspergillus flavus produce aflatoxinas en forma natural, tanto en condiciones de campo como durante el almacenamiento; Penicillium y Fusarium han sido reportados como productores de micotoxinas en este sustrato en condiciones de laboratorio, por lo que la presencia de estos géneros tanto en número de aislamientos como en número de muestras contaminadas es preocupante y resulta necesario conocer las especies de los géneros mencionados para asegurarnos del problema potencial que pudiesen representar en un alimento como el mazapán, ya que es consumido principalmente por la población infantil, la cual con base en la evidencia circunstancial es la más susceptible a padecer problemas como consecuencia de la ingestión de alimentos contaminados con aflatoxinas (Shank, 1979).

Durante la determinación de las especies de Aspergillus encontramos: del grupo A. flavus, A. flavus Link en 6 de las 11 marcas analizadas y A. oryzae (Ahlburg) Cohon, en 5/11; del grupo A. terreus, A. terreus Thom en 2/11; del grupo A. nidulans A. nidulans (Eidam) Wint 1/11; del grupo



Gráfica 1. Número de aislamientos de cada uno de los géneros obtenidos de 11 marcas comerciales de mazapán.



Gráfica 2. Porcentaje de muestras de mazapán invadidas por hongos.

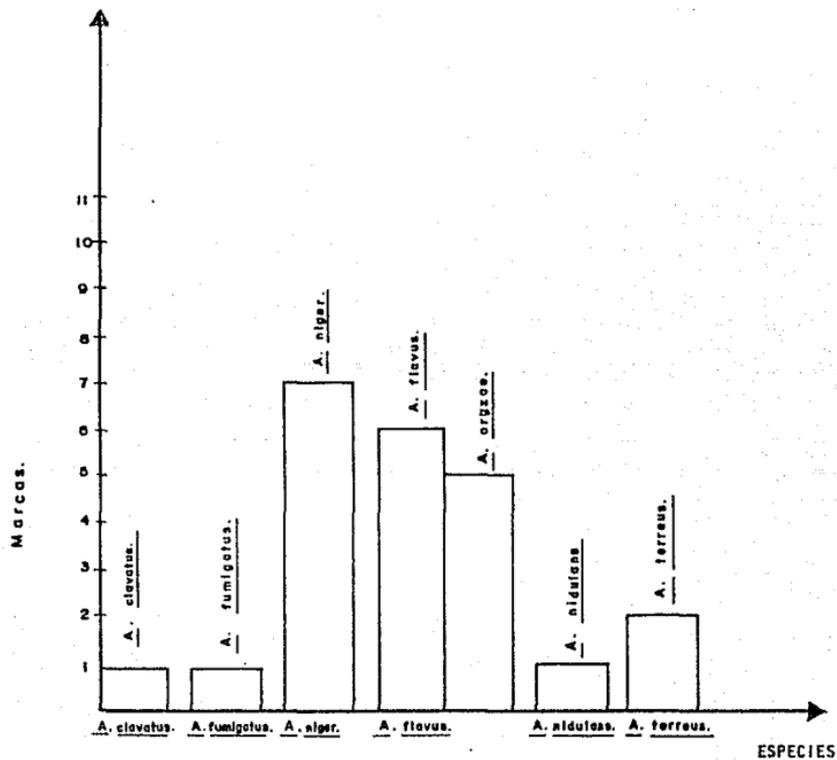
A. fumigatus, A. fumigatus Fresenius 1/11; y del de A. clavatus, A. clavatus Desmazieres 1/11 (Gráfica 3).

De las 7 especies aisladas, A. flavus representa un problema potencial de producción de aflatoxinas. Considerando el número de aislamientos de A. flavus en las diferentes marcas de mazapán, encontramos 1 aislamiento en las marcas 2, 6 y 11; 2 en las marcas 4 y 9; y 5 aislamientos en la marca 5. A pesar de no tener un análisis de varianza entre las marcas, la marca 5 se observa más contaminada (Gráfica 4).

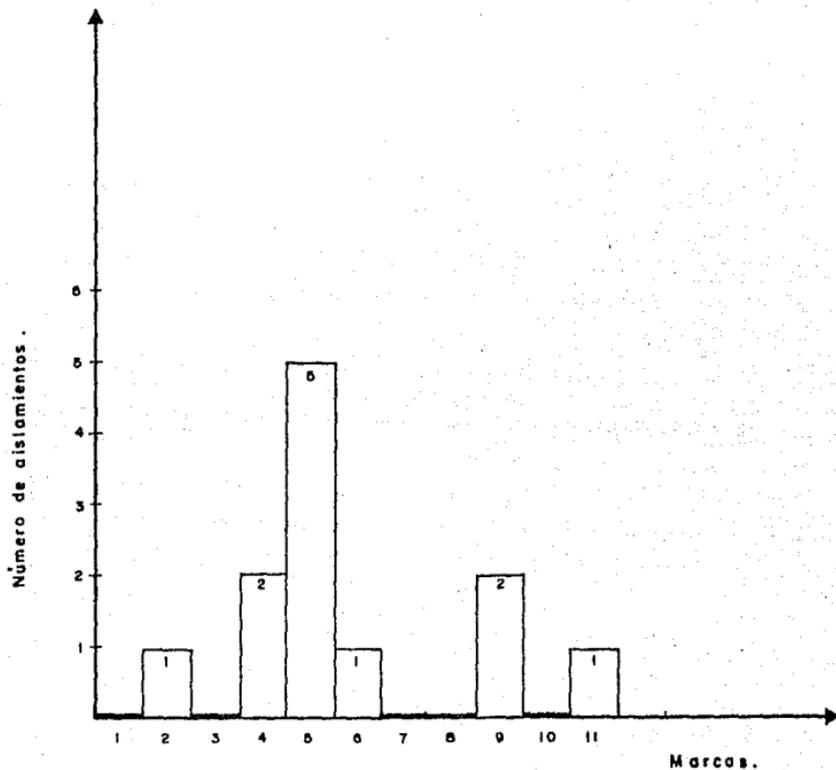
A. oryzae es una especie reconocida por su capacidad para producir metabolitos usados en la producción de alimentos (Hesseltine, 1965); en la actualidad no está reconocida como productora de aflatoxinas, de hecho Whicklow (1984) la considera como cepa domesticada de A. flavus, esto último induce a pensar en la posible regresión a la forma silvestre, lo que supondría la posible readquisición de su capacidad para producir aflatoxinas, ya que fue aislada de un producto terminado y no de un lote de cacahuate usado para la producción de mazapán.

A. terreus, A. nidulans y A. clavatus son indicadores de biodeterioro, A. niger causa pudrición al cacahuate después de la germinación, provocando serio deterioro al fruto (Gibson, 1953), y A. fumigatus además de causar problemas sanitarios, provoca enfermedades pulmonares en el hombre y en animales se ha reportado induciendo infecciones subcutáneas y lesiones primarias en tracto digestivo y reproductor de hembras (Gaucher y Sargent, 1894; Renón, 1895).

Un género importante y presente en este estudio fue Fusarium, del cual sólo se identificó la especie Fusarium oxysporum Schlecht, que se presentó con una frecuencia menor a las otras especies pero que no deja de preocuparnos ya que es una especie productora de toxinas.



Gráfica 3. Número de marcas de mazapán invadidas por diversas especies del género Aspergillus.



Gráfica 4. Número de aislamientos de A. flavus Link obtenidos de diferentes marcas de mazapán.

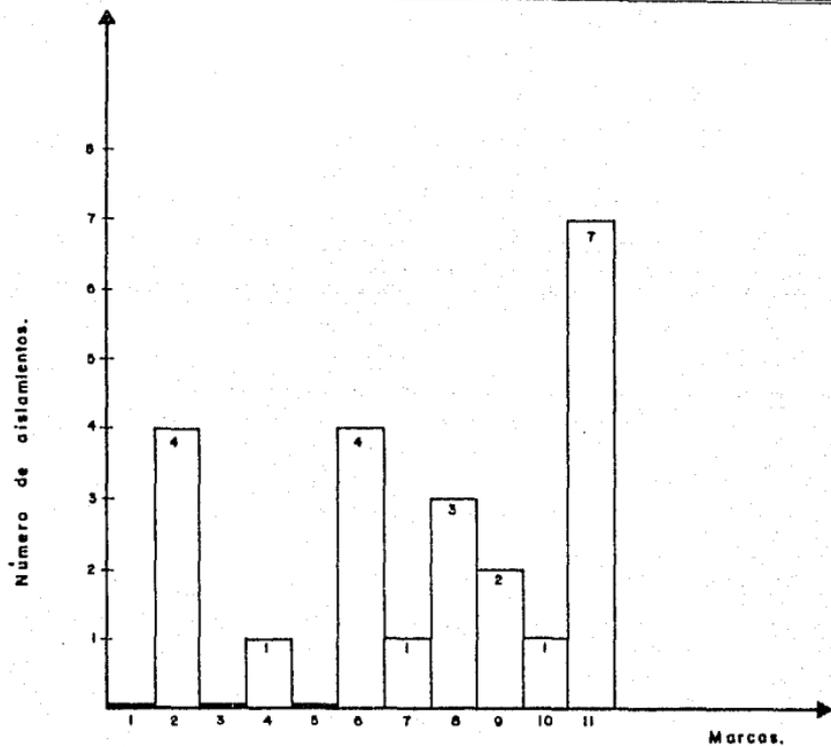
Con relación al género Penicillium, se determinaron 9 especies, todas reportadas ampliamente por la literatura como productoras de micotoxinas. Sin embargo, la producción de micotoxinas en condiciones naturales, solamente está documentada en 5 de ellas: P. citrinum Thom, P. chrysogenum Thom, P. puberulum Bain y P. purpurogenum Stoll, todas estas contaminando principalmente maíz y P. expansum Link ex Gray a manzanas.

Las micotoxinas producidas por las especies restantes se han obtenido en condiciones de laboratorio. En la tabla 1 se observa el número de aislamientos de cada especie obtenidos en este trabajo además del subgénero al que pertenecen, la toxina que producen, el sustrato y la cita bibliográfica.

Analizando el número de aislamientos de Penicillium en las diferentes marcas (Gráfica 5) obtuvimos 1 aislamiento en cada una de las marcas 4, 7 y 10; 2 en la marca 9; 3 en la 8; en las marcas 2 y 6 se aislaron 4; y en la marca 11 se presentó este género con mayor frecuencia. Sin embargo, la presencia de este género en cualquiera de las marcas analizadas sugiere un riesgo micotoxigénico potencial.

SUBGÉNERO	NÚM. DE AISLAMIENTOS	ESPECIE	MICOTOXINA	SUSTRATO	REFERENCIA
<u>FURCATUM</u>	1	<u>P. citrinum</u> Thom	citrinina	trigo, frijol maíz*	Stoloff, 1976
	1	<u>P. oxalicum</u> Carrie y Thom	ác. secalónico oxalina roquefortina C citricina	arroz	Anderson et al., 1977 Steyn, 1970 Reddy et al., 1982
<u>PENICILLIUM</u>	2	<u>P. chrysogenum</u> Thom	roquefortina C citricina ác. micofenólico ocratoxina A ác. penicílico patulina	cereal maíz* manzanas	Koehler, 1959
	2	<u>P. crustosum</u> Thom	penitrema A roquefortina C viomelina		Frisvad, 1984 Vieggar y Steyn, 1980
	2	<u>P. roquefortii</u> Thom	toxina - Pr	granos mezclados	Wei et al., 1973
	4	<u>P. expansum</u> Link ex Gray	patulina	manzanas*	
	4	<u>P. puberulum</u> Bain	ác. penicílico	maíz*	
	4	<u>P. viridicatum</u> Westling	citricina ocratoxina	maíz* cacahuete frijol	Stoloff, 1976
<u>BIVERTICILLIUM</u>	3	<u>P. purpurogenum</u> Stoll	rubratoxina A y B	maíz*	Davis y Diener, 1978

Tabla I. Especies de Penicillium aisladas de mazapán y reportadas como productoras de micotoxinas.
*en condiciones naturales.



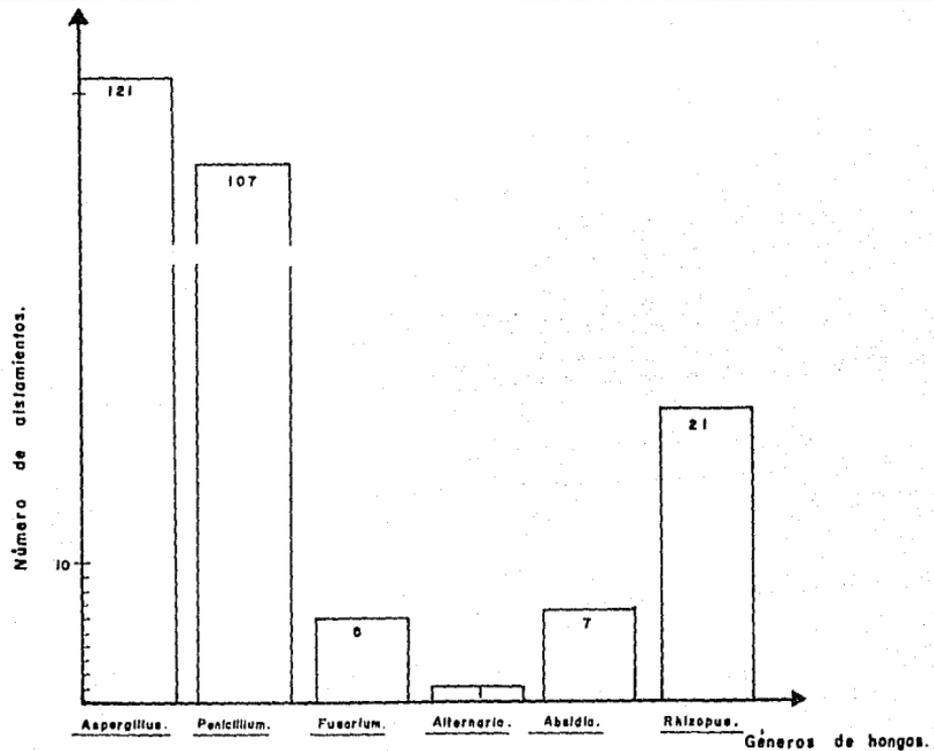
Gráfica 5. Número de aislamientos de Penicillium obtenidos de diferentes marcas de mazapán.

Para mantequilla de cacahuete se analizaron 43 muestras, de las que fueron obtenidos 121 aislamientos de Penicillium, 107 de Aspergillus, 6 de Fusarium, 1 de Alternaria, 7 de Absidia y 21 de Rhizopus (Gráfica 6).

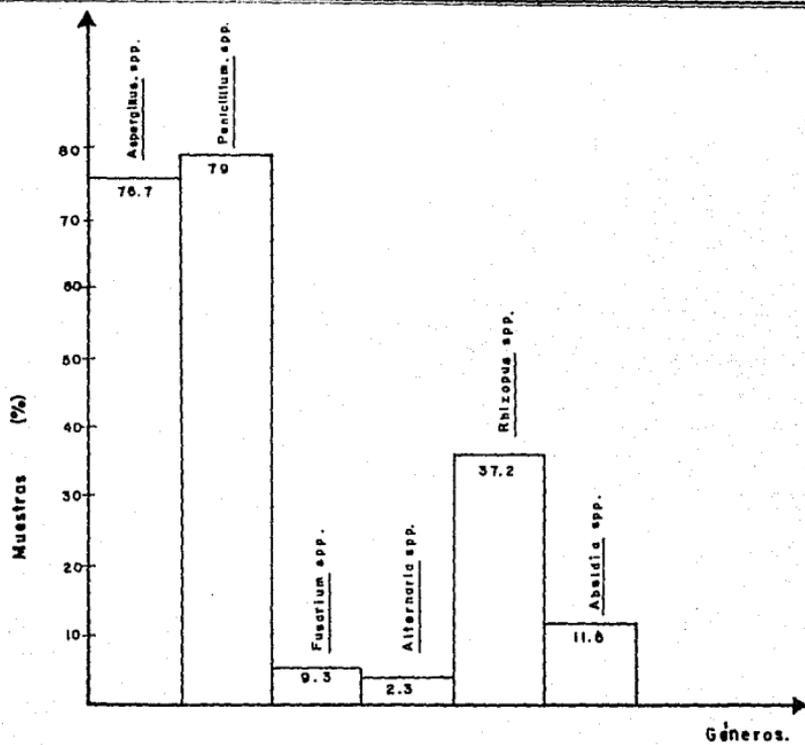
En la grafica 7 se puede observar que de las 43 muestras estudiadas 33 presentaron contaminación con Aspergillus, cifra que representa 76.7% del total de las muestras; Penicillium 34/43 (79 %); Fusarium 4/43 (9.3%); Rhizopus 16/43 (37.2%); Alternaria 1/43 (2.3%); y Absidia 5/43 (11.6%).

La presencia de Aspergillus y Penicillium en más del 75 % del total de muestras sugiere que el cacahuete utilizado para la elaboración de este alimento se encontraba altamente contaminado ya sea desde el campo o durante el almacenamiento; ahora bien, no se puede descartar la posibilidad de contaminación durante la elaboración del producto o posteriormente durante la exposición del mismo al ambiente ya que es un producto que fue comprado a granel y no lleva proceso de envasado. Como se ha mencionado Aspergillus y Penicillium son géneros productores de micotoxinas, por lo tanto es necesario conocer las especies para presumir la existencia de un riesgo sanitario potencial.

Otro género presente e importante por la producción de toxinas es Fusarium, del cual sólo se identificó Fusarium oxysporum Schlecht y que a pesar de estar presente con menor frecuencia no deja de ser preocupante como riesgo sanitario. Rhizopus y Absidia no han sido reportados como productores de micotoxinas, sin embargo, son considerados como indicadores de bio deterioro tanto de materia prima como de productos elaborados, y Alternaria que además de ser indicador de degradación, también ha sido reportado en condiciones de laboratorio, utilizando como sustrato al cacahuete, como productor de varias toxinas que causan daños celulares en animales experimentales. (Pero, en Busby y Wogan, 1979).



Gráfica 6. Número de aislamientos de los géneros obtenidos en mantequilla de cacahuete.



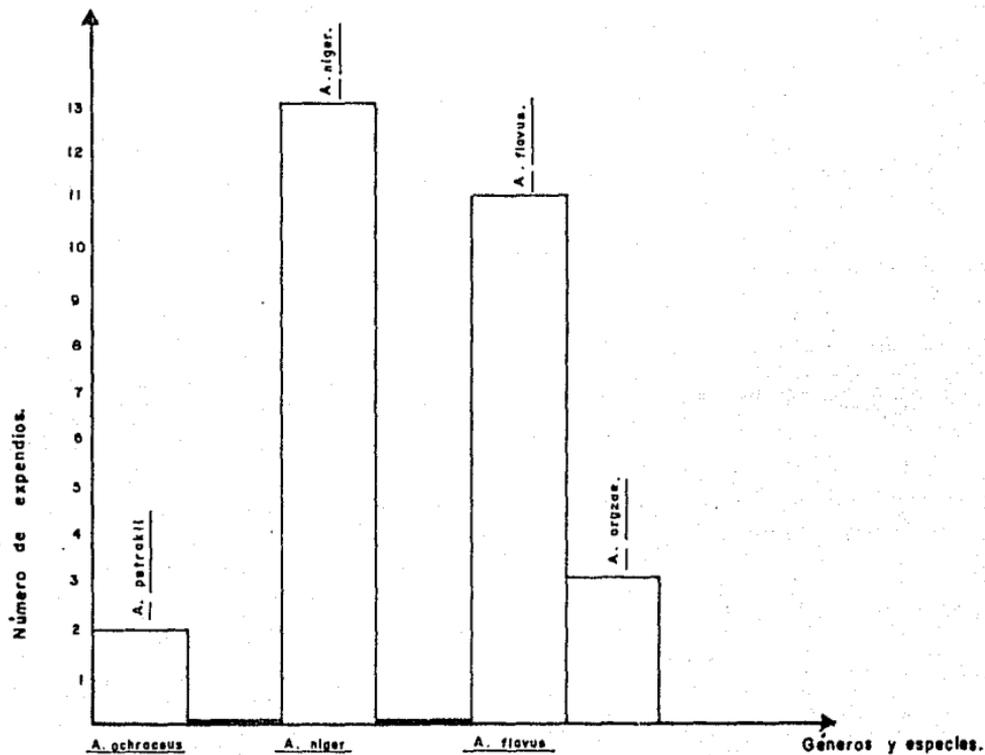
Gráfica 7. Porcentaje de muestras de mantequilla de cacahuete invadidas por diferentes géneros de hongos.

En la gráfica 8 se presenta el número de expendios en los que fueron obtenidas muestras contaminadas con Aspergillus, así como las especies de este género. A. flavus Link, especie productora de aflatoxinas fue aislada en muestras de 11 de los 14 expendios muestreados; las de A. oryzae (Ahiburg) Cohon presente en 4/14 y las de A. niger Van Tieghem en 11/14, ambas indicadoras de biodeterioro. Por último A. petrakii Vörös en las muestras de 2/14; esta especie a pesar de que no está reportada como productora de micotoxinas ni causante de degradación ha sido aislada con cierta regularidad en muestras de laboratorio por lo que deberá ser estudiada con más cuidado.

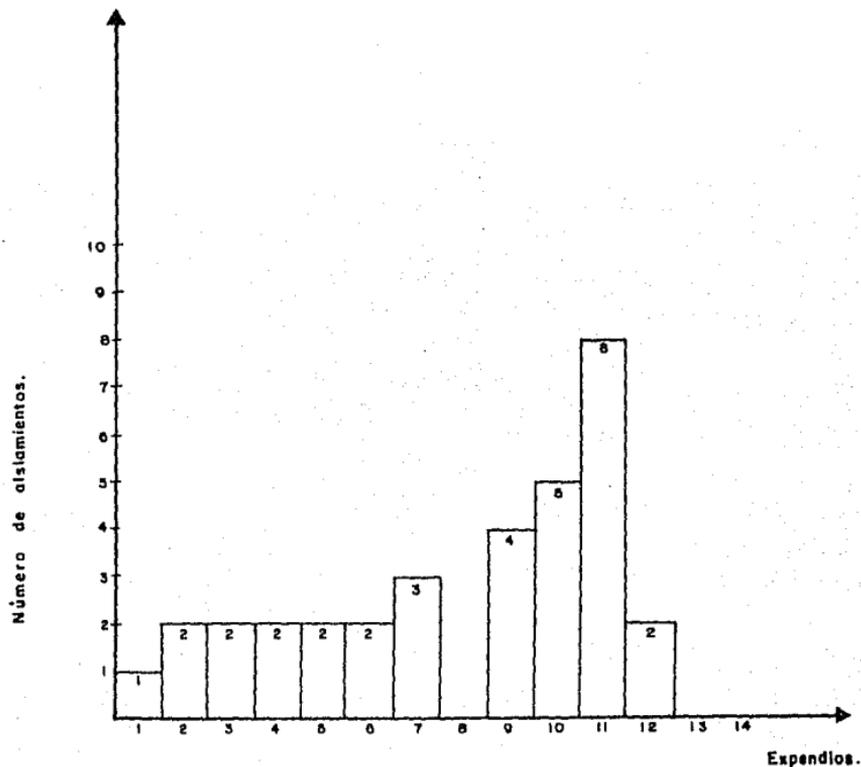
De A. flavus, en la gráfica 9 se presenta el número de aislamientos - obtenidos en las muestras de cada expendio ya que es una especie que nos representa un riesgo sanitario potencial; las del local 11 fueron de las que se obtuvieron mayor número de aislamientos (8); las del 10, 5 aislamientos; las del 9, 4; y las de los expendios 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 12 presentaron de 1 a 2 colonias.

Como se puede observar en estos datos la presencia de esta especie se encuentra en la mayoría de los expendios, lo que nos sugiere que existe riesgo micotoxigénico.

Durante la determinación del género Penicillium se identificaron 16 especies, de las cuales 12 han sido reportadas ampliamente como productoras de micotoxinas, aunque sólo en 5 se han encontrado las diferentes toxinas en condiciones naturales: P. citrinum Thom, P. melinii Thom, P. chrysogenum Thom, P. expansum Link ex Gray y P. puberulum Bain, contaminando maíz y manzanas. Las 7 especies restantes han sido reportadas como productoras de micotoxinas en condiciones de laboratorio. Cabe señalar que P. viridicatum Westling es la única especie reportada como productora de micotoxinas en condiciones de laboratorio utilizando como sustrato al cacahuate. En la tabla



Grafica 8. Número de expendios cuyas muestras fueron encontradas
contaminadas con Aspergillus.



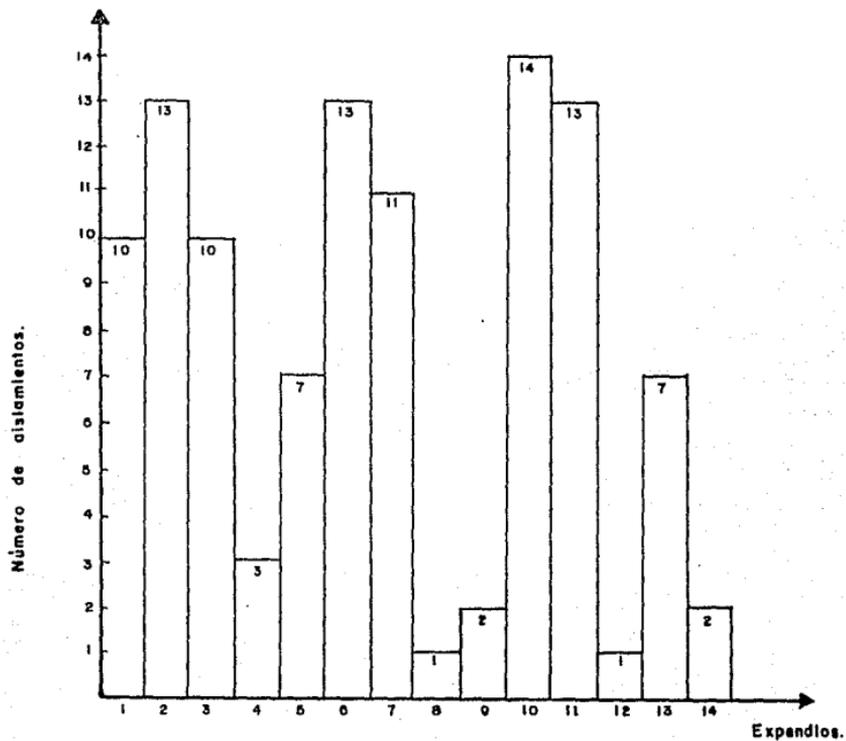
Grafica 9. Número de aislamientos de *A. flavus* Link. aislados de mantequilla de cacahuete (a granel) de diferentes expendios.

II se observa el número de aislamientos de cada especie obtenidos en este trabajo, además del subgénero al que pertenecen, la toxina que pueden producir, el sustrato y la cita bibliográfica.

Analizando el número de aislamientos de Penicillium presente en las muestras de cada expendio (Gráfica 10) obtuvimos 1 aislamiento en las de los locales 8 y 12; 2 en las de los locales 9 y 14; 3 en las del 4; 7 en las muestras del 5 y 13; 10 en las del 1 y 3; 11 en el 9; 13 en el 2, 6 y 11; y 14 en el local 10. Como se puede observar, en las muestras de la mayoría de los expendios existe un índice de contaminación preocupante ya que como se ha mencionado la mayoría de las especies identificadas son productoras de toxinas.

SUGÉNERO	NÚM. DE AISLAMIENTOS	ESPECIE	MICOTOXINA	SUSTRATO	REFERENCIA	
<u>FURCATUM</u>	12	<u>P. citrinum</u> Thom	citrinina	frijol, trigo maíz*	Stoloff, 1976	
	5	<u>P. oxalicum</u> Carrie & Thom	ác. secalónico oxalina roquefortina C citrinina	arroz	Anderson <i>et al.</i> , 1977 Steyn, P.S., 1970 Reddy <i>et al.</i> , 1982	
	3	<u>P. janthinelium</u> Biourge	jantitrema A		Frisvad, J.C., 1984	
	1	<u>P. melinii</u> Thom	patulina	manzanas*		
	1	<u>P. waksmanii</u> Zeleski				
	1	<u>P. arenicola</u> chalabuda				
	1	<u>P. brevicompactum</u> Dierckx	ác. micofenólico	cereal	Frisvad, 1984	
	8	<u>P. chrysogenum</u> Thom	roquefortina C citrinina ác. micofenólico ocratoxina A ác. penicílico patulina	cereal maíz* manzanas	Koehler, 1959	
	<u>PENICILLIUM</u>	17	<u>P. crustosum</u> Thom	penitrema A roquefortina C viomelina		Frisvad, 1984 Vieggar y Steyn, 1980
		8	<u>P. echinulatum</u> Raper y Thom ex Fassatiava	ác. ciclopiazónico		Frisvad, 1984
18		<u>P. expansum</u> Link ex Gray	patulina	manzanas*	Stoloff, 1976	
1		<u>P. olivicolor</u> Pitt				
8		<u>P. puberulum</u> Bain	ác. penicílico	maíz*	Stoloff, 1976	
10		<u>P. viridicatum</u> Westling	citrinina ocratoxina	maíz frijol		
<u>BIVERTICILLIUM</u>		1	<u>P. variable</u> Sopp	rugulosa	maíz	Frisvad, 1984
	11	<u>P. pinophilum</u> Hegcock				

Tabla II. Especies de Penicillium aisladas de mantequilla de cacahunte y reportadas como productoras de micotoxinas
* en condiciones naturales.



Gráfica 10. Número de aislamientos de Penicillium obtenidos de mantequilla de cacahuate de diferentes expendios.

CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos se puede concluir que en ambos productos elaborados a base de cacahuete existe un riesgo potencial micotóxico, esto debido a la presencia de especies de Aspergillus, Penicillium y Fusarium reportadas como micotoxígenas.

La presencia de géneros como Rhizopus, Alternaria y Absidia sugieren que los productos analizados están sujetos a riesgos de biodeterioro que pueden afectar la economía tanto de productores como de consumidores.

Conociendo que durante el muestreo, los productores tradicionalmente aceptan 5 % de riesgo y los consumidores 10 %, es necesario continuar con este tipo de estudios para establecer en México la realidad de manera estadísticamente confiable.

BIBLIOGRAFIA CITADA

- Andersen, R., Buchi, G., Kobbe, B. y Demain, A.L. 1977. Secalonic acids D and F are toxic metabolites of Aspergillus aculeatus. J. Org. Chem. 42: 352 - 353.
- Anónimo, P.G.A. 1969. Recomendation on aflatoxin FAO/WHO/UNICEPAG. Statemnt No 2.
- Anónimo. 1974. Problems of aflatoxin in oil seed and oil cakes: Sumary and analysis of questionnaire replies. Food and Agriculture Organization CCP: O.F. 74/4, Rome.
- Anukarahanonta, T., Chudhabuddhi, C., Temcharoen, P., Sukroongreung, S. 1983. Cancer riesk from aflatoxins in Thailand. En: Kurata, H. y Ueno, Y., (Eds.) Toxigenic Fungi their Toxins and Health Hazard. Elsevier. Nueva York; pp 339 - 347.
- Austwick, P.K.C. y Ayerst, G. 1963. Groundnut microflora and toxicity Chem. y Ind. 12: 55 - 61.
- Barnett, H.L. y B.B. Hunter. 1972. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Burgess, Mineápolis, Minnesota. 241 pp.
- Booth, C. 1971. The Genus Fusarium. Commonwealth Mycological Institute Englad. 237 pp.
- Bu'Lock, J.F. 1975. Secondary metabolism in fungi and its relation ships to growth and development. En: G.E. Smith y D.R. Berry (Eds.), The Filamentous Fungi. Industrial Micology. Vol. 1 Arnold, Londres. pp. 33 - 58.
- Bu'Lock, J.F. 1980. Mycotoxins as secondary metabolites. En: P.S. Stein (Ed.), The biosynthesis of Mycotoxins. A. study in secondary metabolism. Academic Press, Nueva York, pp 1 - 16 .
- Busby, W.F., Jr. y Wogan, G.N. 1979. Food borne mycotoxins and alimentary micotoxycosis. En: Hans, R. y Frank, B.L. (Eds.), Food-Borne Infections and Intoxications, Academic. Press, 2da. Edition 748 pp.
- Butler, H.W. 1965. Liver Injury an aflatoxin. En: Wogan, G.N. (Ed.), Mycotoxins in Foodstuffs Mass. Inst. Tech. Press. Cambridge, 175 - 186 pp.
- Butler, H.W. 1969. Aflatoxicosis in laboratory animals. En: L.A. Goldblatt (Ed.) Aflatoxin. Academic Press, Nueva York, pp 223 - 226.
- Davis, N.D. y L.U. Diener. 1978. Micotoxins. En: Beuchat, L.R. (Ed.), Food and Beverage Mycology. Avi. Publ. Co. Westport, Connecticut, pp. 394 - 444.
- Diener, L. U. y N.D. Davis. 1969. Production of aflatoxin on peanuts under contralled. J. Stored. Prod. Res. 5: 251 - 258.
- Diener, L.U. y N.D. Davis 1970. Limiting temperature and relative humedity for aflatoxin production by Aspergillus flavus in stored peanuts. J. Am. Oil. Chem. Soc. 47: 347 - 351

- FAO. 1978. Informe de la conferencia mixta FAO/DMS/PNUMA., sobre micotoxinas celebrada en Nairobi del 19 - 27 de septiembre de 1977. Roma, FAO.
- Frisvad, J.C. 1984. Expresiones of secondary metabolims as fundamental characters in Penicillium taxonomy. En: Kurata, H. y Y. Ueno (Ed.), Toxigenic Fungi. Elsevier. Amsterdam, pp 98 - 106.
- Gaucher, E. y E. Sergent. 1984. Un cas de pseudotuberculose aspergillaire simple chez gaveur del pigeans. Bull. Mém. Soc. Med. Hop., Paris, Ser. III, 11: 512 - 521.
- Gibson, I.A.S. 1953. Crow rot a seedling disease of groundnuts caused by Aspergillus niger. Brit. Mycol. Soc. Trans. 36: 198 - 209.
- Guiller, P. y P. Silvestre. 1970. El cacahuete o maní. Ed. Blume Barcelona. 281 pp.
- Hesseltine, C.W. 1965. Amillennium of fungi, food and fermetation. Mycologic. 57: 149 - 197.
- Hesseltine, C.W. 1976. Conditions leading to mycotoxin contamination of foods and feeds. En: Am. Chem. Soc. 149: 1 - 22.
- Hitokoto, H., Morazumi, S., Waude, T. y Kurata H. 1983. Distribution of micotoxin-producing in market in foods in Japan. En: Kurata, H. y Ueno, Y. (Eds.) Toxigenic Fungi their Toxins and Health Hazard. Elsevier. Nueva York, pp. 15 - 23 .
- Koehler, B. 1959. Corn ear tors in Illinois. University of Illinois. Agricultura Experimental Station. Bull. 639: 21 - 22
- Lancaster, C.M., F.P. Jenkis y J. Mc Philip. 1961. Toxicity associated with certain samples of groundnuts. Nature. 192: 1095 - 1096.
- Lillehoj, B.E. 1983. Effect of enviromental and cultural factors on aflatoxin contamination of developing corn kernels. En: L.U. Diener, R.L. Asquith y J.W. Dickens (Eds.), Aflatoxin and Aspergillus flavus in Corn. Southern Cooperative Serles Bull. 279. Auburn University, Alabama, 112 pp.
- Martínez, F.R. y García, A.G. 1989. Micoflora y aflatoxinas en Mazapán: Inspección preliminar. An. Inst. Biol. Univ. Nal. Autón. Mex. Ser. Bot. 58: 7 - 13.
- Patterson, D.S.P. 1980. Mycotoxins. En: H.J.M. Brown et al., Environmental Chemistry. The Royal Soc. Chem. Burlington, pp. 205 - 232.
- Pitt, J.I. 1979. The Genus Penicillium and its Telemorphic States Eupenicillium and Talaromyces. Academ. Press. Londres, 643 pp.
- Pettit, R.E. and Taber, R.Z. 1968. Factors influencing aflatoxin aculation in peanut kernels and the associated micoflora. App. Microbiol. 16: 1230 - 1234.

- Pettit, R.E., Taber, R.A., Schroeder, H.W. y Harrison, A.L. 1971. Influence of fungicide and irrigation production aflatoxin in peanuts before digging. Appl. Microbiol. 22: 629 - 234.
- Fabie, C.J. y E. Swalley. 1965. Influence of temperature on the production of aflatoxin by Aspergillus flavus. Symposium on Micotoxin in Foodstuffs, Sess. 2: Agr. Aspects. Dept. Agr. Tech. Ser., Pretoria.
- Raper, K.B. y D.I. Fennell. 1965. The Genus Aspergillus. William and Wilkins, Baltimore, 686 pp.
- Reddy, R.V., A.W. Hayes y W.O. Berndt. 1982. Disposition and metabolims of citrinin in pregnant rats. Toxicol. 25: 161 - 170.
- Renón, L. 1985. Deux cas familiaux de tuberculose aspergillaire simple chez des peignerus de chevaux. Compt. Rend. Soc. Biol. 47: 694 - 696.
- Robles, S.R. 1980. Producción de Oleaginosas y Textiles. Ed. Limusa México, D.F. 258 pp.
- Sargeant, K., A. Sheridan, J. O'Kelly y R.B.A. Carnehan. 1961. Toxicity associated with certain samples of groundnuts. Nature. 192: 1096 - 1097.
- Schindler, F.A. 1967. Temperature limits for production of aflatoxin by twenty-five isolates of Aspergillus flavus and A. parasiticus. En: Diener, L.U., R.L. Asquith y J.W. Dickens (Eds.); Aflatoxin and Aspergillus flavus in Corn. Southern Cooperative Series Bull. 279. Auburn University, Alabama, 112 pp.
- Schroeder, W.H. y H. Hein Jr. 1967. Aflatoxin production of the toxins in vitro in relation to temperature. Appl. Microbiol. 14: 441 - 445.
- Shank, R.C. 1979. The role of aflatoxin in human disease. En: J.V. Rodricks (Ed.) Mycotoxins and Other Fungal Related Food Problems. Adv. Chem. Soc. Washington, D.C. 51 - 97.
- Spensley, P.C. 1963. Aflatoxin, the active principle in turkey "X" disease. Endavor. 22: 75 - 77.
- Steyn, P.S. 1979. The isolation structure and absolute configuration of seco lonic acid. D the toxic metabolite of Penicillium oxalicum. Tetrahedron 26: 51 - 57.
- Stoloff, L. 1976. Occurrence of mycotoxins in foods and feed. En: J.V. Rodricks. (Ed.) 1976. Mycotoxins and Other Fungal Related Food Problems. Am. Chem. Washington, D.C. 51 - 57 pp.
- Tuite, John. 1969. Plant Pathological Methods Fungi and Bacteria. Burgess Company. Minneapolis, Minn. 239 pp.

- Vieggar, R. y P.S. Steyn. 1980. The biosynthesis of Mycotoxins a Study in Secondary Metabolism. Academic Press Londres, 432 pp.
- Warcup, J.H. 1950. The soil-plate method for isolation of fungi for soil. Nature. 156: 117 - 118.
- Wei, R., Still, P.E., Smalley, E.B., Schnoes, H.K. y Strong, F.H. 1973. Isolation and partial structure of a Mycotoxin from Penicillium roqueforti. Appl. Microbiol. 25: 111 - 114.
- WHO/FAO/UNICEF. 1962. "There's a fungus among us (A note on the peanut toxicity problem)" World Health Organization Nutrition Document. R. 3/Add, Roma, 23 pp.
- Wicklow, D.T. 1984. Adaptation in wild and domesticated Yellow-Green Aspergilli. En: Kurata, H. y Ueno, Y. (Eds). Toxicogenic Fungi their Toxins Hazard. Elsevier. Nueva York, pp 78 - 85.
- Wogan, G.N. 1968. Aflatoxin risks and control measures. Geographic Nutrition 27: 932 - 938.
- Zuber, M.S. y E.B. Lillehoj. 1979. Status of the aflatoxin in corn. J. Environ. Qual. 8: 1 - 5.